

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

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ГОРИН ОКСАНА ІГОРІВНА

УДК 502/504:582.232]:615

ДИСЕРТАЦІЯ
ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ РЕАКЦІЇ КОРОПОВИХ РИБ НА ВПЛИВ
НОВІТНІХ БІОРИЗИКІВ

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

_____ О. І. Горин

Науковий керівник (консультант): доктор біологічних наук, професор
Фальфушинська Галина Іванівна

Тернопіль – 2021

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 (Tarau 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 циліндроспермопсину, мікроцистинів (-LR, -YR та -RR), та анатоксину дали негативні результати.

Цито- та генотоксичні властивості циліндроспермопсину – 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 запропонованого дослідження з використанням нормальних гепатоцитів коропа в умовах *in vitro* було перевірено токсичність п'яти синтетичних аналогів циліндроспермопсину, 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 циліндроспермопсину, містить групи гуанідину, гідроксилу та урацилу, але не має його складної трициклічної структури. Зроблені в процесі роботи спостереження підтверджують гіпотезу, що токсичність циліндроспермопсину 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 продуктивних 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 Касперіського 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 μl / ml) and at high (10 μl / 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., **Норын О.**, 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., **Норын О.**, 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., **Норын, О.**, 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., **Норын О.**, 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. Henaо E., Murphy P. J, Falfushynska H., **Норын О.**, 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 (Scopus) IF 3.531**

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. Rzymiski P., **Норын О.**, 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., Sprinґe 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 біостаціонару 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 ХХ-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. і

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. – №u2019 03561; 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 : "Sciencsee Publishing", 2019. – 198 p. P. 85-99. ISBN 978-1-9993071-3-4

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	16
ВСТУП	17
РОЗДІЛ 1 Сучасні методологічні підходи оцінки якості водного середовища	23
1.1 Реакції молекулярних механізмів адаптації водних тварин як показник токсичності середовища	23
1.2 Нові підходи до оцінки впливу ціанобактерій на водні екосистеми	34
РОЗДІЛ 2 Матеріали та методи дослідження	47
2.1. Об'єкти дослідження та постановка експерименту	47
2.2. Біохімічні методи дослідження	52
2.2. Дослідження тератогенного ефекту	58
2.4. Аналіз дослідних зразків	59
2.5. Математичні методи обробки даних	60
РОЗДІЛ 3. Поширення ціанобактерій ряду <i>Nostocales</i> у водоймах західної України та вплив їх метаболітів на коропових риб <i>Carassius auratus gibelio (in vivo)</i>	62
3.1. Поширення та токсичність <i>Raphidiopsis raciborskii</i> у водоймах-оходжувачах електростанцій	62
3.2. Молекулярні і фізіологічні маркери стресу, ефекту та токсичності у коропової риби із зарегульованої водойми гідроелектростанції та контрольної ділянки.	69
РОЗДІЛ 4. Токсичні ефекти впливу <i>Raphidiopsis raciborskii</i> на коропових риб (<i>Cyprinus carpio</i>) в умовах <i>in vitro</i>	80
4.1. Оцінка впливу біоактивних метаболітів <i>R. raciborskii</i> на рибу (<i>in vitro</i>)	80
4.2. Цитотоксичність синтетичних аналогів циліндроспермопсину	90
РОЗДІЛ 5. . Визначення токсичності харчових добавок на основі хлорели і спіруліни за реакціями молекулярних маркерів <i>Danio rerio (in vivo)</i>	96
РОЗДІЛ 6. Аналіз та узагальнення результатів дослідження	106
ВИСНОВКИ	116
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	118
ДОДАТКИ	159

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АТХ-а – анатоксин-а
СУN – циліндроспермопсин
СУР1А – цитохром Р450-монооксигеназа
GРх – глутатіонпероксидаза
GR – глутатіонредуктаза
GSH – глутатіон
GSSG – окиснена форма глутатіону
GST – глутатіон-S-трансфераза
MC-LR – мікроцистин-LR
MC-RR – мікроцистин-RR
NR – нейтральний червоний
АФО – активні форми оксигену
ВтГ – вітелогенін
ВтГ-ПП – вітелогенін-подібні протеїни
ДТНБ – 5,5-дитіобіс-2-нітробензойна кислота
ЕРОД – 7-етоксиресоруфін-О-деетилаза
КАТ – каталаза
КПП – карбонільні похідні протеїнів
КФ – кондиційний фактор
МС – мікроцистин
МТ – металотіонеїни
МТ-SH – металотіонеїни, визначені за кількістю SH-груп
ОМП – окисні модифікації протеїнів
ПАВ – поліциклічні ароматичні вуглеводні
ПМА – поліметокси-1-алкени
ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів
СІ – соматичний індекс
СОД – супероксиддисмутаза
ТБК-АП – ТБК-активні продукти
ХЕ – холінестераза

ВСТУП

Протягом останніх десятиліть постерігається 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 мінливістю та різноманітністю складу у часі та токсичним ефектом складових вже у мінімальних, наномолярних, концентраціях. При цьому такі речовини (фармацевтичні препарати, засоби побутового вжитку, пестициди, ціанотоксини та ін.) не піддаються ефективному видаленню традиційними методами очистки стічних вод (Nunes et al. 2008).

У наш час особливо актуальною стає проблема активного 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 *Nostocales* 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). Це явище можна пояснити високою фенотиповою пластичністю, зміною клімату та антропогенною евтрофікацією (Cirés and Ballot 2016). Очевидно, що прісноводні водойми з стабільно підвищеним температурним режимом (напр. водойми-охолоджувачі атомних чи теплових електростанцій), забезпечують сприятливе середовище для експансії токсичних видів ціанобактерій на нові території з наступним їх поширенням.

У даний час все ще існують прогалини в знаннях щодо токсичності представників ряду *Nostocales*. Це особливо стосується поширених видів, які населяють прісні водойми Європи. Ціанобактерії, які виробляють токсичні метаболіти, можуть також впливати на водну флору і фауну, у тому числі безхребетних чи хребетних тварин (Lamb, Kimme, and Field 2019) та людину

(Dellinger J. et al. 2017). Токсичність *Nostocales*, які населяють українські водойми, малодосліджена (Falfushynska et al. 2019; Novosiolova and Protasov 2016).

Водні тварини адаптуються до сучасних умов існування у антропогенно-змінених водоймах. Разом з тим, особливості антропогенного тиску, спонтанність, імпульсність та комплексна дія численних чинників, що реалізується на тлі змін клімату, вимагають нових підходів у оцінці діапазону резистентності організму, а також стратегії компенсаторних процесів. Біологічний вплив цих множинних стресорів не може бути прогнозований на підставі визначення вмісту окремих забруднювачів і потребує застосування чутливих і коректних біомаркерів для оцінки екологічної ситуації (Bhandari and Lynes 2019; Lionetto, Caricato, and Giordano 2019).

Коропові риби є визнаними біоіндикаторними організмами (Samanta et al. 2018; Chen et al. 2017; Marins et al. 2019). Вони можуть накопичувати в тканинах токсичні сполуки, як органічного, так і не органічного походження (Rabcheniuk et al. 2019; Wang et al. 2020; Liu et al. 2020) та володіють високою екологічною значимістю у водному середовищі завдяки впливу на структуру харчового ланцюга і участі у кругообігу поживних речовин та передачі енергії (Kumar et al. 2004, Elia, Waller, and Norton 2002). Оскільки біологічні та біохімічні реакції риб на токсичні речовини часто схожі з реакціями інших вищих хребетних, вони є альтернативними біоіндикаторними видами (Kroon, Streten, and Harries 2017; Al-Thaqafi 1991).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась у межах Держбюджетних тем МОН України (конкурс проєктів наукових робіт та науково-технічних (експериментальних) розробок молодих вчених) № МВ-1 «Розробка та валідація нових методів оцінки глобальних та локальних біоризиків довкілля» (№ державної реєстрації 0117U006801, 2017–2019 р.р.) та № МВ-2 «Розробка молекулярної тест-системи для оцінки біобезпеки ціанотоксинів та фармацевтиків» (№ державної реєстрації 0120U101544 (2020–2022 р.р.).

Метою дисертаційного дослідження було встановлення фізіолого-біохімічних реакцій коропових риб на вплив токсичних метаболітів ціанобактерій.

Для досягнення мети було визначено такі завдання:

1. Дослідити видовий склад ціанобактерій ряду *Nostocales* у водоймах, що прилягають до гідроелектро- та атомної електростанцій Західної України, визначити вторинні токсичні метаболіти, які вони продукують та оцінити їх вплив на коропових риб.
2. Порівняти показники фізіологічних і біохімічних маркерів стресу, ефекту та токсичності у коропових риб із зарегульованої водойми гідроелектростанції та контрольної ділянки за впливу метаболітів ціанобактерій.
3. Встановити особливості токсичної дії циліндропермопсину з використанням його синтетичних аналогів на ізольованих клітинах *Suipinus carpio* в умовах *in vitro*.
4. Визначити вміст поліметоксиалкенів в комерційних харчових добавках на основі хлорели та спіруліни, виготовлених у різних країнах (Китай, Тайвань, Індія та ін.) та оцінити токсичність виділених з них ліпофільних фракцій за реакціями молекулярних маркерів *Danio rerio*.

Об'єкт дослідження — механізми стресу та детоксикації у риб.

Предмет дослідження – фізіологічні та біохімічні реакції коропових риб на метаболіти ціанобактерії та синтетичні аналоги їх токсинів в умовах *in vitro* та *in vivo*.

Методи дослідження – спектрофотометричні (визначення вмісту МТ, метаболітів та продуктів окисної деструкції, активності ферментів, хімічного складу водних розчинів), флуоресцентні (визначення рівня оксирадикалів, окисного ушкодження ДНК), мікроскопічні (визначення рівня цитогенетичних аномалій, стабільності лізосомних мембран), морфометричні та методи математичної статистики (кореляційний, дисперсійний, регресійний, факторний аналізи, метод головних компонент, тощо).

Наукова новизна одержаних результатів. Встановлено присутність ціанобактерій *Raphidiopsis raciborskii* та *Aphanizomenon gracile*, які є продуцентами циліндроспермопсину, у водоймах Західної України. Обґрунтовано наявність у водоймах нижче та вище дамби ГЕС додаткових пошкоджуючих чинників, в тому числі метаболітів ціанобактерій. Показано, що реакції молекулярних маркерів ізольованих клітин коропа *in vitro* свідчать про токсикологічний ризик для прісноводних риб з боку штамів *Raphidiopsis raciborskii* як з українських, так і з польських водойм, незважаючи на те, що вони не продукують циліндроспермопсину. Продемонстровано, що токсичність циліндроспермопсину є результатом стеричної та функціональної взаємодії гідроксильної групи та гуанідинового компонента та може бути опосередкована метаболітами альготоксину, на що вказують результати досліджень з використанням відповідних модифікацій його синтетичних аналогів. Досліджено наявність поліметокси-1-алкену (як одного з біологічно активних вторинних метаболітів у мікрководоростях) у харчових добавках на основі біомаси спіруліни та хлорели та оцінено потенційний тератогенний ефект їх ліпофільних фракцій на ембріонах *Danio rerio*.

Практичне значення одержаних результатів.

Визначено основні показники молекулярних стресорних та детоксикаційних систем коропових риб, які можна використовувати для оцінки якості водного середовища та розроблено алгоритм її проведення (Фальфушинська та Горин, 2018). Цей алгоритм впроваджено у вигляді науково-практичних рекомендацій та методик у діяльність природоохоронних та водопостачальних організацій Тернопілля (у тому числі комунального підприємства «Тернопільводоканал», Національного природного парку «Дністровський каньйон» та Держуправління екології в Тернопільській області), що підтверджено актами впровадження та може служити важливим аргументом у оцінці наслідків впливів альготоксинів на живі організми. Результати досліджень також впроваджено в освітній процес на хіміко-біологічному факультеті та факультеті фізичного виховання Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно опрацьовано наукові літературні джерела, здійснено підготовку та організацію експериментів, в тому числі з використанням дослідних зразків, отриманих від співробітників Познанського медичного університету (Польща) та Бангорського університету (Велика Британія) в рамках тристоронньої співпраці. Біохімічні методи дослідження та аналіз води проведено спільно із співробітниками НДЛ порівняльної біохімії та молекулярної біології. Палнування експериментів, статистичні обрахунки, аналіз та інтерпретація отриманих результатів проводилися з науковим керівником д.б.н., проф. Фальфушинською Г. І.

Апробація результатів роботи. За результатами дисертаційного дослідження опубліковано 2 патенти на корисну модель, основні тези доповідались на міжнародних та всеукраїнських конференціях, зокрема: XIV, XV, XVI Міжнародних наукових конференціях студентів і аспірантів “*Youth and Progress of Biology*”: (м. Львів, 10–12 квітня 2018, 9–11 квітня 2019 р., 27–28 квітня 2020 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції «*Тернопільські біологічні читання 2018*» (м. Тернопіль, 19–21 квітня 2018 р.); XX з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. П. Г. Костюка (з міжнародною участю) (м. Київ, 27–30 травня 2019 р.); XII Українському біохімічному конгресі (м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р.); міжнародній конференції «*Lakes & Reservoirs: Hot Spot and Topics in Limnology*» (м. Мікоржин, Польща, 17–20 вересня 2019 р.); III міжнародній науково-практичній конференції «*The Problems Of Functioning And Bioproductivity Impruvment Of Water Ecosystems*» (м. Дніпро, 25–27 березня 2020 р.); XII Всеукраїнській конференції «Молоді вчені 2021 – від теорії до практики» (м. Дніпро, 25 березня 2021 р.); конференції-конкурсі молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2021» (м. Київ, 20–21 травня 2021 р.).

Публікації. За матеріалами дисертаційного дослідження опубліковано 17 праць, в тому числі 5 статей у фахових виданнях, які індексуються у наукометричних базах даних Scopus та/або WoS, розділ колективної монографії, 10 матеріалів і тези

доповідей на з'їздах та конференціях, 2 патенти на корисну модель. Індекс Гірша згідно наукометричної бази даних Scopus – 6 (author ID: 57193336903).

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 167 сторінках комп'ютерного набору, складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів роботи та їх обговорення (3 розділи), узагальнень, висновків, списку використаних джерел та 2 додатків. Робота містить 19 рисунків, 6 таблиць. Бібліографічний список складає 297 джерел, з них 222 – англійською мовою.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ МЕТОДОЛОГІЧНІ ПІДХОДИ ДО ОЦІНКИ СТАНУ ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА

1.1. Реакції молекулярних механізмів адаптації водних тварин як показник токсичності середовища

Організми, популяції, біоценози а також екосистеми постійно зазнають впливу низки біотичних та абіотичних факторів (кліматичні умови, сонячна радіація, доступність кормової бази, стосунки хижак-жертва, паразити, хвороби, міжвидова та внутрішньовидова конкуренція), які можуть діяти як окремо, так і у сукупності (Schüürmann and Markert 1998). Детермінуючою характеристикою існування таких систем є якість середовища – його відповідність особливостям певних об'єктів. Прикладом якості водного середовища є відповідність стану водойм (хімічний і біологічний склад, фізичні властивості води) потребам організмів, які його населяють (Гандзюра 2020). За останні десятиліття зміни параметрів водного середовища набули нового виміру як за своєю якістю, так і за інтенсивністю. Речовини, які раніше не потрапляли в поле зору дослідників через технологічні обмеження в способах їх детекції (наприклад пластик, пестициди, добрива, метали, муніципальні та аграрні стоки, засоби особистого вжитку і фармацевтики), посилюють негативні прояви антропогенного пресу на біоту та екосистеми загалом (Schettino et al. 2012; Wiese et al. 2010). Такий стан речей створює необхідність застосування серед методів оцінки якості води таких, що не тільки забезпечать об'єктивну оцінку стану водних екосистем, а й дозволять спрогнозувати їх здатність забезпечити існування та відтворення біоценозів, притаманних даним типам водойм (Яцик А. В. та Шевчук В. Я., 2006).

Зростання небезпеки пошкоджуючих впливів речовин, які раніше не ідентифіковувалися у складі водного середовища, на живі організми зумовлює підвищений інтерес до способів ранньої ідентифікації, оцінки та попередження небезпек, викликаних їх надходженням у навколишнє середовище. Протягом останніх років незаперечним є той факт, що інформація лише про вміст хімічних

речовин у повітрі, воді чи донних відкладах є недостатньою для висновків щодо їх впливу на живі організми (Burgeot et al. 2017; Lionetto, Caricato, and Giordano 2019). Окрім того, оцінка дії забруднювачів на організми та екосистеми ускладнюється низкою факторів, включаючи хімічну природу поллютантів, одночасну присутність кількох забруднюючих речовин, які можуть характеризуватися адитивними ефектами впливу, біодоступність та різну чутливість видів до впливу одних і тих ж речовин (Pander et al. 2018, Connon, Geist, and Werner 2012). Все це обумовлює необхідність розробки нових методологічних підходів до ідентифікації та оцінки можливих наслідків впливу цих забруднювачів.

Кількісними показниками впливу забруднювачів на біосистеми можуть виступати біомаркери – показники, що характеризують взаємодію організму з пошкоджуючими чинниками різної природи (фізичної, хімічної, біологічної тощо) і можуть бути використані для визначення ступеня впливу, глибини змін та оцінки сприйнятливості організму до таких ефектів. Крім того, біомаркери розширюють розуміння процесів, за допомогою яких речовини або їх сполуки поглинаються і трансформуються в організмі. Раннє виявлення токсичних ефектів на клітинному та молекулярному рівнях є ключем до розуміння можливих шляхів нівелювання їх впливів (Lionetto, Caricato, and Giordano 2019), що пояснює швидкі темпи розвитку цього напрямку досліджень. Зокрема, за даними PubMed кількість публікацій за ключовими словами «biomarkers», «pollution», «environmental» з 2000 по 2020 рік зросла у десять разів (від 1 806 до 18 727 статей).

На сьогодні не існує єдиної загальноприйнятої класифікації біомаркерів. Наприклад, Віаренго та ін. (2007) розділяє біомаркери на три групи: стресу, генотоксичності та ефекту.

Біомаркери стресу відображають швидкі реакції тварин на токсичні впливи і включають зміну стійкості лізосомальних мембран та показників окисного стресу. Доведено, що лізосомальна система реагує на загальний фізіологічний стрес і впливи хімічних забруднювачів органічної та неорганічної природи шляхом зміни стабільності мембран (збільшення проникності, порушення їх цілісності), кількості

лізосом та/або їх агрегацією (Moore, Icarus Allen, and McVeigh 2006). Наприклад, вплив інсектициду MgHP за концентрацій (0,1, 1, 10, 100 та 1000 нг/мл) на клітинні лінії гепатоцитів даніо через 24 год викликав зниження стабільності лізосомальних мембран на 12-34 % (Bonomo et al. 2019). Дія бензо(а)пірену на плямистого окуня за концентрацій 2, 20 та 35 мг/кг маси спричиняла зниження цього показника у зразках крові на 4, 8 та 12 % відповідно у порівнянні з контролем (Khanian et al. 2016). Дія йонів купруму та CuO-нанокompозиту (10 мкг Cu/л протягом 21 доби) призводила до дестабілізації лізосомальних мембран у гепатоцитах *Danio rerio*, без повернення до рівня контролю навіть через 6 тижнів після завершення експозиції (Vicario-Parés et al. 2018). З огляду на чутливість даного показника до впливу широкого кола чинників, доречним вважають визначення порушення лізосомальної стабільності у комплексі із специфічними біомаркерами (Moore, Icarus Allen, and McVeigh 2006). Це полегшує трактування отриманих результатів та забезпечує інтегральну картину *health status* організму.

Велику групу неспецифічних біомаркерів представляють показники окисного стресу, які відображають дисбаланс між утворенням активних форм кисню (АФО) та здатністю біологічних систем їх знешкоджувати і відновлювати пошкоджені біомолекули, молекулярні мішені, клітинні структури тощо. Пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ), система глутатіону, активність антиоксидантних ферментів є найбільш часто застосовуваними показниками окисного стресу. Це пов'язано із їх високою чутливістю до змін умов середовища, відносною простотою визначення та, в окремих випадках, наявністю стандартизованих протоколів з широким діапазоном для їх використання (Montserrat et al. 2007). Зокрема, дія 10 % LC₅₀ (1,357 мг/л) гербіциду Roundup Original на гібридний вид риб *Leiarius marmoratus* × *Pseudoplatystoma reticulatum* викликала збільшення рівня ТБК-АП у печінці на 40,3 % вже через 6 годин експозиції та на 30,1 % через 48 годин. У м'язах їх рівень зростав на 33,4 % за 24 години у порівнянні з контрольними групами (de Moura et al. 2017). Вплив кадмію

(1,78 мкМ) на *D. rerio* вже через 3 години експозиції призводив до зростання рівня АФО та через 6 – ПОЛ у печінці на 36 та 56 % відповідно (Wu et al. 2017). Дослідження *Carassius auratus* із забруднених муніципальними стоками водою показало збільшення пошкодження ліпідів на 40,40 % у зябрах, 54,94 % печінці та 44,93 % нирках (Samanta et al. 2018). Внутрішньочеревна ін'єкція мікроцистину-LR (150 мкг/кг) через 48 годин викликала у коропа збільшення рівня ПОЛ на 86 % (Chen et al. 2017). Навантаження іонами Fe^{3+} (0,2 та 0,5 мг/л) видоспецифічно змінювало фракційний склад ліпідів у зябрах, печінці, нирках та м'язах коропа (*Cyprinus carpio*) та щуки (*Esox lucius*) (Rabcheniuk et al. 2019).

Також заслуговує на увагу визначення концентрації глутатіону (GSH) – низькомолекулярного тіолу, який, функціонуючи як пастка радикалів у поєднанні з глутатіонпероксидазою (GPx) і глутатіонредуктазою (GR), нейтралізує пероксиди та підтримує окисно-відновний баланс клітин. Рівень загального глутатіону, його окисненої та відновленої форм чи їх співвідношення змінюються під впливом різного роду забруднювачів, включаючи засоби побутового вжитку, пестициди та метали. Наприклад, вплив органічних добрив, зокрема Хлороталонілу (0,1 та 10 мкг/л), зменшував концентрацію загального GSH у зябрах *D. rerio* на 7 день експозиції (da Silva Barreto, de Melo Tarouco, and da Rosa 2020). Дія 0,1, 2 та 4 мг/л кадмію викликала зниження вмісту GSH (до 65 %) в печінці *Carassius auratus gibelio* (Wang et al. 2020).

Окрім цього, для оцінки окисного стресу застосовується визначення активності антиоксидантних ферментів, таких як супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ) та глутатіонпероксидаза (Leomanni et al. 2015; Regoli and Giuliani 2014). Ця група ферментів захищає організм від високотоксичних радикалів (O_2^- , H_2O_2 , HO^\cdot) і володіє високою чутливістю до впливу забруднюючих речовин у водних екосистемах на ранніх стадіях пошкоджуючого впливу та при низьких концентраціях. Зокрема, при дослідженні впливу диклофенаку (500 мкг/л) на ембріони *D. rerio*, активність КАТ та GPx зростала вже через 96 годин після початку експозицій (Bіo and Nunes 2020). Інкубування клітин лімфоцитів коропа в

присутності 1, 5 та 10 нМ бісфенолу А протягом 24 годин викликало інгібування активності СОД, КАТ та GPx на фоні накопичення активних форм нітрогену та малонового діальдегіду, що свідчить про швидкий розвиток окисного стресу навіть при впливі гранично низьких доз токсикантів (Liu et al. 2020). Проте, оскільки реакція ферментів на токсичні хімічні речовини змінюється за функцією Гауса (симетрична крива у формі дзвону, що швидко спадає до 0 на обох кінцях), то для правильного інтерпретування одержаних результатів такі аналізи слід застосовувати у поєднанні з іншими біомаркерами (Viarengo et al. 2007).

Варто зазначити, що зміна показників окисного стресу може служити біомаркерами не лише для моніторингу та оцінки хімічного забруднення, а й для виявлення впливів чужорідних видів у морському середовищі (Terlizzi et al. 2011). Наприклад, зелена водорість Морський виноград (*Caulerpa racemosa*), яка не відноситься до аборигенних видів Середземного моря, через активне розростання на нових територіях може змінювати кормову звичку місцевого виду сарга *Diplodus sargus* (до 86% від спожитих продуктів). Каулерпін, який внаслідок цього накопичувався в тканинах риб, викликав активацію антиоксидантних ферментів (КАТ, GPx, GST) та зростання вмісту загального глутатіону (Terlizzi et al. 2011; Feline et al. 2012). Це підтверджує необхідність використання мультимаркерного підходу для одержання об'єктивної інформації про стан водойм.

Біомаркери генотоксичності відображають зміни структури ДНК за впливу ксенобіотиків, що в майбутньому може відобразитися на біорізноманітті, репродуктивному статусі, чисельності та виживанні популяцій. Прояви генотоксичності найбільш часто оцінюють за визначенням хромосомних мутацій, ДНК-аддуктів та розривів ланцюгів ДНК (Monserat et al. 2007). Для визначення хромосомних мутацій використовують мікроядерний тест. Передумовами виникнення мікроядер є руйнування хроматину та дестабілізація веретена поділу внаслідок впливу токсикантів (Maria G. Lionetto, Caricato, and Giordano 2019). У риб для підрахунку ядерних аномалій використовуються різні типи тканин – зябра,

нирки, клітини печінки чи плавники – проте найрозповсюдженішою практикою є використання еритроцитів (Arkhipchuk and Garanko 2005). Зокрема, таким чином було досліджено хронічний вплив субтоксичних доз (0,037, 0,37 та 3,7 мг/л) інсектициду ціантраніліпролу на тиляпію мозамбійську (*Oreochromis mossambicus*). Одержані результати показали, що на 28 день експерименту кількість еритроцитів з мікроядрами у дослідних групах зросла на 69, 84 і 92 % відповідно (Xu et al. 2020). Мікроядерний тест також може застосовуватися при оцінці впливу металів (Fe (1,3 мг/л), Mn (0,43 мг/л) та їх суміш викликали збільшення числа клітин з мікроядрами у периферичній крові *D. rerio* в 2-3,5 рази) чи промислових стоків (кількість еритроцитів з ядерними аномаліями у *Carassius auratus* зростала у 1,2-2 рази) (Samanta et al. 2018; Marins et al. 2019). Збільшення кількості мікроядер у зябрах сарга з локацій, де спостерігається активне поширення *C. racemosa*, свідчить про можливість застосування біомаркерів генотоксичності також при вивченні ефектів біологічних взаємовпливів (Felline et al. 2012).

Більш раннє інформування про генотоксичні ефекти може забезпечити визначення розривів ланцюгів ДНК. Найчастіше такі ушкодження виявляються за допомогою методу ДНК-комет (Comet assay) чи з використанням флуоресцентних барвників (Bolognesi and Cirillo 2014). Протягом останніх років показники генотоксичності все частіше використовуються у вивченні токсичних ефектів залишків фармацевтичних препаратів (Penha et al. 2021), поліциклічних ароматичних вуглеводнів (Huang et al. 2018), пестицидів (Pandey, Nagpure, and Trivedi 2018), промислових стоків (Derikvandy et al. 2020) та при проведенні польових досліджень (Francisco et al. 2019; Asllani et al. 2019). Проте інформація про вплив ціанотоксинів на цей тип біомаркерів залишається обмеженою.

Біомаркери ефекту включають параметри, зміни яких можуть бути пов'язані з впливом на організм певного класу забруднюючих речовин. До таких біомаркерів можна віднести визначення вмісту металотіонеїнів і вітелогеніну, активності цитохром Р450-залежних монооксигеназ, ацетилхолінестерази та ін.

Металотіонеїни (МТ) – багаті цистеїном металовмісні протеїни, які беруть участь у детоксикації та гомеостазі. Вміст металотіонеїнів у моллюсків та риб прямопропорційно залежить від концентрації у середовищі ртуті, кадмію (Viarengo, Burlando, Dondero, et al. 1999; Macirella et al. 2016), цинку (Krežel and Maret 2017) та купруму (Calvo, Jung, and Meloni 2017), що дозволяє використовувати даний показник для ідентифікації забруднення природних водойм металами. Доречність використання МТ для встановлення впливів металів на організм була доведена не тільки у природних (Banday, Swaleh, and Usmani 2020; Delahaut et al. 2019), а й у лабораторних умовах (Kodzhahinchev et al. 2021; Sauliūtė, Markuckas, and Stankevičiūtė 2020). Окрім того, МТ можуть індукуватися не тільки металами, але й органічними ароматичними сполуками та, завдяки своїй здатності знешкоджувати АФО, виступати як частина системи антиоксидантного захисту, що свідчить про неоднозначність цього параметру як показника рівня забруднення металами (Wu, Shu, and Liu 2016; Viarengo et al. 2007).

Активність цитохром Р450-залежних монооксигеназ хребетних тварин відіграє вирішальну роль у метаболізмі численних ендогенних та екзогенних сполук і використовується для ідентифікації забруднення водного середовища поліциклічними органічними вуглеводнями. Підвищена активність цитохром Р450-монооксигенази (СYP1А) та пов'язаної з нею 7-етоксиресорусифін-О-деетилази (ЕРОД) у риб є поширеним біологічним маркером забруднення навколишнього середовища нафтовими вуглеводнями, промисловими та міськими каналізаційними стоками (Sen et al. 2010). Прикладом цього може бути коливання вмісту СYP1А (0,17–1,7 у.о.) та активності ЕРОД (4,1–46,4 пмоль/хв/мг) в печінці райдужної форелі після 14 днів перебування у водоймах з різним ступенем забруднення поліхлорованим біфенілом (Brammell et al. 2010). У зябрах *D. rerio* рівень експресії мРНК *CYP1A1* зростав у 2,85, 26 та 152 рази після 72 год впливу 0,44, 1,07 та 7,6 мг/л бензопірену (Kodzhahinchev et al. 2021). Чутливість цього маркера підтверджується прикладом *Gambusia affinis*,

в якій активація мРНК *CYP1A* зростала при впливі бензопірену вже за концентрації 1 мкг/л (Xie et al. 2020).

Вітелогенін (ВтГ) – це гліколіпофосфопротеїн, який є попередником яєчного жовтка (необхідного запасу поживних речовин для ембріонального розвитку та ранніх стадій росту личинок). Зазвичай ВтГ міститься лише в крові або гемолімфі самок, і тому збільшення його рівня та/або експресії у самців часто використовують як показник ендокринних розладів. Зокрема, виявлення цього індукованого естрогенами протеїну (від 38 до $1,5 \times 10^8$ нг/мл) у плазмі крові самців риб *Abramis brama* було успішно застосовано для ідентифікації впливу ксеноестрогенів у річці Аа (Маас) та водно-болотній місцевості Брабанце Бісбош (Нідерланди) (Houtman et al. 2007). Для оцінки вмісту естрогену у морському середовищі розроблено протокол імуоферментного аналізу визначення вітелогеніну у хвостовому плавнику камбали (*Paralichthys olivaceus*) у діапазоні 1,95-250 нг/мл (Zhang et al. 2019). Протягом останніх кількох років проведено ряд досліджень, направлених на вивчення цього показника у самок. Зокрема на моделях *D. rerio* було проілюстровано зниження ВтГ у плазмі крові під дією фенантрону (0,2, 1,0 та 5,0 мкг/л) майже у 5 разів та його зростання в 2,5-3 рази при впливі 0,1 або 50 мкг/л мікроцистину-LR (Peng et al. 2019; Kawan et al. 2019). Це підтверджує негативні наслідки впливу полютантів на розмноження та розвиток риб, (що, в кінцевому підсумку, може спричинити зменшення їх популяції), та необхідність подальших досліджень у цьому напрямку.

Холінестераза (ХЕ) протягом тривалого часу розглядалася як специфічний біомаркер впливу фосфорорганічних та карбаматних пестицидів (Lionetto et al. 2004). Проте в останні роки дедалі частіше повідомляється про зміну її активності під впливом ряду інших сполук, включаючи метали, поліциклічні ароматичні вуглеводні, гербіциди, засоби особистого вжитку, ціанотоксини, а також температурні чинники (Marins et al. 2019; Aswani and Trabucco 2019; Hinojosa et al. 2019; Takser et al. 2016; Wejnerowski et al. 2020). Це ставить під

сумнів використання ХЕ як специфічного біомаркера та підвищує увагу і зацікавленість до застосування його як показника загальної нейротоксичності.

Згідно з класифікацією (Monserrat et al. 2007), яка базується на спорідненості забруднювача до викликаного ефекту, біомаркери поділяються на дві групи – специфічні та неспецифічні. Для *специфічних біомаркерів* характерною є реакція тільки на конкретний пошкоджуючий чинник. Типовим прикладом таких біомаркерів є інгібування плюмбумом активності дегідратази δ-амінолевулінової кислоти (Gonick 2011). Зокрема, дослідження субхронічного впливу (30-60 днів експозиції) плюмбуму на *Carassius auratus gibelio* показало оберненопропорційну залежність між концентраціями діючої речовини (0, 0,05, 0,5 і 1 мг/л) та активністю дегідратази δ-амінолевулінової кислоти у сироватці крові (Yin et al. 2018).

Показники, які можуть змінюватися під впливом як органічних, так і неорганічних поллютантів, є прикладами *неспецифічних біомаркерів*. До цієї групи можна віднести визначення параметрів окисного стресу та генотоксичності (Regoli and Giuliani 2014), які було розглянуто вище.

Протягом останніх років для розробки потенційних біомаркерів оцінки екологічних ризиків почали застосовувати молекулярні методи, такі як геноміку, протеоміку та метаболоміку (Lionetto, Caricato, and Giordano 2019, Schettino et al. 2012). Оскільки у відповідь на вплив забруднюючих речовин організм реагує на різних рівнях, включаючи зміну експресії генів, рівня протеїнів та концентрацій метаболітів, зміна конкретного набору цих показників відображає механізм дії забруднювача та забезпечує його ідентифікацію.

Геномний біомаркер забруднення – це вимірювана характеристика експресії і регуляції ДНК та/або РНК, яка є показником реакції на вплив поллютантів. Визначення активності масиву генів за допомогою ДНК-біочипів та їх подальший статистичний аналіз забезпечують ідентифікацію специфічних

до певного токсиканта моделей експресії генів, які надалі використовуються як молекулярні біомаркери (Bhandari and Lynes 2019)

Імплементації цього методу в токсикологію водних ресурсів сприяло секвенування геномів для ряду ключових видів. Перші екотоксикологічні дослідження з використанням методів геноміки проводилися на рибах та молюсках. Зокрема експресія ДНК європейської камбали (*Platichthys lesus*) була використана для виявлення реакцій на забруднення лиманів Тайн та Альде у Великобританії (Williams et al. 2003; Bhandari and Lynes 2019). У ході дослідження було виявлено 11 розшифровок, які значимо відрізнялися залежно від локації, і, відповідно, типів полютантів. З застосуванням мікрочипу комплементарної ДНК високої щільності було встановлено специфічну реакцію мальків райдужної форелі на сублетальні концентрації β -нафтофлавону, кадмію, тетрахлориду карбону та пірену, яка проявлялася в посиленні експресії мітохондріальних протеїнів та генів, які беруть участь у метаболізмі іонів металів та біосинтезі макромолекул. Розроблено алгоритм ідентифікації забруднення вод поліциклічними ароматичними вуглеводнями та поліхлорованими біфенілами з використанням 13 (HPAH, LPAH, RCB та ін.) генів *Mytilus edulis* (Blalock, Robinson, and Poynton 2020).

Застосування методів **протеоміки** у біоіндикації базується на аналізі протеому організму з метою виявлення змін пептидів у відповідь на стресові фактори навколишнього середовища (Cristobal 2008; Sanchez, Ralston-Hooper, and Sepúlveda 2011; Campos et al. 2012). Цим методикам приділяється все більша увага через їх потенціал у розкритті нових механізмів токсичної дії забруднювачів та пошуку біомаркерів ефекту та експозиції (Wilson-Frank 2019). Найпоширенішими об'єктами для протемічних досліджень є молюски (Apraiz, Mi, and Cristobal 2006; Shah and Damare 2019; Sánchez-Marín et al. 2021) та риби (McCuaig, Martyniuk, and Marlatt 2020; Xiang et al. 2020; Lee et al. 2018). Зокрема, за допомогою методів протеоміки було продемонстровано дефіцит енергії через втрату глікогену в гепатоцитах та високу експресію

рибосомальних білків, яка, зазвичай, пов'язана з появою пухлин, у *D. rerio* після 96 год. експозиції в присутності здатних продукувати мікроцистини штамів *Microcystis aeruginosa* (Du et al. 2019).

Метаболоміка оцінює зміни в профілях метаболітів організму, які виникають під впливом стресових факторів навколишнього середовища (Sogin et al. 2019). Особливістю даного підходу є можливість одночасного якісного і кількісного аналізу великого числа біомолекул в досліджуваному зразку. Переважно такі дослідження проводяться з використанням мікроорганізмів (Briand et al. 2018; Longnecker and Kujawinski 2020) та молюсків (Dumas et al. 2020; Serra-Compte et al. 2019).

Кількість впливів, які можуть чинитися на живі організми, є значною, а їх комбінації – складні та багатогранні, тому в оцінці якості середовища рекомендується використовувати мультимаркерний підхід, який дозволяє отримати результати, що будуть враховувати внесок різних джерел стресових чинників та шляхів їх дії. Вибір найбільш релевантних біомаркерів повинен базуватися на наступних критеріях: чутливість показника та його здатність реагувати на забруднювач залежно від концентрацій в екологічно реалістичному діапазоні; кореляція з тривалістю експозиції; врахування природної мінливості (Parmar, Rawtani, and Agrawal 2016; Estévez, Vilanova, and Sogorb 2019).

Незважаючи на інформативність та перспективність вищеописаних методів, в Україні ці підходи реалізуються не дуже активно. Якщо відсутність практики застосування геноміки, протеоміки та метаболоміки у дослідженнях забруднення водойм можна пояснити відносною новизною методів та необхідністю використання високоспеціалізованого і дорогавартісного обладнання, то біомаркерний підхід має широкі нереалізовані перспективи.

Наявні дослідження представлені переважно роботами колективу НДЛ Порівняльної біохімії і молекулярної біології ТНПУ ім. В. Гнатюка (Stolyar et al. 2008; Gnatyshyna et al. 2020; Khoma et al. 2021a) та стосуються біоіндикації

стану довкілля за допомогою визначення реакцій молекулярних біомаркерів стресу і токсичності на специфічні види забруднення та розробки діагностичних критеріїв для оцінки сприятливості умов існування для гідробіонтів. Автори Хоменчук В. О., Ляврін Б. З., Курант В. З. пропонують в своїх роботах використання як індикатора забруднення водою морфометричних показників деяких видів риб (*Cyprinus carpio* L., *Esox lucius* L., *Carassius auratus gibelio* Bloch. та *Perca fluviatilis* L.) (Хоменчук, Ляврін та Курант 2020). Вивченням змін морфологічних та цитогенетичних характеристик гомеостазу риб під дією поллютантів займаються науковці Київського національного університету імені Тараса Шевченка (Гандзюра, Томищ, та Корево 2015; Гандзюра та ін. 2017) та Національного університету водного господарства та природокористування, м. Рівне (Клименко, Пулупенко, and Biedunkova 2016; Клименко та Бедункова 2017). Біотестування стану морського довкілля висвітлено в роботах Красоти Л. Л. (Красота 2015), Рачинської О. В. (Рачинська 2017), Руднеєвої І. І. (Руднева Ирина и др. 2011). Використання водних (*Lemna minor*) і наземних (*Spinacea olearacea* L) рослин, як біомаркерів важких металів, пропонують у своїх працях Т. В. Андрусин та М. В. Водка (Андрусин, Костюк и Грубинко 2015; Vodka 2017).

Це свідчить про необхідність розвитку біомаркерного підходу як способу раннього інформування про стан водних екосистем.

1.2 Нові підходи до оцінки впливу ціанобактерій на водні екосистеми

Незважаючи на те, що ціанобактерії – найбільша та наймасштабніша за впливом на біосферу група живих організмів на Землі – традиційно розглядаються як невідомна частина екосистем, дослідження біологічної та біохімічної активності їх метаболітів тільки починається. За умов підвищеного вмісту фосфатів та/або нітратів у середовищі – в евтрофікованих водоймах – ціанобактерії, насамперед *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Planktothrix* та *Trichodesmium*, можуть утворювати щільні скупчення – **цвітіння**. У

свою чергу, цвітіння водойм негативно впливає на якість води (Paerl and Otten 2013), зокрема збільшує каламутність та знижує вміст розчиненого кисню, необхідного для життєзабезпечення рослинного та тваринного світу (Scheffer et al. 1993). Тривале кисневе голодування, у тому числі гіпоксія та аноксія, зумовлює масові замори риби та донних безхребетних (Rabalais et al. 2010). Окрім цього біоактивні метаболіти, які продукуються ціанобактеріями, знижують рекреаційні функції озер і їх потенціал як ресурсів питної води (Jüttner and Watson 2007) та, потрапляючи в живі організми (напр. риб, птахів, ссавців та людини), спричиняють функціональні розлади печінки, органів травлення, нервової системи тощо (Carmichael 2001; Huisman et al. 2018). Зважаючи на постійно зростаючий антропогенний прес, евтрофікацію та ацидифікацію водойм і глобальне потепління, прогнозують, що частота, інтенсивність та тривалість цвітіння ціанобактерій, а, відтак, і кількість їх активних біометаболітів (напр. ціанотоксинів) у багатьох водних екосистемах по всій земній кулі буде зростати (Wagner and Adrian 2009; Verspagen et al. 2014; Taranu et al. 2015). Зокрема доведено, що кількість ціанобактеріальних пігментів в осадових відкладах із понад 100 озер Північної Америки та Європи збільшилася на майже 60 % з часів промислової революції. Також збільшується їх частка й відносно іншого фітопланктону (Taranu et al. 2015). Ця тенденція, ймовірно, збережеться і в наступні десятиліття. Нещодавно було проведено дослідження для прогнозування кількості та якості питної води в США з використанням моделі зміни клімату на основі п'яти моделей як вхідних даних. Методом математичного моделювання, враховуючи фактори глобальної зміни клімату та циркуляції повітряних мас, було доведено, що до 2090 р. в США середня кількість днів із шкідливим цвітінням ціанобактерій збільшиться від 7 днів на рік (середня тривалість у сучасних умовах) до 18–39 днів (Charra et al. 2017). Відтак, тенденція інтенсифікації цвітіння та збільшення кількості ціанобактерій, які продукують токсичні метаболіти, викликає велике занепокоєння, оскільки може мати негативний вплив на біорізноманіття, функціонування та сталий розвиток водних екосистем.

Активізацію процесів цвітіння ціанобактерій та їх економічний і соціальний вплив найкраще можна проілюструвати на деяких репрезентативних прикладах. Одним з них є озеро Тайху – велике мілководне озеро в дельті річки Янцзи в Китаї. Швидке зростання економіки та населення у населених пунктах, прилеглих до басейну Тайху, призвело до істотного забруднення водойми (Qin et al. 2010). Починаючи з 1980-х років в озері почалося цвітіння води, яке на даний час поширилося майже на всю його поверхню у більш ніж 2400 км² (K. Shi et al. 2017). Іншим прикладом може служити криза з питною водою в місті Усі (китайська провінція Цзянсу). В травні 2007 року приблизно 2 мільйони жителів більш ніж на тиждень залишилися без питної води через масове токсичне цвітіння *Microcystis spp.* (Qin et al. 2010; Guo 2007):

Згідно з проведеним аналізом стану природних водних систем України (Мислюк, Хоменко і Єгорова 2021, Грубінко та Скиба 2020), протягом останніх 28 років вміст фосфатів змінювався в діапазоні 0,1-6,8 мг/дм³ (ГДК 3,5 мг/дм³) при переважачому зростанні цього показника протягом останніх 10 років. Велика кількість сполук нітрогену та фосфору та зміна температурного режиму є провідними детермінантами цвітіння води. У 2010 році, коли спостерігалось аномальне сезонне підвищення температури (на 4,3°C влітку), чисельність представників родів *Oscillatoria*, *Microcystis* і *Aphanizomenon* зростала до 43,83—236,98 млн. кл./дм³ (Щербак та Задорожня 2013). На основі аналізу даних з супутників Terra та Aqua встановлено, що в період з 2013 по 2018 роки явища цвітіння води з різною інтенсивністю спостерігалися у всіх дніпровських водосховищах (Вишневський 2019), що сприяє накопиченню у воді мутагенів та токсичних речовин (Ho et al. 2020). У солоних водоймах перше цвітіння, викликане масовим розвитком Нодулярії піноутворюючої (*Nodularia spumigena*) спостерігалось у 2010 році і охоплювало майже 80 % площі північно-західного шельфу Чорного моря. У 2019 році цвітіння води, викликане розвитком нодулярії, поширилося на північно-західний шельф Чорного моря. Однак, у зв'язку із високим рівнем солоності (> ‰), гепатотоксин нодулярин водоростю *Nodularia spumigena*

не продукувався, а відтак ураження тварин відзначене не було (“Державна Екологічна Інспекція України” 2019). В цілому ж, в Україні дослідження з даної тематики переважно спрямовані на вивчення динаміки процесів поширення ціанобактерій та їх видового складу. Дані стосовно впливу таких процесів на водну біоту та людину носять переважно оглядовий характер (Лановенко and Шевченко 2019; Novosiolova and Protasov 2016) і потребують більш детального наукового обґрунтування, особливо у зв’язку з пошуком нових методів регуляції чисельності ціанобактерій та / або продукування ними токсинів.

Цвітіння ціанобактерій порушує екосистеми та спричиняє значні економічні втрати, що перетворює цей процес на глобальну екологічну проблему. Окрім того, деякі види ціанобактерій можуть виробляти шкідливі вторинні метаболіти, серед яких екологічне та суспільне значення мають ціанотоксини. Ціанотоксини класифікуються як гепатотоксини (мікроцистин та нодулярин), цитотоксини (циліндроспермопсин), нейротоксини (анатоксин-а, гомоанатоксин-а, анатоксин-а(S), сакситоксин) та дермотоксини (токсин Lyngbya) (Svirčev et al. 2016). У людини ціанотоксини можуть викликати хронічні ураження печінки, нирок та органів травного тракту, пневмонію, дерматити, подразнення очей та алергічні реакції. Особливо небезпечними є їх мутагенний і канцерогенний ефекти (Yang et al. 2021).

Серед токсинів, які можуть продукуватися ціанобактеріями, найрізноманітнішою та найбільш детально описаною групою є **мікроцистини** (MC). На сьогодні відомо двадцять три роди (включаючи *Microcystis*, *Dolichospermum* та *Sphaerospermopsis* (раніше *Anabaena*), *Planktothrix* і *Nostoc*) та, принаймні, 47 видів ціанобактерій, котрі можуть продукувати цей тип токсинів. Серед них найпоширенішим продуцентом вважається *Microcystis aeruginosa* (Beasley 2020). *M. aeruginosa* та інші штами *Microcystis* були ідентифіковані у 108 країнах світу, при цьому їх здатність продукувати токсичні метаболіти спостерігалася у близько 80-ти відсотків випадках (Catherine et al. 2017). Для прикладу, концентрації різних форм мікроцистинів у прісних водоймах Франції, які використовуються як джерело питної води, становили в середньому 550 нг/л (при

максимальному значенні 12,5 мкг/л), в Італії – 2–728 нг/л, у Польщі (оз. Єзьорак) – 1,04 мкг/л, в Китаї (оз. Чаоху) – 0,12–3,22 мкг/л, в США (оз. Вікторія) – 3,3 мкг/л, при максимальному значенні у 100 мкг/л у прибережних водах (Pitois et al. 2018; Zuccarello et al. 2021; Mankiewicz-Boczek et al. 2011; Shang et al. 2018; Simiyu et al. 2018).

За своєю природою мікроцистини – це циклічні гептапептиди, в яких шість амінокислот утворюють кільцеву структуру, а одна (ADDA) – бічний ланцюг. Залишки L-амінокислот у кільці у положеннях 2 та 4 можуть змінюватися, тим самим обумовлюючи існування різних форм мікроцистинів. Так, наприклад, найпоширеніший варіант – мікроцистин-LR (MC-LR) – містить лейцин та аргінін у положеннях 2 та 4 відповідно, мікроцистин-RR (MC-RR) – два залишки аргініну, мікроцистини LW та LF – лейцин у 2 положенні та триптофан або фенілаланін у 4 (Díez-Quijada L et al. 2019; Tanabe et al. 2009). Бічний ланцюг ADDA є консервативним і може бути використаний для кількісної оцінки мікроцистинів, незалежно від їх форми (Harada et al. 1996).

Мікроцистини – стабільні сполуки, період напіврозпаду яких у водному середовищі в середньому становить 10 тижнів. Швидкість розпаду збільшується під прямими сонячними променями, за підвищених температур середовища (40 °C) чи екстремально низьких (<1) або високих (> 9) значеннях рН (Díez-Quijada L et al. 2019).

За типом токсикологічного впливу мікроцистини належать до сильних гепатотоксинів, механізм дії яких пов'язаний з інгібуванням білкових фосфатаз типів 1 і 2A (PP1 і PP2A), які контролюють структуру цитоскелету і апоптоз (Valério et al. 2014). Пригнічення активності фосфатази типу 2A спричиняє численні ультраструктурні зміни в гепатоцитах, включаючи дезорганізацію ендоплазматичного ретикулулу та набрякання мітохондрій (Shi et al. 2021). Зокрема, порівняння дії гострого та субхронічного впливу мікроцистинів, одержаних з екстракту *R. fernandoi* з розрахунком 100 мкг мікроцистинів на 1 кг маси риб *Hoplias malabaricus*, свідчать про ураження печінки в обох випадках. При

цьому найпоширенішими змінами в печінці після гострої (12 та 96 год) інтоксикації були гіпертрофія гепатоцитів і збільшення їх ядер та зростання гіперемії. Під час субхронічного впливу (повторне введення дози у 100 мкг кожні 72 год протягом 30 днів) зразки печінки характеризувалися високим ступенем дезорганізації, зростанням частоти ядерних аномалій та порушенням структури міжклітинних жовчних каналів і колагенових волокон (Paulino et al. 2017; 2020). Аналогічні ефекти описані і на моделях ссавців. Одноразове введення мишам мікроцистину-RR (400 мкг/кг) вже через 6 годин викликало зміну співвідношення маса печінки/маса тіла з 5,7 до 8,8 % та супроводжувалося внутрішніми крововиливами, клітинною гіпертрофією, виснаженням глікогену та некрозом (Rai, Chaturvedi, and Kumar 2018).

Зниження активності білкових фосфатаз сприяє утворенню пухлини. Проведення порівняльних аналізів мікроцистину-LR та ооксаєвої кислоти, яка теж інгібує PP1 та PP2A, свідчить про активність цих сполук як канцерогенів. Субцитотоксичні концентрації MC-LR (5, 10, 50 та 100 мкМ) сприяли експресії пов'язаних з гепатоцелюлярною карциномою онкогенів *c-fos*, *c-jun*, *c-myc*, *c-met* та *N-ras*, одночасно пригнічуючи ген-супресор *PTEN* у клітинах HepG2 (Li et al. 2017; Fujiki and Suganuma 2012; Nishiwaki-Matsushima et al. 1992).

Окрім механізму блокування фосфатаз, мікроцистини можуть провокувати розвиток окисного стресу. Порушення мітохондріального електронно-транспортного ланцюга при дії мікроцистину сприяє генеруванню АФО (Ding, Shen, and Ong 2002), висока концентрація яких може спричиняти ушкодження біомолекул (протеїни, ліпіди, нуклеїнові кислоти) та запуск системи антиоксидантного захисту (активація супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази та глутатіон-S-трансферази (GST)) (Brieger et al. 2012). Варто зазначити, що індукування окисного стресу ціанотоксинами відбувається в організмах незалежно від рівня їх еволюційного розвитку. Зокрема, внутрішньочеревна ін'єкція мікроцистину-LR (150 мкг/кг) у коропа звичайного вже через 48 годин викликала значне підвищення активності каталази (70 %),

супероксиддисмутази (21 %) та глутатіонпероксидази (154 %), а також вмісту глутатіону (84 %) порівняно з контролем (Chen et al. 2017). Хронічний вплив мікроцистинів (0,75-1,05 мкг/л) на їстівну жабу (*Pelophylax esculentus*) оз. Людаш (Сербія) спричиняв середнє зростання рівня GSH і ПОЛ на 28 і 23 % та активації КАТ, СОД і GST на 32, 29 та 36 % відповідно. Варто зазначити, що при тривалій дії токсину активність GPx, яка відіграє вирішальну роль у захисті клітинних мембран, знижувалася приблизно на 30 % у порівнянні з контрольною групою з незабрудненої водойми (Gavrilović et al. 2021). У мишей внутрішньочеревні ін'єкції мікроцистину (40 мкг/кг) викликали кратне зростання активності СОД (у 3,5 та 2,5 рази) та КАТ (у 6 та 4 рази) і збільшення кількості карбонілів (у 4 та 1,3 рази) у тканинах легень та печінки відповідно (Casquilho et al. 2018).

Також мікроцистини спричиняють зміни в імунній (підвищена експресія генів запального компонента імунної відповіді IL-1 β , TNF- α , IFN I та білків теплового шоку (*HSP70*, *HSP90*) у *Cyprinus carpio* після ін'єкції 100 мкг/кг MC-LR) та нервовій (зниження активності XE та рівня дофаміну у *Danio rerio* після 60-ти днів впливу 5 і 25 мкг/л MC-LR) системах і ендокринні порушення (дисфункція щитоподібної залози та підвищення рівня її гормонів у мишей і риб (*Danio rerio*), які піддавалися впливу MC-LR у концентраціях 5 та 20 мкг/кг і 100 та 200 мкг/л відповідно) (Chen et al. 2017; Q. Wu et al. 2017; Zhao et al. 2015; Gao et al. 2020).

У вищеописаних дослідженнях, зазвичай, використовувалися чисті токсини, що дозволяє чітко розмежовувати ефекти, викликані різними їх формами та дозами. Проте в природі подразнюючі чинники не виступають поодинокими факторами, а діють у комплексі, тому важливим є дослідження не лише очищених зразків, а і їх сирих екстрактів, отриманих безпосередньо з культур. Прикладом цього може бути дослідження мікроцистину на ембріональний розвиток коропа (*Cyprinus carpio*), яке показало, що найбільш виражений токсичний ефект спостерігався при дії біомаси та сирого водного екстракту. У цей ж час фракції елюатів зразків, що містили мікроцистини в концентраціях 7, 21, 65 та 260 мкг/л, мали лише слабкі токсичні ефекти чи взагалі їх не виявляли (Palíková et al. 2007). Оскільки

мікроцистини можуть виступати не єдиними токсичними сполуками при взаємодії ціанобактерій та інших організмів, важливим є вивчення впливу всього комплексу діючих чинників.

Циліндроспермопсин (CYN), який продукується кількома прісноводними родами *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Lyngbya*, *Umezakia*, *Raphidiopsis* (раніше *Cylindrospermopsis*), займає друге за поширенням місце серед ціанотоксинів у світі і був ідентифікований у водах Європи, Азії, Океанії та Північної Америки (Yang et al. 2021). Зокрема, концентрація циліндроспермопсину у оз. Монтелеоне (Італія) становила 56,3 мкг/л, оз. Ізнік (Туреччина) – 0,12–4,92 мкг/л, водосховищі Карла – 2,0–7,4 мкг/л, оз. Тайху (Китай) – 36 мкг/л, поверхневих водах Флориди (США) – до 202 мкг/л (Messineo et al. 2009; Аксаалан et al. 2014; Papadimitriou et al. 2018; Marbun et al. 2012; C. D. Williams et al. 2007). Ситуація погіршується тим, що види, здатні продукувати CYN, є переважно інвазійними. При цьому поширення *Raphidiopsis (Cylindrospermopsis) raciborskii* – тропічного виду, який протягом останніх десятиліть поширився в північному помірному поясі, – в помірному та середземноморському кліматі сильно корелює з температурою води. Отже, будь-яке майбутнє підвищення температури поверхневих вод, призводитиме до збільшення чисельності популяцій *R. raciborskii* зокрема та популяцій *Nostocales* загалом, що становить значну загрозу для автохорних видів (Recknagel et al. 2019).

За хімічною природою циліндроспермопсин – поліциклічний алкалоїд, який складається із гідроксиметилурацилу, позитивно зарядженого гуанідинового компонента та негативно зарядженої сульфатної групи. На сьогодні відомо чотири природні аналоги CYN, а саме 7-епі-CYN, 7-дезоксиде-7-дезоксиде-CYN (відсутність гідроксильної групи на C7), 7-дезоксиде-7-дезоксиде-7-дезоксиде-CYN (відсутність гідроксильної групи C7 і гідроксил на місці сульфатної групи на C12) та 7-дезоксиде-7-дезоксиде-12-ацетил-CYN (відсутність гідроксильної групи C7 та ацетатна група замість сульфатної на C12) (Wimmer, Strangman, and Wright 2014).

Циліндроспермопсини – це добре розчинні у воді сполуки, стійкі до впливу високих температур, сонячних променів та екстремальних значень рН. На відміну від мікроцистинів, вони часто секретуються з ціанобактеріальних клітин у водне середовище (Rücker et al. 2007), де мають здатність біоакумулюватися в тканинах гідробіонтів з подальшим переміщенням ввєрх по ланцюгах живлення (Scarlett et al. 2020). Безпечною дозою CYN у питній воді вважається 1 мкг/л, проте, на відміну від мікроцистину, цей стандарт не затверджений ВООЗ і може відрізнятисє в різних країнах (Yang et al. 2021).

Перший та наймасштабніший випадок отруєння циліндроспермопсином (148 осіб) трапився у 1979 році біля водосховища на острові Палм, штат Квінслєнд, Австралія. З метою протидії процесам цвітіння, викликаним *R. raciborskii*, водойма була оброблена мідним купоросом, що спричинило лізис клітин і викид у воду токсичних метаболітів. Людей, які мешкали поблизу, госпіталізували з важким гастроентеритом, ураженнями печінки та нирок. Супутніми симптомами були геморагічна діарея, блювота, лихоманка, гепатомегалія, дегідратація, електролітний дисбаланс, ацидоз та гіповолемічний шок (Bourke et al. 1983). Внутрішньочеревне введення ін'єкцій екстрактів з *R. raciborskii*, зібраних з водойми, викликали аналогічні пошкодження печінки та нирок у мишей (Griffiths and Saker 2003).

На сьогодні переважна більшість інформації стосовно токсичності циліндроспермопсину отримана з використанням мишей як дослідних організмів через зручність екстраполяції таких даних на людину. Проте в останні роки зростає частота досліджень на водних організмах, оскільки саме вони першими потрапляють під дію CYN і можуть піддаватися його хронічним впливам.

Раніше припускали, що основною тканиною-мішенню очищеного циліндроспермопсину є печінка. Саме в ній накопичувалося 20,6 % (в нирках 4,3 %) ¹⁴C-міченого CYN через 6 годин після введення (Norris et al. 2001). Проте останнім часом було показано, що найбільш чутливою мішенню є нирки. Дія токсину викликає нефрит, некроз клітин епітелію, розширення ниркових каналців

та відкладення в них глікогену і білків. Гістопатологічні зміни спостерігалися при субхронічному оральному впливі (від 75 до 300 мкг/кг/день протягом 90 днів) при дії навіть найнижчих концентрацій і були більш чітко виражені у мишей-самців (Chernoff et al. 2018). Аналогічні патологічні зміни за впливу циліндроспермосину спостерігаються і у прісноводних риб: одноразова пероральна доза (400 мкг/кг) СУН спричиняла дезорганізацію паренхіми, накопичення глікогену і ліпідів у печінці, гломерулонефрит та розширення каналців у нирках, набряки та крововиливи у серці і зябрах у тилapia (*Oreochromis Niloticus*) (Guzmán-Guillén et al. 2014). При внутрішньочеревному введенні 50 мкг/кг СУН *Hoplias malabaricus* відзначалися біохімічні й морфологічні відхилення в печінці та мозку (da Silva et al. 2018).

Основним механізмом цитотоксичності циліндроспермопсину є інгібування синтезу протеїнів. Зокрема, дослідження на первинних мишачих гепатоцитах показало незворотнє пригнічення їх продукування на 74-88 % після 4-годинної обробки 0,5–5 мкМ СУН та загибель 52-82% клітин протягом 18 год впливу (Froschio et al. 2003; Scarlett et al. 2020). У фагоцитарних клітинах *Cyprinus carpio* прояви цитотоксичності (вивільнення лактатдегідрогенази, зниження фагоцитарної активності та зміна цитоскелетних структур) спостерігалися після 24 годин впливу 0,5 та 1 мкг/мл СУН (Sieroslawska, Rymuszka, and Adaszek 2015).

Також СУН провокує збільшення АФО, паралельно пригнічуючи активність антиоксидантних ферментів, що посилює внутрішньоклітинний окисний стрес і спричиняє ПОЛ, пошкодження ДНК та апоптоз в молюсків, ракоподібних та риб (Scarlett et al. 2020). Зокрема, у лімфоцитах крові людини, які оброблялися циліндроспермопсином (0,1 та 1,0 мкг/л) на 14,5 і 20,0 % зросло продукування АФО та активність СОД, КАТ та GPx на 45,5, 23,1 і 38,0 % відповідно при дії вищої концентрації (Poniedziałek et al. 2015). Аналогічні реакції спостерігається і у риб – через 14 днів після одноразового введення СУН (50 мкг/кг) у печінці *Hoplias malabaricus* зростала активність СОД (37 %) і GST (20 %) та вміст ПОЛ (85 %) у порівнянні з контрольною групою (da Silva et al. 2018). Іншим прикладом може

бути зростання продукування активних форм кисню (76-100 %) та нітрогену (91–114 %) в клітинах коропа (*in vitro*) під дією 0,5 та 1 мкг/мл CYN (Sieroslawska, Rymuszka, and Adaszek 2015).

Протягом останніх років почала надходити інформація стосовно нейротоксичних та імуномодулюючих ефектів циліндроспермопсину, а також його тератогенний ефект. Нейротоксичність CYN, ймовірно, пов'язана з дезорганізацією цитоскелета, окисним стресом та зміною активності ацетилхолінестерази. Зокрема обробка циліндроспермопсином (10 мкМ) та сумішшю ціанотоксинів (циліндроспермопсин, мікроцистин, анатоксин-а) викликала апоптоз та запалення у клітинах мікроглії (BV-2) та нейробластоми (N2a) мишей та зростання активності ХЕ (44 %) у мозку *Hoplias malabaricus* (50 мкг/кг, *in vivo*) (Hinojosa et al. 2019; Takser et al. 2016; da Silva et al. 2018). Імуномодулююча дія CYN (1мкМ) проявляється як здатність підвищувати продукування протизапальних медіаторів (NO, TNF- α , IL-6) у макрофагах мишей (RAW 264,7) (Moosova et al. 2019). Тератогенність CYN (0,02, 0,2 та 2 мкМ) була продемонстрована на ембріонах даніо і проявлялася зниженням рівня виживання ембріонів і швидкості їх вилуплення та відхиленнями в морфології (набряк перикарда, викривлення хребта, серцеві та судинні дефекти) (Wang et al. 2020).

Універсальність реакції у тварин різних екологічних та еволюційних груп свідчить про перспективність використання водної біоти (зокрема, риб) у дослідженні токсичності циліндроспермопсину та його аналогів. Це сприятиме розумінню механізмів впливу CYN та його ролі в екосистемах.

Анатоксин-а (АТХ-а) це потужний нейротоксин, який зустрічається у прісних водоймах по всьому світі й продукується кількома родами ціанобактерій, включаючи *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Raphidiopsis*, *Arthrospira*, *Cylindrospermum*, *Phormidium*, *Nostoc* та *Oscillatoria* (Colas et al. 2021). Інтوکсикація відбувається переважно через споживання забрудненої питної води,

але також може виникати внаслідок рекреаційного використання водойм та через забруднені дієтичні добавки (Osswald et al. 2007).

За хімічною природою анатоксин-а (2-ацетил-9-азабіцикло-[4,2,1]нон-2-ен) – це біциклічний амінний алкалоїд, для якого властива хіральна симетрія з двома центрами. Анатоксин-а – водорозчинна сполука, стабільна у підкислених (рН=3) умовах, але розкладається в лужному середовищі. Період її напіврозпаду при наявності світла та рН 8–9 становить 1–2 год (Merel et al. 2013), у водоймах при типових значеннях рН – 5 днів (James, Smith, and Sutton 1993). Особливістю АТХ-а є його сприйнятливості до мікробіологічної біодеградації (Wonnacott and Gallagher 2006). З *Oscillatoria formosa* був виділений структурний аналог, який називається гомоанатоксин-а або метилен-анатоксин-а (Skulberg et al. 1992). Також невеликі кількості анатоксину-а синтезують в лабораторних умовах для використання в дослідженнях рецепторів ацетилхоліну.

Анатоксин-а називають Фактором дуже швидкої смерті («Very Fast Death Factor») через його практично миттєвий летальний ефект протягом кількох (2-7) хвилин. Летальна доза (LD₉₀) значно відрізняється як між різними екологічними групами, так і в межах одного таксону і становить 1800 мг/кг для мишей, 1500 мг/кг – щурів, 850 мг/кг – фазанів, 350 мг/кг – качки-крякви, 120 мг/кг – золотих рибок (Carmichael and Biggs 1978). Така неоднорідність може пояснитися тим фактом, що певні види здатні природним чином акумулювати АТХ-а, не включаючи його в подальший метаболізм. Ця особливість потребує детальнішого вивчення через потенційну можливість передачі анатоксину-а у харчових ланцюгах (Colas et al. 2021). Наслідки отруєння можуть проявлятися протягом декількох хвилин або годин після інтоксикації і включають втрату координації м'язів, м'язовий тремор, фасцикуляції, судоми та дихальні розлади. Головною причиною летального ефекту є дихальна недостатність після втрати контролю над дихальними м'язами (Osswald et al. 2007).

Проте варто зазначити, що дослідження впливу концентрації анатоксину-а, які характерні для природних умов (0,01, 0,1, 1 та 10 мг/л) на лімфоцити *Carassius*

auratus (*in vitro*) продемонструвало активацію процесів апоптозу у 18,89, 22,89, 39,23 та 35,58 % клітин відповідно через 12 год. інкубування. Це супроводжувалося зниженням активності СОД, КАТ, GR та GPx на 41, 46, 67 та 54 % на фоні збільшення продукування активних форм кисню та малонового діальдегіду при впливі найвищої з досліджуваних концентрацій (Zhong et al. 2020).

Наведені дані свідчать про здатність анатоксину-а, окрім нейротоксичності, викликати окисний стрес та індукувати апоптоз, що є додатковим ризиком для здоров'я водних організмів і потребує подальшого вивчення.

Незважаючи на наявність великої кількості інформації щодо впливів ціанотоксинів (особливо мікроцистину) на різні групи організмів, підбір біомаркерів та їх інтерпретація продовжує залишатися одним з актуальних для вивчення питань. Частково це пов'язано з тим, що механізми дії деяких з них (анатоксин-а) не призводять до значних біохімічних порушень. Також важливим є той факт, що природний вплив ціанотоксинів, як екстрактів водоростей, окрім власне токсинів, включає складні суміші багатьох біологічно активних сполук, токсичність комбінацій яких важко передбачити через їх динамічний склад. Без чітко задокументованих протоколів ефектів таких сумішей, теоретична основа для прогнозування токсичності їх впливу та підбір відповідних біомаркерів є практично неможливими.

Для більш повного з'ясування реального впливу ціанобактерій та їх метаболітів на водну біоту необхідним є продовження досліджень з використанням організмів різних еволюційних рівнів, що забезпечить накопичення необхідної бази даних для виокремлення основних механізмів дії токсиновмісних природних комплексів. На основі цього можуть бути розроблені нові методики для визначення показників стану водного середовища, які дозволять об'єктивніше оцінювати екологічні умови для певних водних об'єктів, виявляти основні водогосподарські проблеми та визначати оптимальні напрямки природокористування.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкти дослідження та постановка експерименту

Робота виконувалася у 5 етапів:

1. Фізико-хімічний аналіз води та визначення фітопланктону у водоймах, що прилягають до гідроелектро- та атомної електростанцій Західної України.
2. Порівняння показників фізіологічних і біохімічних маркерів стресу, ефекту та токсичності у коропових риб (*Carassius auratus gibelio*) із зарегульованої водойми гідроелектростанції та контрольної ділянки за впливу метаболітів ціанобактерій.
3. Оцінка впливу вторинних токсичних метаболітів ціанобактерій ряду *Nostocales*, виділених із водойм, що прилягають до Касперівської ГЕС, з використанням ізольованих клітин *Cyprinus carpio* в умовах *in vitro*.
4. Встановлення особливостей токсичної дії циліндроспермопсину з використанням його синтетичних аналогів на ізольованих клітинах *Cyprinus carpio* в умовах *in vitro*.
5. Визначення вмісту поліметоксиалкенів в комерційних харчових добавках на основі хлорели та спіруліни, виготовлених у різних країнах (Китай, Тайвань, Індія та ін.) та оцінка токсичності виділених з них ліпофільних фракцій за реакціями молекулярних маркерів *Danio rerio*.

2.1.1 Місця відбору зразків для дослідження

Зразки води для досліджень відбиралися протягом серпня та вересня 2017 р. відповідно до рекомендацій організації охорони оточуючого середовища США (Era and Response Team). Проби відбирали в трьох ділянках Тернопільської та Хмельницької областей у пропіленові пляшки і транспортували до лабораторії для визначення фізико-хімічних параметрів води та аналізу фітопланктону (рис 2.1). Касперівська гідроелектростанція належить до невеликих електростанцій з встановленою потужністю 7,5 МВт та розташована поблизу русла річки Серет



Рис. 2.1: Місця відбору проб у Західній Україні: **a (KR)** – Касперівське водосховище вище дамби; **b (SR)** – річка Серет нижче дамби Касперівської ГЕС; **c (NR)** – став-охолоджувач Хмельницької АЕС.

(48°40 N, 25°51 E). Вода з Касперівського водосховища (ділянка **KR**), що проходить через турбіну ГЕС, скидається безпосередньо в річку Серет (**SR**). Касперівське водосховище (площа 2,86 км² та довжина – 12 км) є зоною відпочинку та частиною території Національного природного парку "Дністровський каньйон". Касперівці розташовані в регіоні з інтенсивною сільськогосподарською діяльністю, що передбачає потрапляння добрив та гербіцидів з стоками з полів у водойми. Також поблизу розташована піщана шахта та гіпсові печери (48°48 / N, 25°35 / E). Третьою точкою відбору (**NR**) було Нетішинське водосховище – ставок-охолоджувач Хмельницької атомної електростанції (ХАЕС) (м. Нетішин, лісовий район притоки річки Горинь, 50°21 / N, 26°38 / E), який характеризується стабільно підвищеною температурою. Об'єкти відносяться до різних річкових басейнів і знаходяться на відстані близько 300 км один від одного.

Дослідження зразків води тривало протягом місяця. В якості консерванта використовувався розчин Люголя. Якісний та кількісний аналіз фітопланктону

проводили в камері Sedgwick-Rafter об'ємом 0,5 мл з використанням світлового мікроскопа Olympus BX60 відповідно до стандартних методів (Wetzel and Likens 2000). Види фітопланктону ідентифікували на основі мікроскопічного аналізу та встановлення морфологічних особливостей трихом.

2.1.2 Дослідні групи тварин

Carassius auratus gibelio

Дослідження фізіолого-біохімічних показників риб в умовах комбінованого навантаження функціонування малопотужної ГЕС та впливу метаболітів ціанобактерій проводили на дворічних чоловічих особинах карася сріблястого (*Carassius auratus gibelio*), відібраних з Касперівського водосховища нижче (**SR**) та вище дамби (**KR**). В якості контролю (**C**) використовувалися риби з рибного господарства поблизу смт Заліщики (Тернопільська обл.). Відбір тварин здійснювали в вересні 2017 р. Транспортування в лабораторію відбувалося у резервуарах об'ємом 80 л з аерованою нативною водою (концентрація розчиненого кисню становила $8,67 \pm 0,51$ мг/л). Контрольна та дослідні групи склалися з 15 осіб *Carassius auratus gibelio* з стандартною довжиною тіла (l) 22 ± 3 см та масою 296 ± 31 г. Відбір тканин здійснювали протягом доби після забору дослідних об'єктів. Тварин умертвляли, вимірювали (до мм) і зважували (до мг). На підставі зроблених вимірів обчислювали наступні морфометричні показники: Кондиційний фактор (КФ) як співвідношення $КФ = ((\text{маса тіла, г})/(\text{довжина тіла, см})) \times 100$, Соматичний індекс (СІ) травних тканин та зябер як співвідношення $СІ = ((\text{маса обсушеної тканини, г})/(\text{маса тіла, г})) \times 100$.

Експерименти проводились відповідно до національних та інституційних вказівок щодо захисту тварин та відповідно до рішення Комітету з біоетики Тернопільського національного педагогічного університету (№ 2 від 10 червня

2017 р.).

Danio rerio

Дослідження проводились на дорослих особинах даніо АВ-дикого типу, родина Коропових, яких доставляли в лабораторію від комерційного об'єднання «Зоосвіт». Тварин аклімували до лабораторних умов протягом 7 діб. Експериментальні умови створювали у акваріумах об'ємом 5 л з кількістю риб з розрахунку 6 особин на 1 л води згідно загальноприйнятої схеми токсикологічного експерименту. Вміст кисню у воді підтримували на рівні 7,0 – 8,0 мг/л, вуглекислого газу – 2,2–2,8 мг/л, рН – 7,6–8,0. Воду відстоювали і змінювали через кожні дві доби, поновлюючи в експериментальних групах вміст досліджуваної сполуки у воді. Температура води становила $18 \pm 0,5$ °С. Тварин годували подрібненим комерційним кормом Акваріус (Україна). Після завершення аклімації тварин випадковим чином було розподілено на контрольну та дослідні групи (*CTRL*, *C1–C10*, *S1–S13*). 100 % екстракт ліпофільних обраних препаратів на основі хлорели та спіруліни розчиняли у 2 мл 96 % етилового спирту та вносили в експериментальні резервуари до номінальної концентрації 200 мкл/л. Інкубація тривала 14 діб.

Експерименти на тваринах проводились у відповідності до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей (Страсбург, 1986), ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2000) та рішення етичної комісії Тернопільського національного педагогічного університету (Протокол № 3/2019, від 3 серпня 2019 р.).

Після завершення експерименту риб піддавали гіпотермічному шоку у системі лід:вода, відбирали з серця кров, еритроцити виділяли методом градієнтного центрифугування цільної крові при $1000 \times g$ протягом 15 хв. Відбір тканини печінки та мозку проводили за температури 4°С. Усі реактиви, окрім додатково зазначених, були від фірми ТОВ «НВФ «Сінбіас» (Китай) і мали кваліфікацію «хч».

2.1.3. Виділення ізольованих гепатоцитів

Особин *Cyprinus carpio* (стандартна довжина тіла 16-19 см, маса 250-300 г) відбирали з рибного господарства, розташованого в незабрудненій місцевості (49°49 п.ш., 25°23 с.д.). Рибу транспортували до лабораторії в резервуарах об'ємом 60 л з аерованою нативною водою (концентрація розчиненого кисню становила $8,67 \pm 0,51$ мг/л). Експерименти проводили відповідно до національних протоколів із захисту тварин та затверджених Комітетом з біоетики Тернопільського національного педагогічного університету імені В. Гнатюка (№ 2 від 12 квітня 2018 р.) правил поводження з тваринами та біологічними зразками. Рибу акліматизували в аерованій, пом'якшеній водопровідній воді та годували комерційним кормом для риб (21 % білка, Aquarius, Україна) протягом усього періоду аклімації.

Після 7 днів аклімації до лабораторних умов рибу анестезували гвоздичною олією, відбирали з серця кров, умертвляли, вимірювали (до мм) і зважували (до мг). Еритроцити виділяли методом градієнтного центрифугування цільної крові при $1000 \times g$ протягом 15 хв. Гепатоцити *C. carpio* отримували шляхом перфузії печінки через ворітну вену. Клітини печінки розділяли шляхом лізування в 100 мкл 0,1 % трипсину/ЕДТА протягом 2 хв. Лізис призупиняли додаванням потрійного об'єму Dulbecco's modified Eagle medium, доповненого 20 % розчином сироватки крові теляти, з подальшим центрифугуванням протягом 5 хв при 130 g (Grunow et al. 2011). Для подальшого використання клітини ресуспендували в збалансованому сольовому розчині Хенка без Ca^{2+} і Mg^{2+} до кількості 10^7 клітин $мл^{-1}$.

Життєздатність клітин оцінювали після кожної процедури виділення для кожного типу клітин шляхом вивільнення трипанового синього. У всіх досліджуваних випадках життєздатність клітин становила $96,2 \pm 3,3$ % без статистично вірогідних відмінностей (one-way ANOVA, $p > 0.05$).

2.2. Біохімічні методи дослідження

2.2.1. Параметри окисного ушкодження

Стан системи антиоксидантного захисту тканин та/або ізольованих клітин гідробіонтів оцінювали за активністю ферментів антиоксидантного захисту, зокрема супероксиддисмутази і каталази, та утворенням активних форм кисню і продуктів пероксидного окиснення ліпідів та окисних модифікацій протеїнів. Для дослідження виготовляли 10 %-ний гомогенат тканини в 50 мМ К-фосфатному буферному розчині (рН 7,4), використовуючи електричний гомогенізатор Поттера з тефлоновим пестиком. Для дослідження СОД, каталази та GST одержували розчинну фазу гомогенату шляхом його центрифугування протягом 10 хв. при 6 000 g.

Активність супероксиддисмутази [КФ 1.15.1.1] вимірювали як зниження швидкості відновлення нітротетразолію синього при додаванні феназинметасульфату і НАДН (Beauchamp and Fridovich 1971). Визначення проводили з використовували 1 мл супернатанту 10 % гомогенату тканин печінки. Для визначення активності Mn-SOD супернатант попередньо витримували 60 хв при 0 °С в присутності 5 мМ KCN, для повного пригнічення активності Cu,Zn-SOD (Floreani, Napoli, and Palatini 2002). Активність ферменту виражали в умовних одиницях (у.о.), за які приймали активність ферменту, котра здатна викликати зміну оптичної густини в результаті процесу відновлення нітротетразолію синього в дослідних зразках на 50 % в перерахунку на 1 мг протеїнів тканини.

Активність каталази (ЕС 1.11.1.6) визначали у розчинній фазі 10 % гомогенату чи ізольованих гепатоцитів за методом Аєбі (Aebi et al. 1974), який ґрунтується на зменшенні оптичної густини при 240 нм при розкладі гідроген пероксиду під дією каталази. Досліджувана реакційна суміш містила 50 мкг протеїну у 50 мМ К-фосфатному буфері (рН 7,0) в присутності 15 мМ H₂O₂ загальний об'ємом 3,0 мл. Реакцію ініціювали додаванням супернатанту і вимірювали світлопоглинання при 240 нм з 30-секундним інтервалом. Активність каталази обраховували за мілімолярним коефіцієнтом світлопоглинання гідроген

пероксиду ($\epsilon = -0,04 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) і виражали в мкмоль/(мг розчинного протеїну*хв.).

*Активність утворення активних форм кисню у розчинній фазі гомогенату тканин печінки та/або ізольованих гепатоцитах коропових риб в 20 mM HEPES-сахарозному буфері (рН 7,4) оцінювали за рівнем утворення флуоресцентного продукту родаміну 123 під час реакції нефлуоресцентного деривату дигідрородаміну з АФО при довжині хвилі збудження (ex.)=485 нм та випромінювання (em.)=538 нм (Viarengo, Burlando, Cavaletto, et al. 1999). Флуоресценцію реєстрували з використанням мікропланшетного рідера *f*-max Molecular Device (США).*

Вміст *окисних модифікацій протеїнів та ліпідів* визначали в спільній пробі гомогенату тканин печінки або ізольованих гепатоцитів: після осадження протеїнів за допомогою 20 % сульфосаліцилової кислоти супернатант використовували для визначення продуктів перекисного окиснення ліпідів, осад – окисних модифікацій протеїнів (Луцак, Багнюкова та Луцак 2004; Ohkawa, Ohishi, and Yagi 1979).

Для характеристики ПОЛ вимірювали утворення ТБК-активних продуктів у реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК) (Ohkawa, Ohishi, and Yagi 1979). Утворення ТБК-активних продуктів обчислювали, базуючись на інтенсивності світлопоглинання комплексу рожевого відтінку при 532 нм відносно контролю на реактиви за молярним коефіцієнтом екстинції комплексу $\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, і виражали у нмоль/г тканини.

ОМП визначали за їх здатністю утворювати 2,4-динітрофенілгідрозони (Луцак, Багнюкова та Луцак 2004) при інкубації дослідних зразків в присутності 0,1 M розчину 2,4-динітрофенілгідрозину в 2 M хлоридній кислоті. Оптичну густину реєстрували при 370 нм проти контролю на реактиви без додавання 2,4-ДНФГ. Вміст фенілгідрозонів знаходили на основі молярного коефіцієнту екстинції ($2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.2.2. Пул клітинних тіолів

Вміст загального глутатіону визначали в гомогенаті печінки чи ізольованих гепатоцитах з допомогою реактиву Елмана (Anderson 1985). Принцип методу ґрунтується на здатності GSH окиснюватися 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою (ДТНБ) до окисненої форми (GSSG) з утворенням 5-тіо-2-нітробензойної кислоти. Перед початком визначення GSSG відновили до GSH за допомогою глутатіонредуктази (1,9 од., 0,037 мл 50 U/ml). Рівень утворення -тіо-2-нітробензойної кислоти вимірювали спектрофотометрично при 412 нм з інтервалом 30 с протягом 2 хв. Стандартні розчини виготовляли з відновленого глутатіону. Концентрацію виражали в мкмоль на г вологої маси.

Для визначення вмісту окисненого глутатіону перед початком визначення зразок безбілкового екстракту піддавали дії 2-вінілпіридину протягом 60 хв у кінцевій концентрації вмісту 2 % (Griffith 1980). Редокс-індекс глутатіону обраховували за формулою $PI\ GSH = [GSH]/([GSH]+2[GSSG])$.

Активність ферменту глутатіон-S-трансферази [КФ 2.5.1.18] визначали спектрофотометрично за рівнем утворення адуктів 1-хлоро-2,4-динітробензолу з глутатіоном. Процес ініціювали внесенням в реакційну суміш 0,1 мл розчину 1 мМ 1-хлоро-2,4-динітробензолу в етанолі (кінцевий вміст C_2H_5OH в пробі не перевищував 5 %). Утворення адукту S-2,4-динітрофенілглутатіону реєстрували як збільшення інтенсивності поглинання світла при довжині хвилі 340 нм через 2 хв після початку реакції. Активність ферменту обчислювали за коефіцієнтом екстинції ($9.6\text{ мМ}^{-1}\text{ см}^{-1}$) і виражали в нмоль / (хв*мг білка) (Habig, Pabst, and Jakoby 1974).

Концентрацію MT як тіолових сполук (MT-SH) визначали методом Віаренго А. та ін. (Viarengo et al. 1997) з використанням ДТНБ у 30 % гомогенаті печінки *S. auratus gibelio* в 20 мМ трис-сахарозному буфері. Протеїни екстрагували сумішшю етанол:хлороформ та, після взаємодії з ДТНБ, реєстрували інтенсивність світлопоглинання при 412 нм. Вміст MT-SH обчислювали, виходячи з твердження, що в 1 молі MT міститься кількість SH груп, еквівалента 20 молям GSH.

2.2.3. Цито- та генотоксичність

Порушення *стабільності лізосомальних мембран*, як одну з ознак цитотоксичності, визначали за часом утримання слабкого катіонного барвника – нейтрального червоного (NR). Стабільність мембран лізосом оцінювали в еритроцитарній масі, одержаній центрифугуванням крові при 150 g з подальшою декантацією супернатанту. До одержаного гематокриту додавали розчин нейтрального червоного до відношення 0,004 % мас. / об. При проведенні дослідів *in vitro* перед цим еритроцитарну масу протягом години інкубували з дослідними екстрактами. Після завершення інкубацій клітини осаджували центрифугуванням при 150 g / 10 хв і двічі промивали розчином Рінгера. Акумуляований барвник екстрагували з інтактних клітин етанольно-оцтовою сумішшю (етанол та оцтова кислота, 1:1 об. / об.) та визначали світлопоглинання при довжині хвилі 550 нм (Vazzana et al. 2016).

Підрахунок кількості *клітин з мікроядрами* використовували як маркер генотоксичного ефекту (Baršienė, Andreikėnaitė, and Rybakovas, n.d.). Ураження хроматину, які проявлялися в утворенні мікронуклеусів та інших ядерних аномалій, визначали в еритроцитах після забарвлення мазків крові 5 % розчином Гімзи. Кількість клітин підраховували при $\times 1000$ кратним збільшенням мікроскопа під олійною імерсією і виражали в перерахунку на 1000 клітин (%). Сумарна кількість проаналізованих клітин кожного цитологічного препарата складала не менш, ніж 2000 клітин.

Порушення стабільності ДНК, як ще один маркер генотоксичності, визначали методом лужного осадження в 10 % гомогенаті тканини чи ізольованих гепатоцитах в 50 мМ трис-ЕДТА буфері (рН 8,0), який містив 0,5 % натрію додецил сульфату (Olive 1988). Дослідні зразки інкубували протягом 10 хв при 60 °С, охолоджували 20 хв в морозильній камері при -20 °С та центрифугували 15 хв при 6000 g. Вміст ушкоджених молекул ДНК визначали в супернатанті, що містив безпротеїнову форму ДНК з використанням барвника Hoescht 33342 в присутності 0,4 М натрій хлориду, 4 мМ натрій холату та 0,1 М трис (рН 9) (Bester, Potgieter,

and Vermaak 1994). Рівень флуоресценції фіксували при хвилі збудження (ex.)=360 нм та емісії (em.)=450 нм одразу та після 15 хв інкубації у темряві. Вміст пошкодженого ДНК визначали за калібрувальним графіком, побудованим на комерційному зразку ДНК (Sigma) у діапазоні 1,5-25 мкг/мл, і виражали як частку депротейнізованої форми ДНК до загальної його кількості у клітині.

2.2.4. Маркери апоптозу

Інтенсивність процесів апоптозу визначали як активність ферментів каспази 3 та катепсину D.

Активність каспази 3 визначали за утворенням п-нітроаніліну – результату гідролізу ацетил-Асп-Глу-Вал-Асп п-нітроаніліду (DEVD) під дією каспази 3 у лізаті тканин. Лізат одержували шляхом центрифугування гомогенату у співвідношенні 1:30 тканина:лізуючий буфер (4 % Тритон X-100, 5 мМ ЕДТА, 5 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl₂ та 350 мкг/мл ФМСФ). Інтенсивність світлопоглинання визначали після 2 годин інкубування в присутності (DEVD) при температурі 37 60 °С. Довжина хвилі – 405 нм. Активність каспази-3 виражали в нмоль/г тканини (Bonomini et al. 2004).

Принцип методу визначення *активності катепсину D* ґрунтується на спектрофотометричному визначенні кислоторозчинних продуктів ферментативного гідролізу гемоглобіну. Для аналізу використовували гомогенат печінки у 0,25 М розчині сахарози у співвідношенні 1:2 (тканина/сахароза). Для визначення вільної активності ферменту реєстрували різницю оптичної густини між дослідом (проба на вільну активність ферменту) і контролем без тритону X-100, загальної – між дослідом (проба на загальну активність ферменту) і контролем з тритоном X-100. Обрахунки проводили за формулою $AD = \Delta E * 122,22$ та виражали у нмоль тирозину/(хв*г печінки) (Дингл та ін. 1980)

2.2.6. Нейротоксичність

Активність холінестерази [КФ 3.1.1.7] визначали колориметричним

методом Елмана та інш. (1961) який ґрунтується на здатності гідролізувати ацетилтіохолін йодид при 25 °С. Індикатором тіолових груп виступала ДТНБ (Ellman et al., 1961). Реакцію ініціювали внесенням в реакційну суміш розчину ацетилтіохолін йодиду. Кінцева концентрація реагентів становила: $4,74 \times 10^{-4}$ М ацетилтіохолін йодиду, $3,15 \times 10^{-4}$ М ДТНБ. Активність ХЕ виражали в нмоль гідролізованого ацетилтіохолін йодиду/хв⁻¹мг* протеїну⁻¹.

2.2.7. Маркери ендокринних розладів

Вміст вітелогенінподібних протеїнів (ВТГ-ПП) визначали за вмістом лужнолабільних фосфатів за методом Наглера та ін.(Nagler et al. 2011), який базується на осадженні ліпофосфопропротеїнів за допомогою трихлороцтової кислоти з їх подальшим лужним гідролізом для виділення лабільних фосфатів: один об'єм охолодженої до 0° С 20 % трихлороцтової кислоти змішували з рівним об'ємом дослідного зразка і залишали при кімнатній температурі на 15 хв з наступним центрифугуванням при 10 000 g протягом 10 хв (t=4° С). Осад протеїнів ресуспендували в 0,3 мл 1 М натрій гідроксиду та інкубували 60 хв при 75 °С. Вміст фосфатів визначали колориметричним методом з використанням фосфомолібденового реактиву (Pellerin n.d.).

2.2.8. Параметри енергетичного обміну

Для оцінки енергетичного статусу у тканинах печінки визначали вміст лактату та пірувату, їх співвідношення та активність лактатдегідрогенази (КФ 1.1.1.27).

Вміст лактату та пірувату визначали спектрофотометрично у екстракті, одержаному з 20 % гомогенату тканин печінки в 0,5 М НСІО₄, з подальшою його нейтралізацією 5 н КОН. Кількість лактату визначали за збільшенням світлопоглинання дослідних зразків через 60 хв після додавання НАД та ЛДГ. Довжина хвилі – 340 нм (Gawehn K. 1988). Метод визначення пірувату ґрунтується на ферментативному відновленні пірвіноградної кислоти до молочної за допомогою лактатдегідрогенази та при окисненні НАДН. Кількість пірувату

вимірювали за зменшенням оптичної густини при 340 нм внаслідок розкладу НАДН. При рН 7,4 та $t=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ рівновага реакції зміщена в бік утворення лактату (Lamprecht and Heinz 1988).

ЛДГ-активність визначали за зменшенням значення оптичної густини в залежності від швидкості окиснення НАДН у фосфатно-піруватному розчині при довжині хвилі 340 нм. Об'єм проби до необхідного доводили 50 мМ К-фосфатним буфером (рН 7,4), реакцію ініціювали внесенням НАДН. Світлопоглинання дослідних зразків реєстрували щохвилини протягом 4 хв. Активність ферменту обчислювали з використанням молярного коефіцієнту екстинції для НАДН ($\epsilon=6,22 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) і виражали в мкмоль/(хв*мг протеїну).

2.2.11. Визначення вмісту протеїнів

Концентрацію протеїнів у розчинній фазі гомогенату чи ізольованих гепатоцитах визначали за методом О. Г. Лоурі та співавт. (Lowry et al. 1951). Вміст протеїнів обраховували за калібрувальною кривою, побудованою на основі тваринного альбуміну (Albumin animal), і виражали в мг білка/г тканини.

2.3. Дослідження тератогенного ефекту

Тест на тератогенність проводили з використанням ембріонів *D. rerio* відповідно до OECD (OECD guideline for the testing, 2006). Здорову ікру відбирали протягом 2 годин після запліднення, розділяли на групи ($n = 6$) і поміщали у 24-лунковій планшеті, наповненій 2 мл трис-НСІ буферу (рН 7,4) з додаванням 0,4 мкл ліпофільних фракції досліджуваних екстрактів. Дослідні об'єкти утримувалися при температурі $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ з дотриманням режиму світло/темрява 12:12 год. Спостереження тривало протягом 120 год і включало наступні ознаки: смертність, згортання яєць, морфологічні зміни, зокрема деформація хвоста та хорди, порушення морфології хребта, очей та жовткового мішка. Тератогенний ефект констатувався при наявності патологій у $\geq 50\%$ усіх ембріонів та / або личинок певної групи.

2.4. Аналіз дослідних зразків

2.4.1. Аналіз фітопланктону

Зразки води з дослідних ділянок зберігалися протягом місяця з використанням розчину Люголя в якості консерванта. Якісний та кількісний аналіз фітопланктону проводили в камері Sedgwick-Rafter об'ємом 0,5 мл з використанням світлового мікроскопа Olympus BX60 відповідно до стандартних методів (Wetzel and Likens 2000). Види фітопланктону ідентифікували на основі мікроскопування та аналізу морфологічних особливостей.

2.4.2. Фізико-хімічний аналіз води

Фізико-хімічні показники води вимірювали за допомогою стандартизованих аналітичних протоколів. рН визначали за допомогою потенціометра (рН 150 МІ, Білорусь) з комбінованим електродом. Концентрацію нітрит іонів оцінювали, використовуючи колориметричний метод з використанням реактиву Грісса. Нітрат іони визначали за допомогою реактиву Грісса, за умови попереднього відновлення реакційної суміші цинковим пилом до нітритів (Sandu et al. 2017). Вміст аміаку визначали колориметричним методом з використанням реагенту Несслера (Sandu et al. 2017). Для визначення неорганічного фосфату був використаний метод Лоурі-Лопеса у модифікації Скулачова (Скулачев, 1962). Концентрацію фенолів оцінювали за допомогою 4-аміноантипірину (Dannis 1951). Концентрацію хлорид іонів визначали методом осадження Мора. Концентрацію сульфатів в досліджуваній воді визначали за допомогою непрямого титрування EDTA (Belle-Oudry 2008).

2.4.3. Оцінка токсичності in vitro

Потенційну токсичність екстрактів ціанобактерій оцінювали з використанням ізольованих гепатоцитів коропа, еритроцитів та гомогенату мозку. У всіх експериментальних серіях використовували дві діючі концентрації 0,1 % та 1,0 %

екстракту рафідіопсіса *R. raciborskii*. В якості контролю використовували гепатоцити, які не піддавалися дії жодного з екстрактів ціанобактерій.

Гепатоцити коропа (10^7 клітин/мл) витримували протягом 2 годин в присутності обох концентрацій кожного з досліджуваних екстрактів. Після експозиції вимірювали параметри окисного стресу (каталазна активність, пероксидація ліпідів, окисні модифікації протеїнів); стан клітинних тіолів (концентрація глутатіону, глутатіон-S-трансферазна активність, вміст металотіонеїнів); генотоксичність (фрагментація ДНК) та апоптична активність.

Еритроцити коропа (з розрахунку 10^7 клітин/мл) експонували протягом 1 год досліджуваними екстрактами ціанобактерій (0,1 та 1,0 %) (Rzymski et al. 2018).

2.5 Математичні методи обробки даних

Результати вимірів подані у форматі $M \pm m$ для 8 тварин / зразків (аналізи біохімічних маркерів), 3 повторів (аналіз води). За умови, що дані згідно з тестом Лілієфорда не були нормально розподілені, то до їх статистичного аналізу були застосовані непараметричні тести (Kruskall–Wallis ANOVA Та Mann–Whitney *U*-test) при вірогідності значення $p < 0,05$. Вірогідність відхилення двох рядів значень обчислювали з використання *t*-тесту Стюдента. Вірогідною вважали відмінність між рядами, яка становила $p < 0,05$. Відповідність між двома рядами значень встановлювали відповідно до обчислень коефіцієнту Пірсона.

Для оцінки стану рівноваги в системах антиоксидантного захисту обчислювали індекс оксидативного стресу (ІОС) за співвідношенням суми показників стану антиоксидантних чинників (А) і прооксидантних проявів (П): $ІОС = \Sigma A / \Sigma П$ після стандартизації одержаних нами результатів (Фальфушинська, Горин 2019). До “А” відносили такі показники як каталазну активність, вміст GSH та MT, до “П” – продукти окисної деструкції ліпідів (ТБК-АП) та протеїнів (ОМП), вміст оксирадикалів та GSSG.

Для з'ясування впливу діючих факторів та їх взаємних впливів на показники тварин використовували дискримінантний та двофакторний аналіз ANOVA. Оцінку

взаємозв'язків між окремими показниками тварин здійснювали за допомогою факторного (метод головних компонент, МГК) та МГК з NIPALS алгоритмом, групову приналежність окремих екземплярів тварин – за сумою показників з використанням МГК (центроїдний груповий аналіз) та МГК з NIPALS алгоритмом. Показники, які з найвищим ступенем достовірності розрізняють обрані місцевості та/або експериментальні групи тварин, визначали за допомогою дискримінантного аналізу та побудови класифікаційного дерева, використовуючи комп'ютерні програми Statistica v 12.0 та v 8.0, Excel для Windows-2016.

РОЗДІЛ 3

ПОШИРЕННЯ ЦІАНОБАКТЕРІЙ РЯДУ *NOSTOCALES* У ВОДОЙМАХ ЗАХІДНОЇ УКРАЇНИ ТА ВПЛИВ ЇХ МЕТАБОЛІТІВ НА КОРОПОВИХ РИБ *CARASSIUS AURATUS GIBELIO (IN VIVO)*

3.1. Поширення та токсичність *Raphidiopsis raciborskii* у водоймах-охладжувачах електростанцій

Ціанобактерії роду *Nostocales* знаходяться у сфері інтересів науковців через своє широке розповсюдження, здатність до продукування сильнодіючих токсинів, велику амплітуду діапазону толерантності та здатність адаптуватися до нових умов існування. Їхня поява у прісноводних водоймах може бути спричинена антропогенним тиском та змінами клімату (O’Neil et al. 2012; Paerl and Paul 2012). Наприклад, *Raphidiopsis raciborskii* (раніше *Cylindrospermopsis raciborskii*) (Aguillera et al., 2018), відомий як головний продуцент СУН в субтропічній і тропічній зонах, в Європі ніколи раніше не був задокументований як виробник ціанотоксинів. Проте останні дослідження вказують на токсичність його біологічно активних речовин на експериментальних моделях *in vivo* та *in vitro* (Rzymiski et al. 2017). Вперше *R. raciborskii* був виявлений в озері Кастрі в Греції (Skuja 1937) і надалі систематично згадується по всьому континенту як штам, який спричиняє цвітіння води. На сьогодні відома інформація про присутність *R. raciborskii* у водоймах Західної Польщі, Литовському озері та озері Нерон в Ярославській області Росії, що вказує на його активну експансію на водойми помірних широт (Rzymiski et al. 2017). Дані щодо токсичності Ностокових, які населяють українські водойми, обмежені (Novosiolova and Protasov 2016). Очікується, що, у зв’язку із глобальним потеплінням, у скорому часі в Європі збільшиться кількість ціанобактерій, що свідчить про необхідність моніторингу токсикогенних видів в різних регіонах. Особлива увага приділяється видам, які визнані потенційними виробниками циклічних гепатопептидів – мікроцистинів, що включають

Microcystis aeruginosa, *Planktothrix agardhii*, *Anabaena* / *Dolichospermum*, *Anabaenopsis* та ін. (Bernard et al. 2017), а також потужних виробників нейротоксичного (гомо)анатоксину-а (ANA-A) – алкалоїду, який продукують види, що відносяться до роду *Anabaena*, *Aphanizomenon* та *Dolichospermum*. Все частіша поява цитотоксичного циліндроспермопсину у європейських прісних водоймах свідчить про наявність у них штамів *Raphidiopsis raciborskii*, *Aphanizomenon gracile*, *Aph. klebahnii*, *Aph. flos-aquae*, *Aph. ovalisporum* and *Oscillatoria sp*, які його продукують (Rzymiski and Poniedzialek 2014). Однак географія розповсюдження цих штамів та пов'язані з цим загрози у Східній Європі вивчені недостатньо.

Тому нами було досліджено наявність *R. raciborskii* та інших ціанобактерій, що належать до роду *Nostocales*, *Chroococcales* та *Oscillatoriales*, у двох локаціях Західної України – водосховищі Касперівської гідроелектростанції та ставка-охолоджувачі Хмельницької атомної електростанції. Оскільки експансія потенційно небезпечних ціанобактерій почалася з тропічних та субтропічних широт, вибір водойм для дослідження базувався на їх температурному режимі.

Ставок-охолоджувач Хмельницької АЕС (Нетішинське водосховище) – штучна водойма русло-наливного типу площею 20 км², призначена для забезпечення технічного водопостачання і охолодження теплообмінного обладнання енергоблоків. Окрім того, водойма має рекреаційне значення. (“ХАЕС:Офіційний Веб-Сайт”). За нормальних умов експлуатації АЕС температура стоків, які надходять до ставка-охолоджувача, вища на 8–12°C. Це спричиняє підвищення температури води у водоймі на 0,5–6°C. В холодний період року температура повітря на берегах ставка-охолоджувача у 60 % випадків на 1°C, а в 20 % випадків на 3-5°C вища, ніж температура повітря на опорній станції (Яцентюк 2017). За умови підвищення температури води у ставку-охолоджувачі на 0,5-1,5°C у порівнянні з природним рівнем, відбувається активізація процесів розвитку планктону, при підвищенні температури води на 5-6°C обсяг біомаси збільшується у кілька разів, після зростання температури на 6°C біопродуктивність ставка помітно знижується (Дем'яненко 2011).

Касперівське водосховище – водосховище на р. Сереті (Тернопільська обл.), створене в 1964 році за проектом інституту «Укргідропроєкт». Основне його призначення – гідроенергетика, супутнє – захист населених пунктів від повеней та рекреаційний об’єкт. Площа поверхні – 2,86 км² (“Інвестиційний Паспорт Заліщицького Району Тернопільської Області,” n.d.). Клімат у с. Касперівці дещо відрізняється від клімату Західної України та характеризується наближеністю до середземноморського. Середньорічна температура повітря становить +9,2°C (мінімум у січні – -3,3°C, максимум в липні – +20,8°C), тоді як в загальному по Тернопільській області середньорічною температурою є +8,4°C (-4°C в січні, +20,8°C в липні). За останні 5 років середньорічна температура у с. Касперівці зросла на 0,5°C, що робить Касперівське водосховище потенційним середовищем існування токсичних ціанобактерій (“Клімат Касперівці: Середня Температура, Погода По Місяцях, Середні Погоди в Касперівцях - Climate-Data.Org”).

В межах дослідження були проведені характеристика асоційованої фітопланктонної групи, аналіз на ціанотоксини (CYN, MCS та ANA-A) та дослідження фізико-хімічних параметрів води з Касперівського водосховища (KR), річки Серет нижче дамби Касперівської ГЕС (SR) та Нетішинського водосховища ХАЕС (NR).

Фізико-хімічні параметри води з досліджуваних водойм за серпень-вересень 2017 р. зведені в табл. 3.1 (Rzymiski et al. 2018). Перевищення ГДК хрому і купруму в усіх досліджуваних водоймах та мангану і алюмінію у KR і SR свідчать про наявність незначного індустріального забруднення. У серпні у всіх точках відбору спостерігалось кратне перевищення концентрації сульфатів порівняно з ГДК для водних об’єктів господарського значення, встановленими ДСТУ. Періодичне підвищення даного показника може бути пов’язане з високим вмістом сульфатів у субстратах в даному регіоні (місце сульфатних родовищ, напр. гіпсів). Перевищення вмісту фосфатів в усіх випадках та нітрогену у вересні дозволяє припустити, що водойми Касперівської ГЕС та Хмельницької АЕС є евтрофічними.

Таблиця 3.1

**Фізико-хімічні параметри води із водойм Касперівської ГЕС та
Хмельницької АЕС**

Параметри [мг/л]	KR (Касперівське водосховище)		SR (р. Серет нижче дамби)		NR (Нетішинське водосховище)		ГДК для водних об'єктів господар ського значення
	Серпень	Вересень	Серпень	Вересень	Серпень	Вересень	
pH	7,45±0,06	8,00±0,05	7,52±0,07	7,77±0,05	8,10±0,05	7,80±0,05	6,5-8,5
NH ₄ ⁺	0,23±0,03	0,85±0,05*	0,26±0,03	1,25±0,25*	0,33±0,02	1,55±0,75*	0,5
NO ₂ ⁻	0,01±0,005	0,11±0,01*	0,01±0,005	0,11±0,005*	0,01±0,005	0,01±0,01	0,02
NO ₃ ⁻	0,49±0,05	1,45±0,19	0,53±0,06	2,10±0,09	0,20±0,02	0,03±0,05	9,0
Cl ⁻	40,32±1,50	28,36±1,75	39,10±1,50	29,00±1,65	49,63±2,15	56,72±2,50	300
SO ₄ ²⁻	796,0±76,2*	220,0±15,6*	740,0±57,7*	240,0±20,0*	744,5±33,9*	150,5±12,9*	100
PO ₄ ³⁻	0,41±0,005*	0,14±0,02*	0,38±0,005*	0,13±0,03*	0,386±0,002*	0,16±0,007*	0,1
Фенол и [мг/л]	0,20±0,02	0,23±0,02	0,18±0,02	0,22±0,05	1,00±0,04	0,13±0,04	0,001
Сухий залишок	748±31	825	702±35	750	916±43	725	1000
Загальний Са	61,2±1,9	76,1±1,2	65,7±1,3	78,4±1,8	68,3±2,6	65,9±1,4	180
Загальний Fe	0,07±0,01	0,04±0,005	0,25±0,1*	0,03±0,002	0,10±0,001	0,02±0,001	0,1
Загальний К	5,52±0,6	5,88±0,2	4,70±0,1	5,19±0,3	7,26±0,3	6,42±0,2	50
Загальний Mg	9,25±0,5	8,24±0,1	8,6±0,1	8,53±0,1	8,52±0,3	8,1±0,2	40
Загальний Na	10,51±0,3	10,2±0,1	10,28±0,1	10,0±0,2	39,52±1,5	36,8±0,2	120
Загальний Mn	0,06±0,3*	0,05±0,002*	0,18±0,08*	0,04±0,01*	0,05±0,03*	0,01±0,01	0,01
Загальний Al	0,55±0,2*	0,15±0,06*	0,044±0,03*	0,019±0,01	0,01±0,001	0,014±0,001	0,4
Загальний Cd	—	0,002±0,001	0,001±0,001	—	—	—	0,005
Загальний Co	0,004±0,001	0,004±0,001	0,004±0,001	0,005±0,001	0,004±0,001	0,004±0,001	0,01

Загальний Cr	0,004±0,001*	0,004±0,001*	0,004±0,001*	0,005±0,001*	0,004±0,001*	0,004±0,001*	0,001
Загальний Cu	—	0,005±0,001*	—	0,015±0,001*	0,005±0,001*	0,032±0,001*	0,001
Загальний Hg	—	—	—	—	—	—	—
Загальний Ni	0,007±0,001	0,007±0,001	0,004±0,001	—	0,012±0,001	0,008±0,001	0,01
Загальний Pb	0,011	0,018	0,045	0,075	0,024	0,042	0,1
Загальний Zn	—	—	—	—	—	0,005±0,001	0,01

* – показник перевищує значення ГДК для водних об'єктів господарського значення

Проведений співробітниками Познанського медичного університету (Польща) аналіз фітопланктону підтвердив, що ціанобактерії були домінуючою часткою у всіх досліджуваних зразках, як у серпні, так і у вересні, і їх кількість становила від 78 % до 98 % залежно від періоду та досліджуваної ділянки (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Частка ціанобактерій у зразках води із водойм Касперівської ГЕС (KR і SR) та Хмельницької АЕС (NR) у серпні та вересні 2017р. 1 (Rzymiski et al. 2018)

	Частка ціанобактерій		
	серпень / вересень		
	KR	SR	NR
Cyanoprokaryota	96,8 / 92,6	98,0 / 94,0	78,6 / 92,5
Euglenophyceae	0,0 / 0,0	0,1 / 0,0	0,0 / 0,0
Cryptophyta	0,0 / 0,4	0,1 / 0,4	0,4 / 0,0
Chrysista	1,4 / 1,3	1,6 / 1,0	0,2 / 4,2
Bacillariophyta	0,5 / 3,2	0,5 / 3,9	0,9 / 2,9
Chlorophyta	1,2 / 2,5	0,9 / 0,7	18,9 / 0,4

Встановлена частка кожного з виявлених штамів ціанобактерій у загальній масі фітопланктону (табл. 3.3). Домінуючі таксони на ділянках KR та SR включали *Pseudanabaena sp.* та *Planktothrix agardhii*, тоді як *P. agardhii* та *Planktolyngbya limnetica* переважала у ставі Хмельницької АЕС (NR). *Microcystis aeruginosa* був

виявлений лише у ставі Хмельницької АЕС і лише у вересні з часткою 17 % від загального фітопланктону. *R. raciborskii* та *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* були ідентифіковані у водоймі Касперівської ГЕС (KR та SR), при цьому їх частка від загального фітопланктону досягала 8,5 та 6,3 %.

Таблиця 3.3

**Частка кожного ідентифікованого штаму в загальній масі
фітопланктону та ціанобактерій**

	частка від загального фітопланктону (%)			частка від загальних ціанобактерій (%)		
	Серпень / Вересень					
	KR	SR	NR	KR	SR	NR
<i>Anabaenopsis cunningtonii</i>	0,0 / 0,1	0,3 / 0,8	0,0 / 0,0	0,0 / 0,2	0,3 / 0,9	0,0 / 0,0
<i>Anabaenopsis elenkinii</i>	0,0 / 0,0	0,1 / 0,0	0,0 / 0,0	0,0 / 0,0	0,1 / 0,0	0,0 / 0,0
<i>Aphanizomenon gracile</i>	1,5 / 6,9	1,5 / 3,9	0,3 / 0,0	1,5 / 7,4	1,6 / 4,2	0,4 / 0,0
<i>Cuspidothrix issatschenkoi</i>	0,3 / 0,0	0,3 / 0,0	0,0 / 0,0	0,3 / 0,0	0,3 / 0,0	0,0 / 0,0
<i>Raphidiopsis raciborskii</i>	3,9 / 8,5	2,7 / 1,1	0,0 / 0,0	4,0 / 9,2	2,8 / 1,1	0,0 / 0,0
<i>Dolichospermum sp.</i>	0,3 / 2,3	0,0 / 2,4	0,0 / 0,0	0,3 / 2,5	0,0 / 2,5	0,0 / 0,0
<i>Dolichospermum flos-aquae</i>	1,3 / 0,5	0,7 / 7,1	0,0 / 0,0	1,4 / 0,6	0,7 / 7,5	0,0 / 0,0
<i>Limnothrix redeckei</i>	0,7 / 0,0	0,1 / 0,3	0,0 / 0,0	0,7 / 0,0	0,7 / 0,3	0,0 / 0,0
<i>Merismopedia tenuissima</i>	0,1 / 0,0	0,0 / 0,6	0,0 / 0,0	0,2 / 0,0	0,0 / 0,6	0,0 / 0,0
<i>Microcystis aeruginosa</i>	0,0 / 0,0	0,4 / 0,0	0,0 / 17,0	0,0 / 0,0	0,4 / 0,0	0,0 / 1,4
<i>Planktothrix agardhii</i>	25,9 / 38,8	72,3 / 34,1	54,7 / 75,5	26,8 / 42,0	73,8 / 36,3	69,6 / 81,6
<i>Planktolyngbya limnetica</i>	8,2 / 0,0	1,4 / 0,0	18,2 / 0,0	8,4 / 0,0	1,4 / 0,0	23,1 / 0,0
<i>Pseudanabaena sp.</i>	49,0 / 35,3	12,0 / 43,8	5,4 / 0,0	50,6 / 38,2	12,2 / 46,6	6,8 / 0,0

Одержані результати підтверджують наявність у техногенних водоймах

України кількох штамів ціанобактерій, що можуть продукувати патогенні ціанотоксини. Раніше вже повідомлялося про появу таких видів, як *R. raciborskii* та *M. aeruginosa* в Україні (Novosiolova and Protasov 2016), проте дані про їх потенційну токсичність обмежені та зосереджені лише на мікроцистині. Як і передбачалося, скринінг генів *mcu* у прісних водах Київської області дав позитивні результати у більшості досліджених зразків, хоча точні продуценти визначені не були (Belykh et al. 2013).

Проведені аналізи дозволили визначити двох основних продуцентів мікроцистину: *M. aeruginosa* та *P. agardhii*. Проте, незважаючи на те, що частка останніх доволі висока, вміст мікроцистину у зразках знаходиться нижче меж детекції. Можливість існування штамів обох видів без продукування ними мікроцистину є доведеним фактом (Park et al. 2018). Попередні дослідження показали, що часовий та просторовий розподіл токсичних та нетоксичних генотипів може бути пояснений низкою факторів, включаючи конкуренцію за ресурси (Briand et al. 2003).

До ідентифікованих в даних локалях ціанобактерій, що потенційно продукують АНА-а, належать *Cuspidothrix issatschenkoii* та *Dolichospermum flos-aquae* (Osswald et al. 2009). Також був виявлений штам *Aph. gracile*, який раніше позиціонувався як головний СYN-продуцент у водоймах Польщі. Проте скринінги на наявність розчинених чи часткових циліндроспермопсину, мікроцистинів (-LR, -YR та -RR) та анатоксину дали негативні результати. Звідси можна зробити висновок про те, що штам *R. raciborskii* з водойм Зх. України не здатні продукувати СYN.

Чисельність штаму *R. raciborskii* в досліджуваних водах була відносно низькою. Це відповідає спостереженням у польських озерах, де біомаса *R. raciborskii* зазвичай не висока, навіть під час цвітіння ціанобактерій, і при максимальних значеннях не перевищує 20 % (Kokociński et al. 2013). Разом з тим, перманентний аналіз фітопланктону в Польщі показав здатність *R. raciborskii* сприяти паралельному розвитку в середовищі *Planktothrix agardhii* (Kokociński et

al. 2013). Також було експериментально підтверджено, що польський штам *R. raciborskii* може бути більш численним, ніж *Microcystis aeruginosa*, навіть при відносно низькій початковій біомасі (Rzymiski and Poniedziałek 2014). Тому динаміка виникнення *R. raciborskii* в поверхневих водах України потребує подальшого моніторингу.

3.2. Молекулярні і фізіологічні маркери стресу, ефекту та токсичності у коропової риби із зарегульованої водойми гідроелектростанції та референтної водойми.

Річка Дністер та її притоки – важлива екологічна, економічна та рекреаційна зона в Україні. Протягом останніх десятиліть, в зв'язку з посиленням господарської діяльності та побудови дамб, вона стикалася з такими проблемами, як гідрологічне регулювання, евтрофікація та зниження біорізноманіття. Паралельно з цим вплив даних факторів, зокрема комбінований, на стан здоров'я прісноводної біоти вивчено недостатньо.

Відомо, що ГЕС можуть негативно впливати на гідробіонтів, оскільки дамби провокують зміну режиму природного потоку, його гідрологічних та біогеохімічних параметрів. Крім того, вони створюють перешкоди для переміщення мігруючих видів риб і спричиняють фрагментацію немігруючих популяцій. Основна увага приділяється зменшенню густоти популяцій та їх біомаси, а також змінам структури популяцій риб в місцях ураження (Mueller, Pander, and Geist 2017; Kubečka, Matěna, and Hartvich 1997). Можна припустити, що режим руху води здатний провокувати зміни біохімічних маркерів біоти, але інформація про такі наслідки обмежена.

На попередньому етапі наших досліджень було встановлено наявність потенційно токсичних штамів родини *Nostocales* у водоймах нижче і вище дамби Касперівської ГЕС. Подальші робота була спрямована на вивчення стану гідробіонтів, зокрема коропової риби *Carassius auratus gibelio*, в умовах комбінованого навантаження: функціонування малопотужної ГЕС та впливу метаболітів ціанобактерій.

Для ранньої діагностики особливостей впливу хімічного, фізичного та біологічного забруднення обґрунтоване використання молекулярних та клітинних біомаркерів стресу та токсичності, які є чутливим та селективним інструментом для оцінки якості водного навколишнього середовища та потенційних загроз екосистемам (Viarengo et al. 2000). Визначення параметрів окисного стресу в печінці карася *C. auratus gibelio* виявило їх збільшення їх показників у тварин з дослідних сайтів, порівняно з контрольною групою (рис. 3.1, дод. 2, табл. 1).

Значимість ефекту розміщення місця існування тварин для всіх досліджуваних ознак окисного стресу доведена за допомогою одноваріантного дисперсійного аналізу ANOVA ($F = 9,6-84,5$, $p < 0,001$). Риби, як з ділянки KR, так і SR, мали подібну реакцію, а саме зниження активності СОД та підвищення рівня ОМП. Більший діапазон варіабельності показників характерний групі тварин SR. У риб SR групи також нижча активність каталази, концентрація ТБК-АП та оксирадикалів у порівнянні з контрольною та KS групами.

Рівень як окисненого, так і відновленого глутатіону та активність GST знижувались у тварин із водосховища, яке розміщене вище дамби (на 20-32 %) (рис. 3.2 дод. 2, табл. 1), але залишалися на рівні контролю у групі SR. Разом з тим, концентрація МТ відповідала контрольному рівню в KR, але вдвічі знижувалася в групі SR.

У тварин з обох ділянок зарегульованого ставу було відзначено більш високу частоту еритроцитів з мікроядрами та активацію каспази 3, порівняно з контрольною популяцією (рис. 3.3, дод. 2, табл. 1), проте змін фрагментації ДНК у гепатоцитах та холінеразної активності в мозку, як ознаки нейротоксичності, виявлено не було. В той же час, риби із локалей Касперівської ГЕС, розділених дамбою, відрізнялися за активністю катепсинів D та концентрацією вітелогеніну. Ці параметри були вищими у групі SR (до 140 %). Вважають, що більш високий рівень вітелогеніну в чоловічих особин демонструє деструктивний вплив середовища на ендокринну систему. Активність лактатдегідрогенази у тварин KR не відрізнялася від контролю, але значно зростала у тварин SR групи.

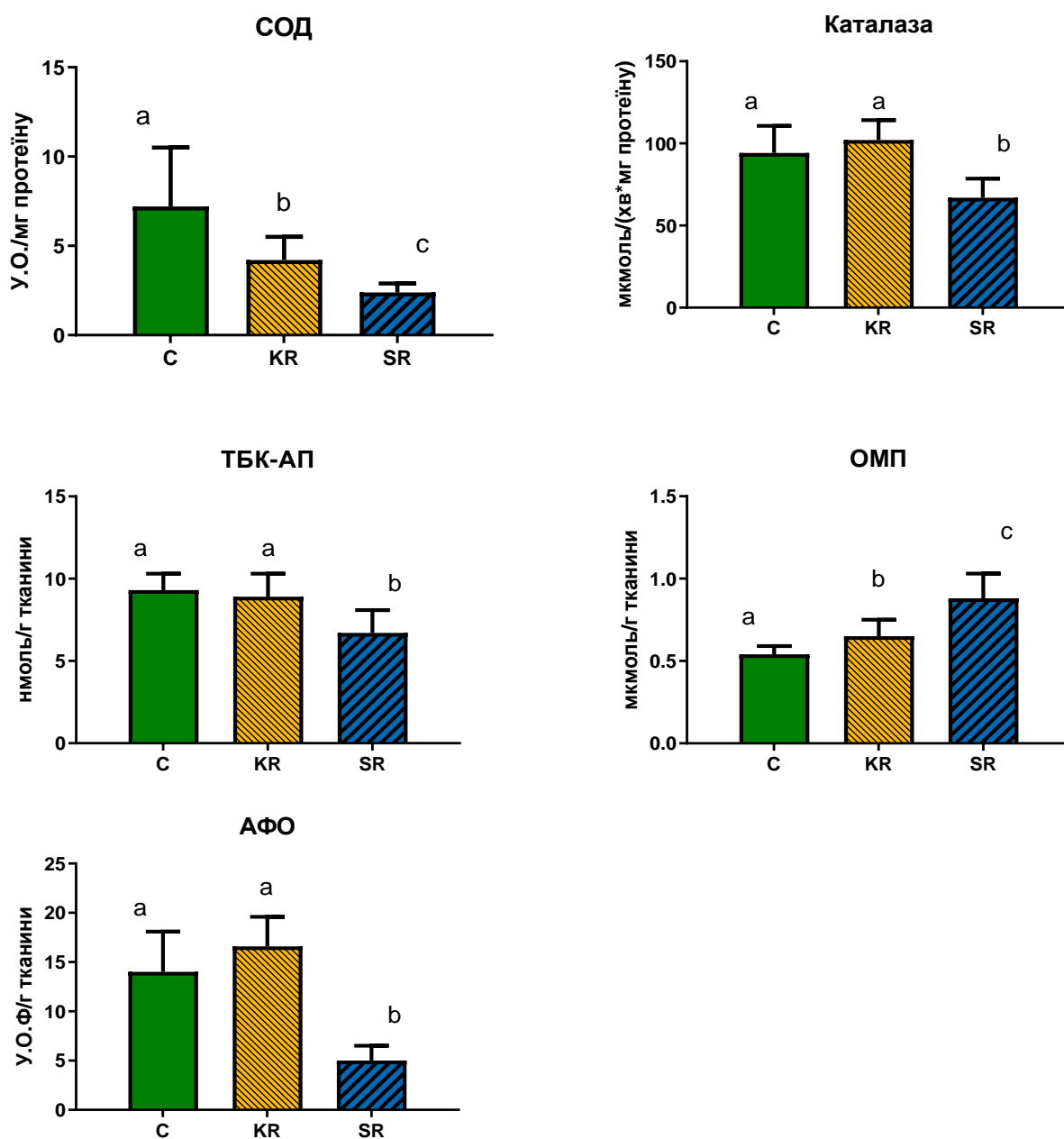


Рис. 3.1: Параметри окисного стресу в печінці *Carassius auratus gibelio* з контрольної ділянки (C), Касперівського водосховища (KR) та річки Серет нижче дамби (SR): супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ), перекисне окиснення ліпідів (ТБК-АП), окисні модифікації протеїнів (ОМП), активні форми оксигену (АФО). Однакові літери над стовпцями вказують значення, які достовірно не

відрізняються ($P > 0,05$).

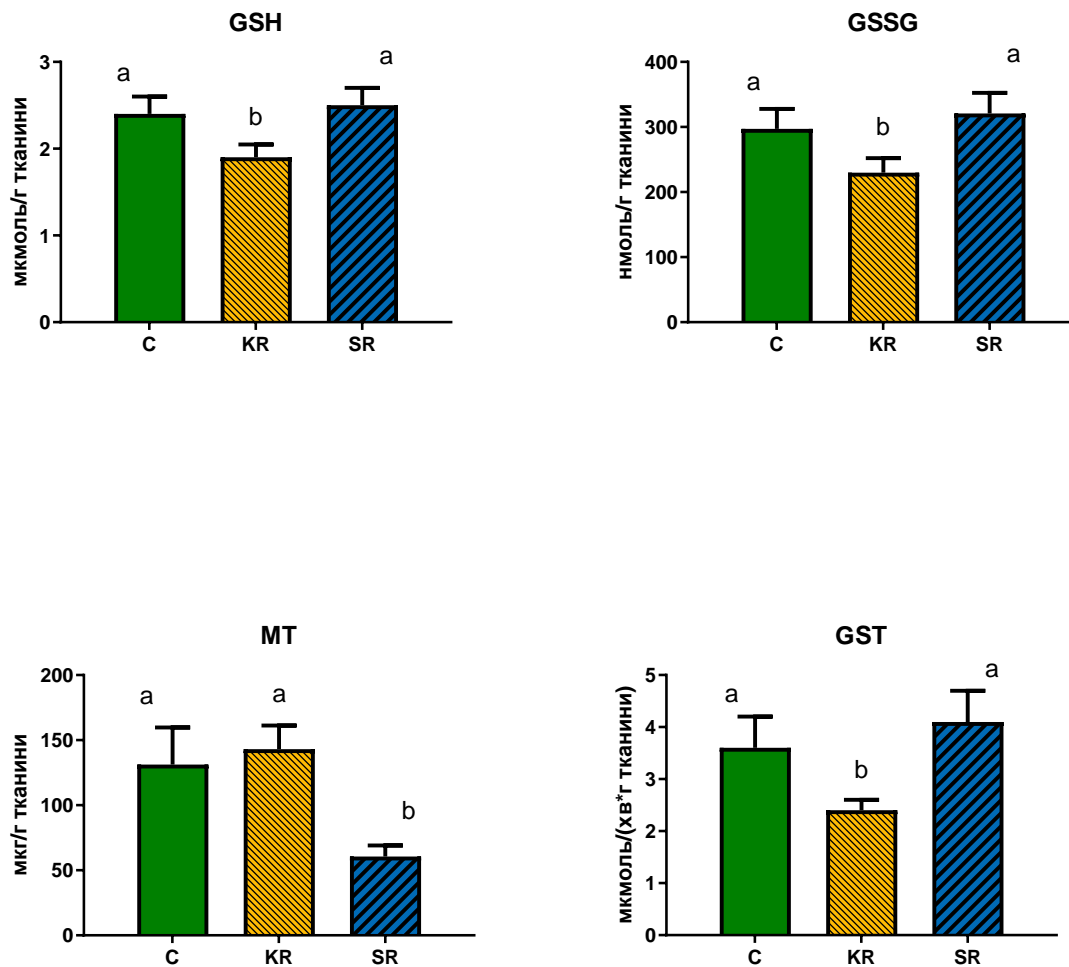


Рис. 3.2: Стан клітинних тіолів печінки *Carassius auratus gibelio* з контрольної ділянки (C), Касперівського водосховища (KR) та річки Серет нижче дамби (SR): відновлений глутатіон (GSH), окиснений глутатіон (GSSG), металотіонени (MT), глутатіон трансфераза (GST). Однакові літери над стовпцями вказують значення, які достовірно не відрізняються ($P > 0,05$).

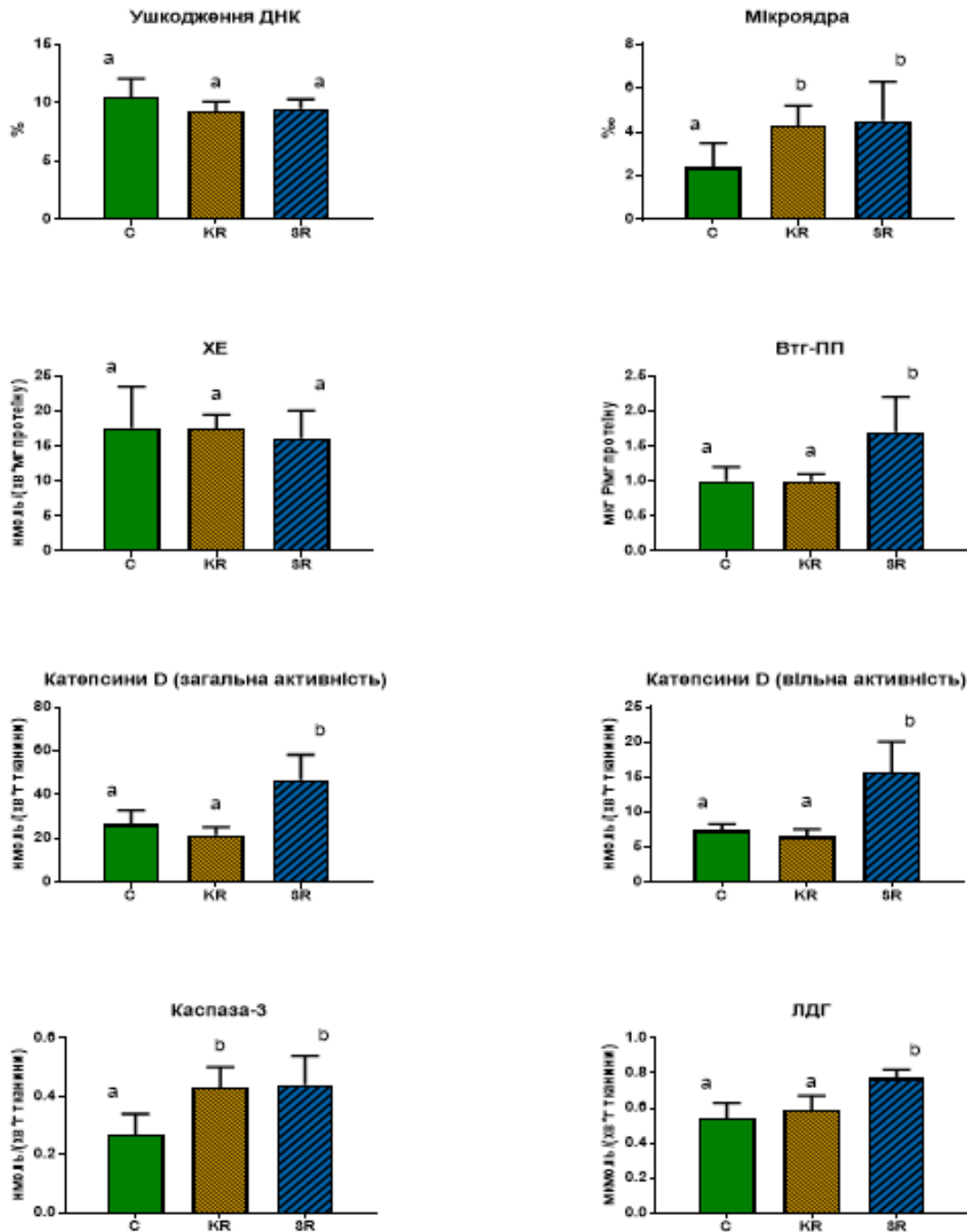


Рис. 3.3: Показники цито- та генотоксичності карася *Carassius auratus gibelio* з контрольної ділянки (C), Касперівського водосховища (KR) та річки Серет нижче дамби (SR): ушкодження ланцюгів ДНК, кількість клітин з мікроядрами, холінестеразна активність (ХЕ), вітелогенін (Втг-ПП), загальна активність катепсину D, вільна активність катепсину D, каспаза 3, лактатдегідрогеназа (ЛДГ). Однакові літери над стовпцями вказують значення, які достовірно не відрізняються ($P > 0,05$).

На основі всіх досліджених ознак після їх стандартизації ми обчислювали інтегральний індекс стресу (IIS), який довів більш істотний антропогенний тиск на тварин і, очевидно, на екосистему в групі SR, ніж у групі KR (IIS = 3,12 і 4,44 відповідно, рис. 3.4).

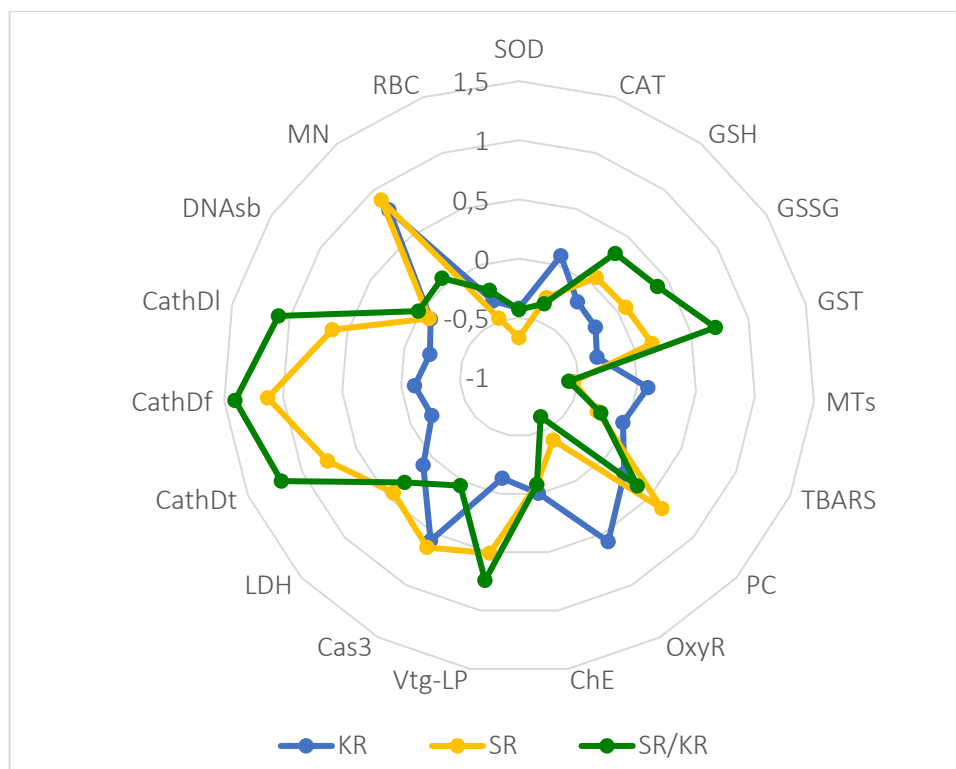


Рис. 3.4: Центровий груповий аналіз біомаркерів карася *Carassius auratus gibelio* з контрольної ділянки (С), Касперівського водосховища (KR) та річки Серет нижче дамби (SR).

Відтак, визначення набору маркерів стресу та токсичності продемонструвало відмінності між популяціями корошових риб з водойм нижче та вище дамби ГЕС та контрольної ділянки. Відомо, що ГЕС може завдати серйозних травм риbam і збільшувати їх смертність під час проходження через турбіни. Існуючі дані досліджень впливів ГЕС на водну фауну (Pander et al. 2018; Mueller, Pander, and Geist 2017) були доповнені інформацією про зміни на молекулярному рівні та ознаки прояву окисного стресу, пошкодження ДНК та ендокринні розлади у корошових риб із зарегульованих водойм, які, в першу чергу, пов'язані не з механічними, а з внутрішніми чинниками, зокрема металами чи метаболітами ціанотоксинів. У довгостроковій перспективі ці наслідки можуть призвести до зниження виживання

риб.

Наявність відмінностей між тваринами з КР та контрольної ділянки, які характеризуються схожими умовами, свідчать про присутність у дослідних водоймах й інших пошкоджуючих чинників. У процесі дослідження було встановлено, що особини *C. auratus gibelio*, які жили у водоймі нижче дамби, характеризувалися пригніченням реакцій систем антиоксидантного захисту, що проявлялося як зниження активності антиоксидантних ферментів, рівня оксирадикалів та зменшенням ТБК-АП. Це може бути спричинено двома умовами. В першу чергу – потоком води як фізичним фактором, який, обумовлюючи постійне фізичне навантаження, може впливати на життєдіяльність немігруючих риб, їх поведінку та швидкість обміну речовин (Taylor and Cooke 2012a). Згідно з деякими даними, фізична активність зумовлює надмірне вироблення АФО, що викликає адаптацію активності ферментів-антиоксидантів як у тварин, так і у людини (Poulsen, Weimann, and Loft 1999). Протічна вода значно збільшує активність каталази та концентрацію глутатіону в хвостовому м'язі риб *Gambusia holbrooki* порівняно з стоячими водоймами. Крім того, вплив потоку води підвищує стійкість до шкідливого впливу ультрафіолету (Ghanizadeh-Kazerouni, Franklin, and Seebacher 2017).

Іншою причиною виснаження антиоксидантної системи може бути токсичність купруму та плюмбуму, вміст яких у воді сезонно збільшується нижче дамби, порівняно з точками, розташованими вище неї (Falfushynska et al. 2019). Касперівці розташовані у західній частині України, яка характеризується переважно сільськогосподарською діяльністю. Що стосується тенденцій агросектору, то для обробки полів використовується багато пестицидів та фунгіцидів (у тому числі й ненормовано), де купрум часто виступає як діюча речовина. Токсичність Купруму для біоти зазвичай пов'язана з його потенційною здатністю до продукування АФО та, відповідно, окисним стресом. Окрім того, риби проявляють підвищену чутливість до цього металу (Vieira et al. 2009). Вони часто реагують на дію Купруму виснаженням системи антиоксидантного захисту.

Отримані результати узгоджуються з попередніми. Зокрема, нами було показано, що дія екологічно реальних концентрацій купруму детермінувала прояви окисного стресу у карасів як пригнічення активності Cu, Zn-СОД та Mn-СОД з одночасним зменшенням рівня ТБК-АП (Falfushynska, Gnatyshyna, and Stoliar 2013).

Проте жодна з цих причин не надає вичерпного пояснення відмінностей як від контролю, так і між дослідними групами. Зокрема, наслідки впливу аграрного сектору повинні були б відображатися і у тварин, відібраних з водосховища. Більше того, періодичне відкривання шлюзів забезпечує швидке оновлення води у невеликій, спокійній водоймі нижче дамби, що, навпаки, мало б запобігати накопиченню токсичних ефектів від впливу поллютантів. Схожість ж інших фізико-хімічних параметрів води підтверджує наявність інших, біотичних факторів впливу на рибу.

ОМП є невід'ємним наслідком окисного ушкодження та може служити маркером протеїнів, які потребують заміни (Radak, Chung, and Goto 2008). У більшості еукаріотичних клітин білки руйнуються убіквітин-протеасомною системою, яка відповідає за деградацію багатьох регуляторних, короткоживучих та пошкоджених протеїнів (близько 80-90 %), а також з аутофагію, що, в свою чергу, є першопричиною деградації більшості довгоживучих протеїнів і агрегованих протеїнів та клітинних органел (Mariño et al. 2014). Було показано, що як загальна, так і вільна активність катепсину D, як ключовий фактор у переході від апоптозу до аутофагії в клітині, та карбонілювання протеїнів зростали у тварин групи SR.

Також, зміни активності катепсину D та окисних модифікацій протеїнів корелювали з лактатдегідрогеназною активністю ($r > 0,68$, $p < 0,001$) (рис. 3.4) та утворювали спільний кластер в методі головних компонент. Протягом останнього часу було показано, що лактатдегідрогеназа є ключовим фактором лізосомального шляху апоптозу та аутофагії у метаболічно-дефіцитному мікросередовищі і може виступати як додаткове джерело енергетичних та біосинтетичних ресурсів для клітини (Rabinowitz and White 2010). Але ці дані доведені лише для ракових клітин та нейронів (Pla, Pascual, and Guerri 2016). Аутофагія – це регульований процес,

який активується в стресових ситуаціях, обумовлюючи пошкодження органел або окисний стрес (Levine, Mizushima, and Virgin 2011). Однак роль аутофагії в регуляції загибелі клітин все ще є суперечливою. Деякі дослідження стверджують, що аутофагія є важливим механізмом самозахисту клітини та адаптації до несприятливих умов середовища (Rivera et al. 2014). Ймовірно, що аутофагія у риб з локалі нижче дамби активувалася у відповідь на дію численних зовнішніх стресорів та з метою підтримки клітинного гомеостазу. Взаєморегуляція функцій лізосом, активності лактатдегідрогенази та процесів аутофагії потребує подальших досліджень.

Доведено, що широкий спектр хімічних речовин, серед яких синтетичні естрогени, хлоровані пестициди, фармацевтичні засоби та мікроелементи, можуть впливати та порушувати фізіологічний статус та ендокрині функції тварин і людини. Деякі з цих ксеноестрогенів були виявлені в прісноводних об'єктах, переважно в місцевостях потрапляння муніципальних та аграрних стоків в концентраціях, що перевищують допустимо можливі (Petrovic et al. 2002). В останні десятиліття реєструють численні ефекти впливу ксенобіотиків, які імітують гормони, на репродуктивні порушення та гормональні і метаболічні збої у водних тварин (Segner et al. 2003).

Вітелогенін служить попередником протеїнів жовтка і бере участь у регуляції експресії генів, що відповідають за синтез білка у хребетних тварин. Його рівень у особин чоловічої статі відноситься до верифікованих показників впливу забруднювачів, які мають виражену естрогенну дію. На рівень вітелогеніну можуть впливати не тільки ксеноестрогени, які зв'язуються безпосередньо з рецепторами естрогену, а й хімічні речовини, здатні порушувати рівень гормонів чи спричиняти ураження печінки (Yamamoto et al. 2017). У ряді досліджень підтверджено підвищену концентрацію вітелогеніну в наслідок впливу водних полютантів у самців риб з річок США та Європи (Vermeirssen et al. 2005). В Україні дослідження, присвячені індукції вітелогеніну у чоловічих особин безхребетних та нижчих хребетних, є дуже обмеженими (Falfushynska, Gnatyshyna, and Stoliar 2013), що

підкреслює актуальність цього дослідження. У наших попередніх роботах було продемонстровано, що вищий рівень або експресія вітелогеніну є характерною ознакою забруднення стоками із сільськогосподарських угідь та наслідком проживання тварин у водоймі-охолоджувачі атомної електростанції (Falfushynska et al. 2015; Falfushynska et al. 2017; Falfushynska, Gnatyshyna, and Stoliar 2013). Відтак, збільшення рівня вітелогеніну в плазмі самців карася з водойми нижче дамби свідчить про присутність у середовищі ксеноестрогенів, котрі мають здатність спричиняти шкідливий вплив на біоту.

Незважаючи на очевидні деструктивні зміни в ендокринній системі, за оцінкою холінестеразної активності фізичні, хімічні та біологічні чинники біотопу не зумовлювали порушень нервової системи у всіх досліджуваних груп.

Водні полютанти детермінують появу негативних наслідків на молекулярному, організменному, популяційному і, нарешті, на екосистемному рівні, впливаючи на стан здоров'я організмів і, отже, на біорізноманіття. Серед них мутагенні сполуки визнані найнебезпечнішими, оскільки їх вплив може прослідковуватися і у майбутніх поколіннях. Риби реагують на токсичні речовини подібно до вищих хребетних, що дає можливість оцінити відповідь організму на потенційно небезпечні й для здоров'я людини сполуки (Bolognesi and Hayashi 2011). Мікроядерний тест успішно використовується для оцінки генотоксичності забруднюючих речовин та ксенобіотиків як у польових, так і в експериментальних дослідженнях, незалежно від каріотипу та досліджуваного виду (Falfushynska et al. 2017) і оцінює стійкі пошкодження ДНК, які неможливо відновити (Bombail et al. 2001). Відсутність впливу місцевості існування тварин на рівень фрагментації ДНК можна пояснити високоефективними процесами репарації ДНК. Вища активність каспази 3, як маркера апоптозу, у групах KR та SR та активність катепсину D, як маркера аутофагії, лише у групі SR доповнюють та узгоджуються з вищезазначеними результатами. Існують підтвердження того, що пошкодження ДНК індукує апоптоз та аутофагію для видалення пошкоджених клітин та запобігання геномної нестабільності (Kurelecб Branko et al. 2000).

На сьогодні немає однозначних даних про експресію або концентрацію металотіонеїнів у гідробіонтів, які проживають поблизу ГЕС. Вміст цих білків у травній залозі *Unio tumidus* дещо знижувався у тварин до дамби мікро ГЕС (р. Жванчик), не змінювався до і після дамби Касперівської ГЕС (р. Дністер) у літній період (Gnatyshyna et al. 2020) та зростав більш ніж в 3 рази в тварин нижче дамби цієї ж локації восени (Khoma et al. 2021a). У наших дослідженнях вміст МТ у печінці тварин з сайту SR був нижчий, порівняно з контрольною та KR групами. Водойма SR характеризується більш високим рівнем купруму та плюмбуму, ніж KR (Falfushynska et al. 2019), проте це викликає не індукцію МТ, а їх зменшення. Порівняння одержаних результатів з отриманими нами раніше показує схожість цієї реакції з реакцією МТ риб та молюсків на сильне забруднення водойм та гостре отруєння коропових риб купрумом та манганом (Falfushynska et al. 2015).

Відтак, можна підсумувати, що тварини, які населяють водойми поблизу дамб, виявляють тенденцію до порушень системи антиоксидантного захисту та проявів цитотоксичності порівняно з рибами з референтних водойм. Проте відсутність узгодженості у реакціях як в межах одного виду (Gnatyshyna et al. 2020; Khoma et al. 2021b), так і в міжвидових, свідчить про сумарний ефект впливу кількох пошкоджуючих факторів, одним з яких, ймовірно, виступають токсичні метаболіти ціанобактерій.

РОЗДІЛ 4

ТОКСИЧНІ ЕФЕКТИ ВПЛИВУ *RAPHIDIOPSIS RACIBORSKII* НА КОРОПОВИХ РИБ (*CYPRINUS CARPIO*) В УМОВАХ *IN VITRO*

4.1. Оцінка впливу біоактивних метаболітів *R. raciborskii* на риб (*in vitro*)

Токсичний вплив продукованих ціанобактеріями метаболітів на водну фауну, включаючи безхребетних, зоопланктон та риб, неодноразово ставав предметом токсикологічних досліджень (Ferrão-Filho and Kozłowsky-Suzuki 2011; Zanchett and Oliveira-Filho 2013). Особлива увага приділяється гепатотоксичним циклічним пептидам – мікроцистінам, нейротоксичним алкалоїдам – анатоксинам-а і сакситоксину (STX), та цитотоксичним трициклічним алкалоїдам – циліндроспермопсинам (CYN). Остання сполука та два її природних аналози: 7-епі-CYN та 7-дезоксид-CYN, як відомо, продукуються ціанобактеріями, що належать до порядків *Nostocales* та *Oscillatoriales* (Rzymiski and Poniedzialek 2014). *Raphidiopsis raciborskii* історично є першим ідентифікованим продуцентом і головним фактором присутності токсинів у прісних водах Австралії та Азії (Nguyen et al. 2017). Південноамериканські штами *R. raciborskii* здатні до виділення сакситоксину. Згідно з актуальною інформацією, жоден європейський штам *R. raciborskii* не виробляє відомих на сьогодні ціанотоксинів, незважаючи на ряд досліджень в даному напрямку як на аналітичному, так і на молекулярному рівнях (Rzymiski, Brygider, and Kokociński 2017; Kokociński et al. 2017; Rzymiski and Poniedzialek 2014; Rzymiski et al. 2017).

Разом з тим доведено, що екстракти деяких європейських штамів *R. raciborskii* можуть проявляти ознаки цитотоксичності *in vitro* для лімфоцитів та нейтрофілів людини (збільшення вмісту АФО та продуктів пероксидного окислення ліпідів після 1 год. впливу екстрактів штамів, виділених з польських водойм) (Poniedzialek, Rzymiski, and Wiktorowicz 2014; Rzymiski et al. 2017); клітин яєчників китайського хом'яка К-1 (відтік ЛДГ та збільшення фрагментації ДНК, які були максимально виражені при 3-х годинному опроміненні угорськими штамми з концентрацією екстракту 7,4 мг/мл) (Antal et al. 2011); первинних гепатоцитів щурів, клітин

людської гепатобластоми та аденокарциноми товстої кишки людини (німецькі штами) (Fastner et al. 2003); а також викликають ураження печінки та селезінки у гризунів (Briand et al. 2003), інгібують активність холінестерази, пригнічують харчову активність та ініціюють летальність у ракоподібних (*Thamnocephalus platyurus* та *Daphnia magna*) та затримку ембріогенезу *Danio rerio* (угорські штами при концентрації екстрактів в діапазоні 0,397-0,917 мг/мл) (Smutná et al. 2017).

Евтрофікація та глобальне потепління разом із фенотипічною пластичністю та алелопатичними впливами сприяють подальшому поширенню *R. raciborskii* у регіони Східної Європи, тому визначення його токсичного впливу на риб залишається нагальною потребою. Це питання стає особливо актуальним через здатність *R. raciborskii* продукувати досі неідентифіковані метаболіти, котрі можуть призводити до масової смертності риб (прісноводна водойма в Угорщині, озеро Александровац в Сербії) (Svirčev et al. 2016).

Тому нами було досліджено токсичність клітинних екстрактів штамів *R. raciborskii*, виділених співробітниками Познанського медичного університету (Польща) з водойм Польщі та України (табл. 4.1), з використанням ізольованих гепатоцитів та еритроцитів коропа звичайного (*Cyprinus carpio*) в умовах *in vitro*.

Таблиця 4.1

Походження штамів *R. raciborskii*

Штам	Локаль	Координати	Відбір зразків
PL1	Озеро Віскупінське, Польща	52°47'30"N 17°44'44"E	Серпень 2017
PL2	Озеро Вініарі, Польща	52° 32' 46"N 17° 36' 36"E	Серпень 2017
PL3	Озеро Грилевське, Польща	52°53'07"N 17°15'04"E	Серпень 2017
PL4	Озеро Зніске Майє, Польща	52°50'11"N 17°42'56"E	Серпень 2017
UA1	Касперівське водосховище, Україна (KR)	49°57'35" N 25°56'55"E	Серпень 2017

UA2	Річка Серет, Україна (SR)	49°57'64"N 25°56'22"E	Серпень 2017
UA3	Річка Серет, Україна (SR)	49°57'64"N 25°56'22"E	Вересень 2017

Безклітинні екстракти штамів *R. raciborskii* були приготовані з клітинної суспензії, що містила в середньому 6250 трихом на мл відповідно до процедури ультразвукової обробки, описаної в (Rzymiski et al. 2017). Відповідно до протоколу, живі трихоми переносили на нове стерильне середовище BG-11 для оновлення культур та зменшення кількості бактерій нижче 1 %, щоб мінімізувати бактеріальне зараження. Повний клітинний лізис підтверджувався мікроскопічним дослідженням. Суспензії клітин центрифугували (12 000 g, 10 хв), отримані супернатанти після фільтрації використовували для аналізів.

Клітини інкубували в присутності досліджуваних екстрактів за концентрації 1 та 10 мкл/мл протягом 2 годин при 20 °С. Панель біомаркерів включала показники окисного стресу, пулу клітинних тіолів, пошкодження ДНК та апоптоз як потенційні мішені токсичного впливу ціанотоксинів на організм риб. Крім того, вивчалися потенційні нейротоксичні ефекти шляхом визначення активності холінестерази у гомогенаті тканини мозку коропа.

Результати досліджень свідчать, що реакція показників окисного стресу на вплив екстрактів *R. raciborskii* залежала від походження штаму. Рівень внутрішньоклітинних АФО збільшувався при дії всіх екстрактів, окрім екстракту UA1 при концентрації 1 мкл/мл. Реакція КАТ відрізнялася в залежності від подразника і його концентрації: активність ферменту зростала пропорційно концентрації (PL2 та 3), не змінювалася чи зростала при 10 мкл/мл (PL4) чи зменшувалася при збільшенні концентрації екстрактів (PL1, UA3) (рис. 4.1). У свою чергу, вплив усіх екстрактів у концентрації 1 та 10 мкл/мл призводив до значного збільшення вмісту ТБК-АП та ОМП (рис. 4.1, дод. 2, табл. 2-3).

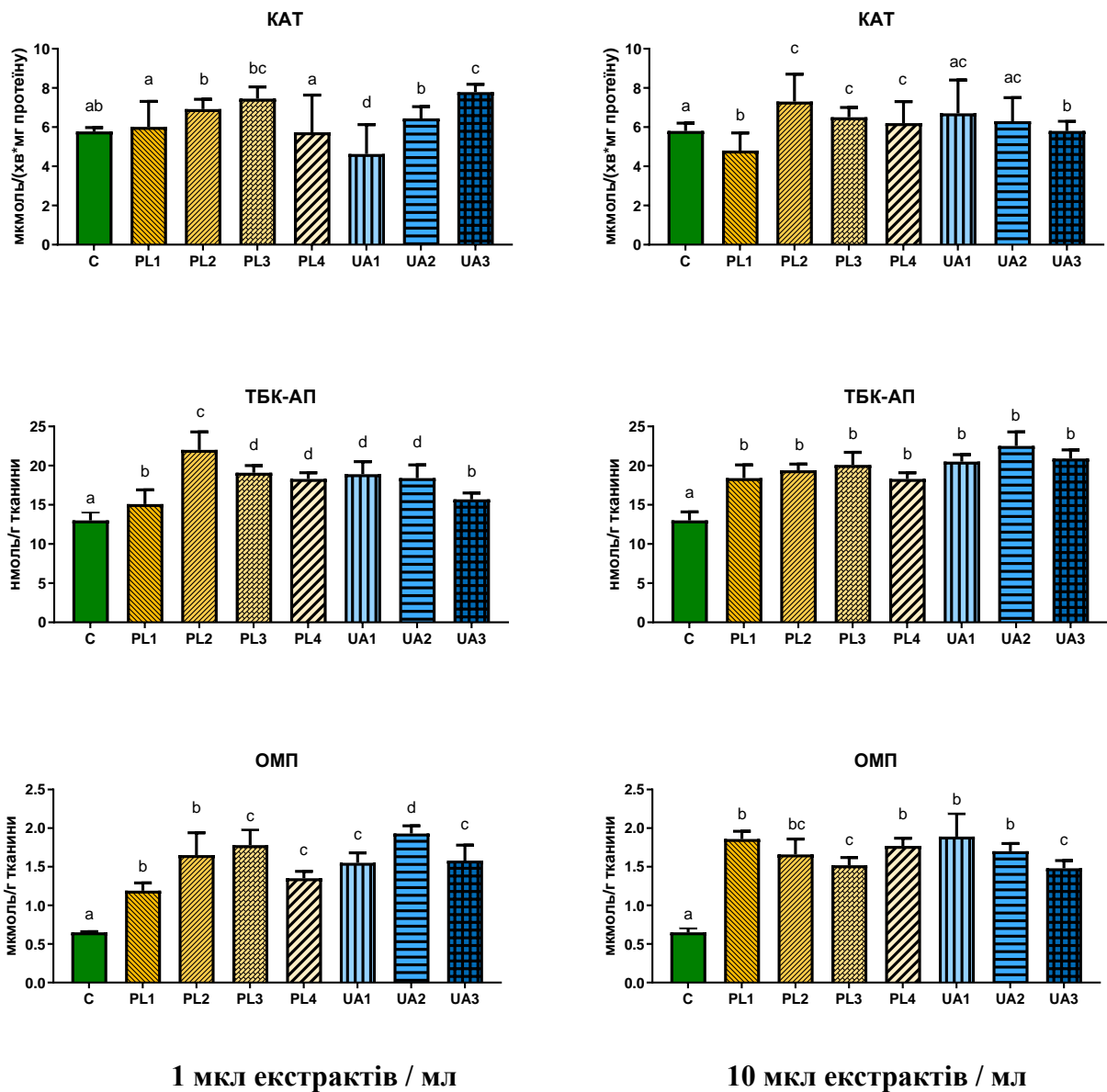


Рис. 4.1: Показники оксного стресу у гепатоцитах *C. carpio* за впливу екстрактів штамів *R. Raciborskii* із водойм Західної Польщі (PL 1-4) та Західної України (UA1-3) (n = 8): **КАТ** – активність каталази; **ТБК-АП** – перекисне окислення ліпідів; **ОМП** – окисні модифікації протеїнів. Однакові літери позначають невірні відмінності між досліджуваними групами ($p > 0,05$)

Вплив екстрактів на рівень GSH також залежав від локалізації походження штаму. При низьких концентраціях (1 мкл/мл) штами з польських водойм не впливали на рівень GSH, при більш високих – його рівень значно збільшувався, зокрема при дії CR-PL4. За впливу екстрактів з водойм Зх. України вміст GSH

змінювався обернено пропорційно до концентрацій. Активність GST в гепатоцитах знижувалася після впливу як низьких, так і високих концентрацій екстрактів ціанобактерій, за винятком PL4 (1 мкл/мл), який викликав протилежний ефект. Вміст МТ змінювався не синхронно – зменшувався за дії екстрактів українських штамів, тоді як штами польського походження викликали збільшення їх кількості, особливо при дії нижчих концентрацій (рис. 4.2, дод. 2, табл. 2-3).

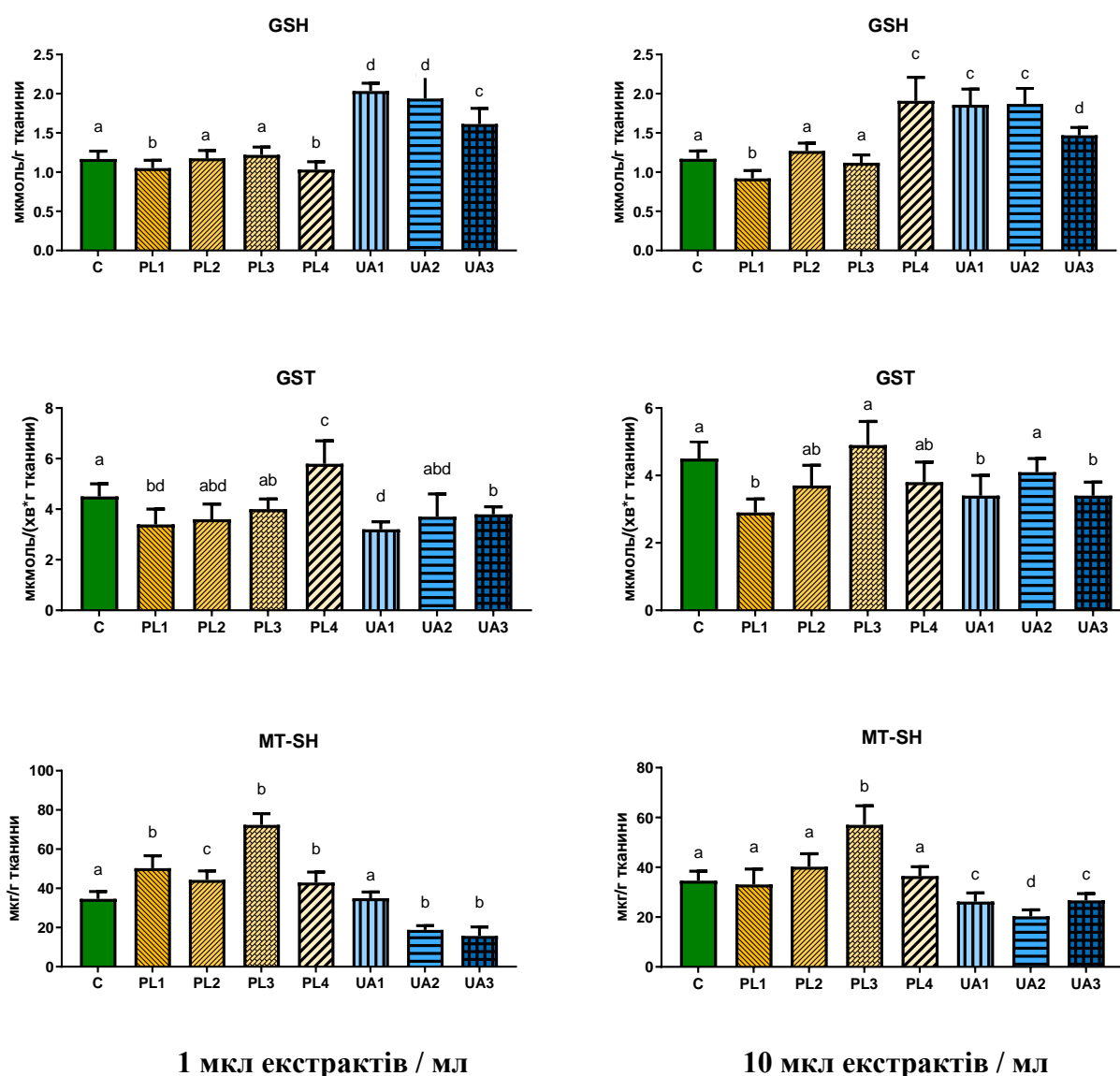


Рис. 4.2: **GSH** – загальний вміст глутатіону; **GST** – активність глутатіон-S-трансферази; **MT-SH** – вміст металотіонеїнів у гепатоцитах *C. carpio* за впливу екстрактів штамів *R. raciborskii* із водойм Західної Польщі (PL 1-4) та Західної України (UA1-3) (n = 8). Однакові літери позначають невірогідні відмінності між досліджуваними групами (p > 0,05)

Усі екстракти спричиняли посилення фрагментації ДНК за концентрації 10 мкл/мл, тоді як для нижчих концентрацій екстрактів значимий вплив на стабільність геному проявлявся лише для штамів PL4, UA1 та UA2.

Активність каспази-3 зростала у гепатоцитах, які піддавалися впливу всіх екстрактів (незалежно від концентрації), за винятком UA2. Найбільш істотно цей показник підвищувався при дії нижчої концентрації UA3.

Експозиція гомогенату мозку з обома концентраціями екстрактів досліджуваних штамів призводила до зростання активності холінестерази. У всіх випадках збільшення активності корелювало з концентрацією дослідних чинників, за винятком UA2, де цей показник практично не змінювався.

Стійкість лізосомальних мембран у еритроцитах коропа, виміряна за часом утримання нейтрального червоного (NR), була незмінною за дії більшості екстрактів ціанобактерій, незалежно від їх концентрації. Лише екстракт UA1 при впливі обох досліджуваних концентрацій спричинив значне зменшення часу утримування барвника, що є верифікованою ознакою цитотоксичності (рис 4.3, дод. 2, табл. 2-3).

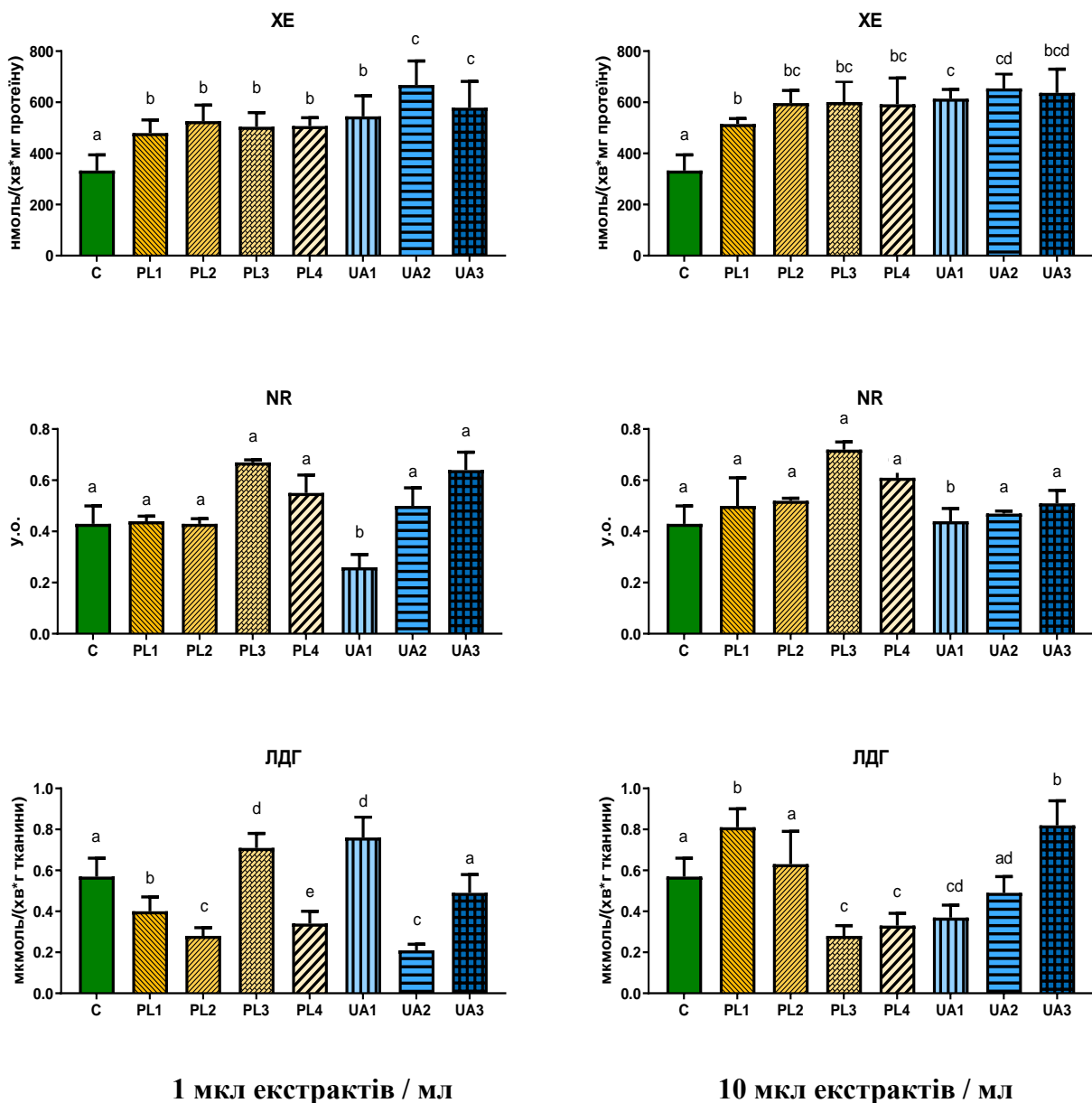


Рис. 4.3: NR – стабільність лізосомальних мембран еритроцитів; XE – активність холінестерази у мозку; ЛДГ – активність лактатдегідрогенази у гепатоцитах *C. carpio* за впливу екстрактів штамів *R. raciborskii* із водойм Західної Польщі (PL 1-4) та Західної України (UA1-3) (n = 8). Однакові літери позначають невірні відмінності між досліджуваними групами (p > 0,05)

Деякі види ціанобактерій та їх метаболіти можуть впливати на стан здоров'я (*health status*) риб, проявляючи пошкодуючу дію щодо молекулярних систем печінки, нирок, зябер, кишечника та м'язів. Це також було показано для CYN та

SXT, токсинів, котрі продукуються певними штамми *R. raciborskii* (Remedios Guzmán-Guillén et al. 2017). Проте попередньо не було доведено, що європейські штамми можуть виробляти циліндропермопсин та сакситоксин чи володіють повноцінними кластерними генами, відповідальними за них. Одержані нами результати довели, що деякі штамми *R. raciborskii* можуть виробляти метаболіти, які потенційно здатні впливати на прісноводних риб. Побічні ефекти в клітинах при дослідженнях *in vitro* були відмічені вже при концентраціях екстракту, що відповідають низькій щільності клітин (6-62 клітин на мл) та часто зустрічаються в природі (Rzymiski et al. 2018; Kokociński et al. 2013).

У природному середовищі ефекти впливу різних штамів одного і того ж виду ціанобактерій можуть накладатися на дії інших бактеріальних угруповань. У зв'язку з цим при вирощуванні культур *R. raciborskii* з різних водойм було вжито ряд заходів для мінімізації бактеріального зараження. Відтак, спостережувані у коропа ефекти екстрактів ціанобактерій на молекулярному рівні у коропа можна пов'язати виключно з метаболітами (наразі неідентифікованими), котрі виробляються ціанобактеріями. Ці висновки важливі для оцінки екологічного ризику, особливо, якщо врахувати, що, як очікується, *R. raciborskii* розширить свій ареал в Європі в умовах глобального потепління та внутрішньої евтрофікації (Rzymiski and Poniedziałek 2014), а його цвітіння розглядається як потенційна причина масової загибелі риби, включаючи *C. carpio* (Svirčev et al. 2016). Одержані результати також підкреслюють зростаючу потребу в застосуванні заходів раннього моніторингу в місцях комерційного розведення риб, особливо через те, що в деяких регіонах Європи вже спостерігалось вторгнення *R. raciborskii* у промислові водойми для розведення коропа (Cvijan and Fuzinato, 2011) та аквакультури в Центральній Європі. Це особливо актуально для Польщі та України, де промислове вирощування коропа займає вагомий частку виробництва.

Вважають, що різні метаболіти ціанобактерій та їх екстракти викликають продукування активних форм кисню у клітинах (Rzymiski and Poniedziałek 2014), що також було підтверджено у даному дослідженні. Хоча вплив досліджуваних

екстрактів не викликав синхронного збільшення чи зменшення активності каталази, проте в усіх випадках спостерігалось значне збільшення кінцевих продуктів окисного стресу в гепатоцитах риб, зокрема пероксидного окиснення ліпідів, пошкодження ДНК та окисних модифікацій протеїнів. У першому випадку – це каскадна реакція, яка може призвести до пошкодження біологічних мембран та генерувати два продукти: малоновий диальдегід та 4-гідрокси-2-ноненал, обидва з яких відомі своєю генотоксичністю. Генотоксичні ефекти, визначені як фрагментація ДНК, можуть бути викликані безпосередніми реакціями АФО з нуклеїновими кислотами. ОМП, які вказують на пошкодження білків, відображають ураження клітин, індуковане множинними формами оксирадикалів.

Окисне пошкодження ліпідів, протеїнів та нуклеїнових кислот може призводити до запускання механізмів апоптозу, що підтверджується зростанням активності каспази-3 в гепатоцитах за впливу більшості досліджуваних екстрактів в обох концентраціях. У еритроцитах цитотоксичний ефект був виявлений лише за дії екстракту одного з штамів з українських водойм, котрий спричинив зменшення часу утримування нейтрального червоного, що є свідченням дестабілізації лізосомальних мембран – класичного параметра клітинного стресу внаслідок підвищення рівня АФО (Lowe, Soverchia, and Moore 1995). Таким чином, токсичні ефекти, що викликаються дослідженими штамми, можуть бути не тільки специфічними для штамів, але й залежати від клітин-мішеней. Встановлено, що деякі відомі ціанотоксини використовують лише специфічні мембранні рецептори. Подальші дослідження необхідно проводити у напрямку вивчення хімічної структури досі невідомих токсичних сполук, продукованих європейським *R. raciborskii*, для глибшого вивчення їх фармакодинаміки.

Проведені аналізи продемонстрували вплив досліджуваних екстрактів *R. raciborskii* на клітинний пул тіолів. Наскільки нам відомо, це перше дослідження, яке показало, що екстракти європейських штамів рафідіопсіса у коропових риб можуть викликати зміни, пов'язані з МТ. МТ відносяться до групи низькомолекулярних, внутрішньоклітинних, багатих на цистеїн, метало-

хелаторних білків з широким спектром функцій, серед яких гомеостатична регуляція іонів есенціальних металів, детоксикація перехідних металів та скавенджирування активних форм кисню (Miles et al. 2016; Maret 2011). Вони можуть зменшувати негативний вплив металів і послаблювати окисний стрес (Falfushynska et al. 2015; Falfushynska, Gnatyshyna, and Stoliar 2013). Завдяки здатності різних ціанотоксинів індукувати посилене утворення АФО, можна також очікувати, що вони впливатимуть на синтез МТ, як елемента системи антиоксидантної відповіді. Низкою авторів показано, що метаболітами ціанобактерій, переважно мікроцистином, може бути змінений рівень МТ у водних організмів, зокрема у райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*) та *Daphnia pulex* (Gélinas, Juneau, and Gagné 2012). У даному дослідженні показано, що рівень МТ в гепатоцитах *C. carpio* може зростати у відповідь на вплив екологічно значимих концентрацій екстрактів (включаючи мінімальну в 1 мкл/мл), що свідчить про потенційну захисну реакцію, яка потребує подальшого підтвердження. Як показано в попередніх дослідженнях, токсичність мікроцистину може бути частково нівельована тіолвмісними сполуками, зокрема глутатіоном GSH. Між вмістом МТ та GSH у гепатоцитах коропа існує обернена кореляція ($r = -0,44$, $p < 0,05$). Важливо, що вплив більшості екстрактів *R. raciborskii* призвів до зниження регуляції активності GST. Як показано, цей фермент відіграє ключову роль у детоксикації та біотрансформації токсинів ціанобактерій, у тому числі мікроцистинів (Jiang et al. 2012). Незважаючи на те, що досліджені штами *R. raciborskii* не продукують мікроцистини, пригнічення GST може впливати на здатність знешкоджувати досі невідомі метаболіти та потенційно збільшувати ризик для здоров'я риб.

Результати цього дослідження узгоджуються з висновками попередніх досліджень на клітинах ссавців, які демонструють, що європейські штами екстрактів *R. raciborskii* містять сполуки, які виявляють токсичність *in vitro* (Rzymiski et al. 2017). Окрім того, як свідчить використання експериментальної моделі молюсків, штами, виділені з Угорщини, виробляють ще невстановлений нейротоксичний метаболіт, що викликає анатоксиноподібні реакції, модулюючи

рецептори ацетилхоліну у нейронах. Було продемонстровано, що екстракти штамів *R. raciborskii*, виділені як із Західної Польщі, так і з України, викликають значне збільшення холінергичної активності в гомогенатах мозку коропа звичайного, що свідчить про їх потенційну здатність містити сполуки, котрі можуть викликати зміщення гомеостазу ацетилхоліну / холіну. Це, в свою чергу, призводить до швидкої деградації ацетилхоліну та подальшої пониженої регуляції холінергичної активності, що спричиняє несприятливий вплив на когнітивну функцію (Soreq 2001). Ці висновки підтверджують думку про те, що досліджувані штами виробляють нейротоксичні сполуки, що формує потребу в подальших аналітичних дослідженнях та поглибленій оцінці їх нейротоксичної загрози для людини. Слід зазначити, що в цьому дослідженні активність холінергичної активності була підвищена при концентрації екстракту до 1 мкл/мл. Це ілюструє той факт, що досліджувані штами *R. raciborskii* можуть впливати на центральну нервову систему риб, а їх метаболіти – проникати через гематоенцефалічний бар'єр.

4.2. Цитотоксичність синтетичних аналогів циліндропермопсину

Для розширення розуміння механізмів токсичного впливу циліндропермопсину та розмежування дії токсину й інших метаболітів ціанобактерій було досліджено аналоги циліндропермопсину, синтезовані у Бангорському університеті (Велика Британія), люб'язно передні нам для подальших досліджень в результаті співпраці між 3 університетами.

Попередні дослідження встановили роль урацилового та гуанідинового компонентів та гідроксильної групи у токсичності, спричиненій СYN. Стереохімія гідроксильної групи при C7 або наявність сульфатної групи не мають суттєвого впливу на токсичність циліндропермопсину. Так само постульовано, що урацилове кільце є головним у прояві біологічної активності СYN 1. При порівнянні біоактивності синтетичних аналогів, лише ті, що мають гідроксильну групу при C7, демонстрували значну токсичність для клітин людини (Evans and Murphy 2011). Найбільшу токсичність виявляла сполука 11с, яка має 6-вуглецевий

ланцюг, що розділяє компоненти гуанідину та урацилу. Така довжина зв'язуючого ланцюга дає змогу приймати аналогічну до CYN 1 конформацію, як і 4-вуглецевий ланцюг, оскільки сполука 11a володіє подібною активністю. Сполуки з карбоновим ланцюгом довжиною у 5 атомів (11b) виявляли значно нижчу біоактивність.

З метою подальшого дослідження властивостей були підготовані аналоги, в яких кожна з цих функціональних груп чи компонент, за винятком урацилу, була усунена або модифікована. Таким чином були синтезовані наступні речовини: **11a-c** CYN 1 (Runnegar et al. 2002), в яких трициклічний фрагмент відсутній, а циклічний ланцюг приєднує гуанідинову частину молекули до гідроксиметилурацилу; трициклічний аналог **12**, в якому не вистачало сульфатної та гідроксильної функціональних груп, знайдених у CYN 1; **13**, у якої відсутні функціональна гідроксильна група та гуанідинідиновий компонент; **14**, у якої відсутня лише гідроксильна функціональна група; **15**, в якій відсутній гуанідиновий компонент. Для імітації катіонної природи гуанідину, він був замінений на аміно-групу (рис. 4.4).

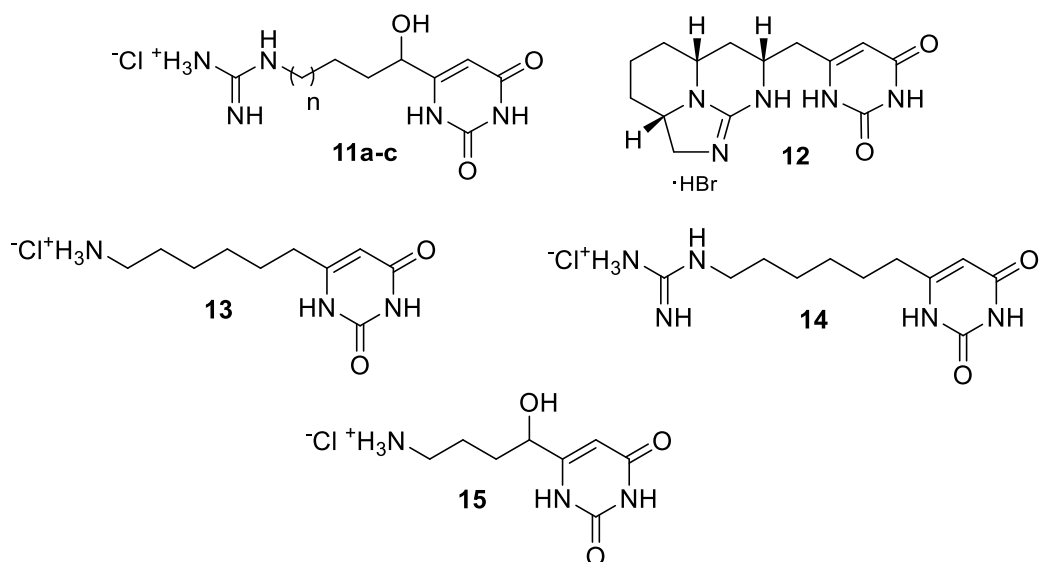


Рис. 4.4: Синтезовані аналоги циліндропермопсину (Evans and Murphy 2011)

Для перевірки токсичності цих сполук була використана експериментальна модель *in vitro* з використанням гепатоцитів коропа звичайного (*Cyprinus carpio*). Як було встановлено, всі досліджені аналоги CYN (13-15, 11a та 11c) викликали

збільшення рівня активних форм оксигену, пероксидного окиснення ліпідів та окисних модифікацій протеїнів, що свідчить про появу ознак окисного стресу (рис. 4.5).

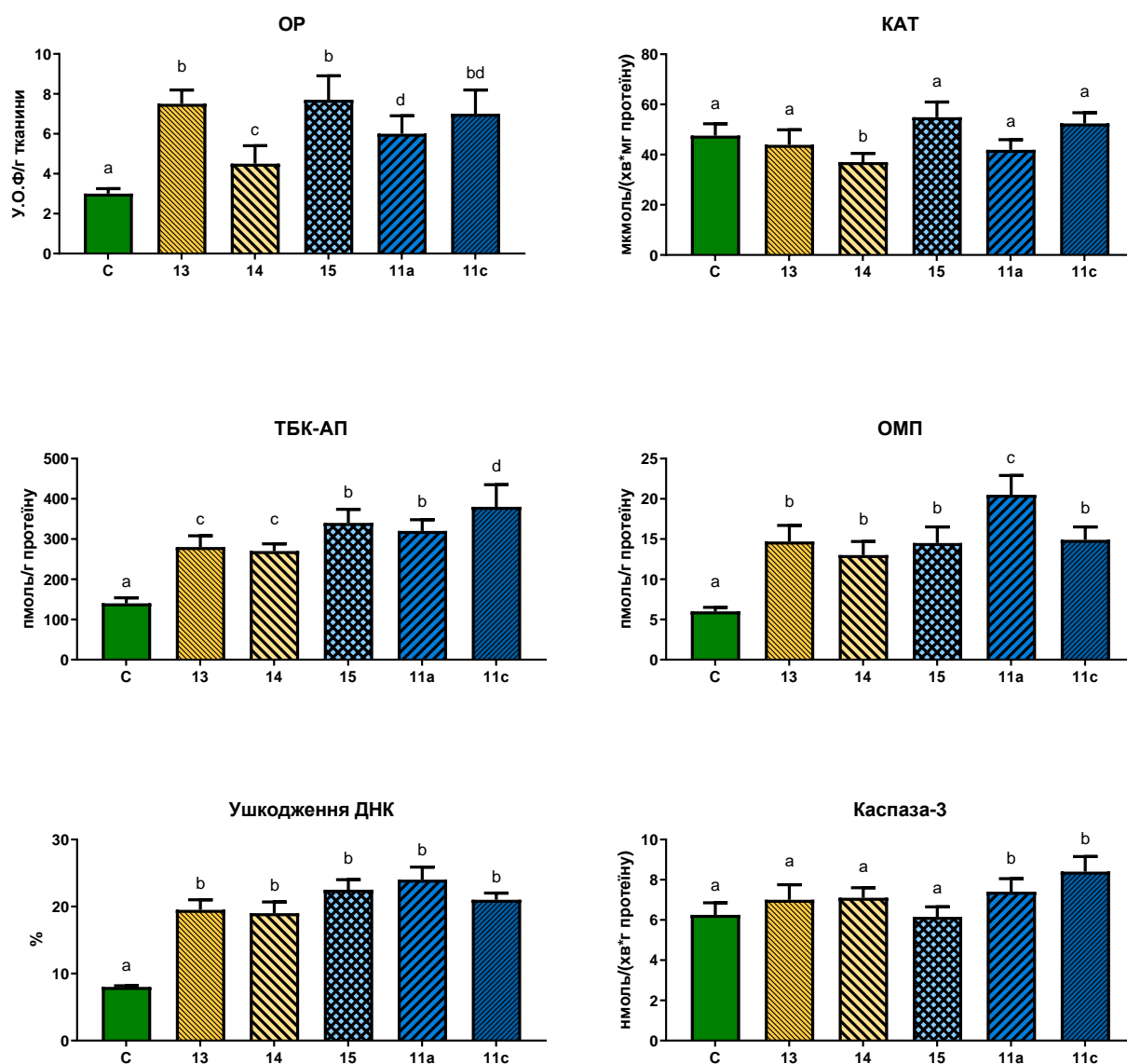


Рис. 4.5: Показники окисного стресу та цитотоксичності у гепатоцитах *C. carpio* за впливу синтезованих аналогів циліндроспермопсину ($n = 8$): **OP** – утворення активних форм оксигену; **KAT** – активність каталази; **ТБК-АП** – перекисне окиснення ліпідів; **ОМП** – окисні модифікації протеїнів, **ДНК** – розриви ланцюгів ДНК, **Каспаза-3** – активність каспази-3. Однакові літери позначають невірні відмінності між досліджуваними групами ($p > 0,05$)

Очевидно, можна зробити висновок, що всі сполуки можуть проникати через клітинну мембрану, і, незважаючи на попередні припущення, гідроксильні та гуанідинові структурні елементи не обов'язково відіграють при цьому головну роль. Найбільше зростання вмісту ТБК-АП і ОМП спостерігалось після впливу на гепатоцити зразків 11с та 11а відповідно. З набору тестованих сполук саме ці два аналоги викликали найбільш подібну реакцію до природного СҮН. Розглядаючи відмінності клітинних відповідей, що спостерігалися після впливу різних аналогів, можна зробити висновок, що гідроксильні та гуанідинові компоненти відіграють додаткову роль у токсичності СҮН.

Усі сполуки спричиняли збільшення фрагментації ДНК, хоча лише 11а та 11с викликали збільшення активності каспази-3 – маркера апоптозу, який, як відомо, активується в токсичних умовах, обумовлених СҮН (Poniedziałek et al. 2015; Poniedziałek, Rzymiski, and Wiktorowicz 2014).

Загалом, аналог 14 (містить гуанідинову частину, але не містить гідроксильної групи) викликав найменше, порівняно з іншими дослідними зразками, збільшення концентрації активних форм кисню, і, на відміну від інших сполук, не підвищував активності каталази. За допомогою методу головних компонент доведено, що за ознаками відповіді група показників за впливу аналога №14, утворює спільну групу з контролем уздовж осі PC2, тоді як усі інші ефекти, викликані іншими аналогами, утворюють угруповання, розміщені протилежно (рис. 4.6). Це узгоджується з попередніми висновками (Cartmell et al. 2017), згідно з якими синтетичний аналог 12 і природний дезокси-СҮН 3 за реакціями подібні до природного СҮН, але не мають гідроксильної групи та виявляють нижчу активність. Аналогічно, природний дезокси-СҮН 3 має значно нижчу токсичність, очевидно, через відсутність гідроксильної функціональної групи.

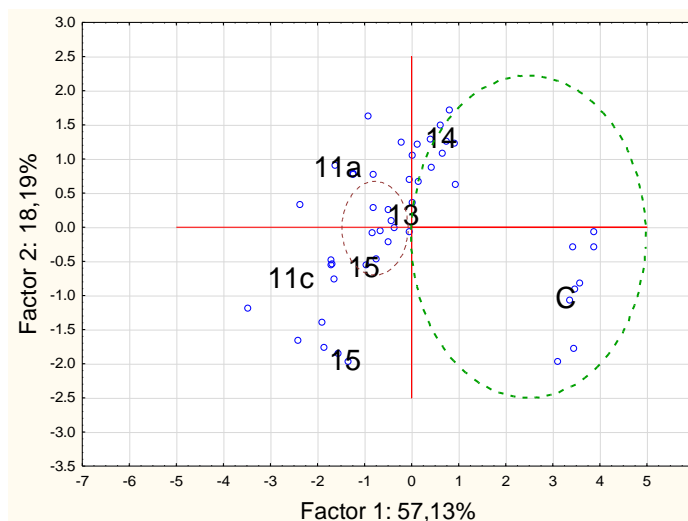


Рис. 4.6: Результати інтегрального аналізу показників гепатоцитів коропа за впливу синтезованих аналогів циліндроспермопсину

Сполуки 15 (відсутній гуанідин) та 13 (відсутні гідроксил та гуанідин) викликали подібну реакцію в різних тестах, хоча 15-та мала більший вплив на ініціацію окисної деструкції ліпідів. Це може вказувати на те, що протонований амін є ефективним сурогатом для протонованого гуанідину, а наявність позитивно зарядженого іона в цій частині молекули є необхідною для активності, як це спостерігалось в інших синтетичних аналогах (Runnegar et al. 2002). Однак найбільше зростання цього параметра було виявлено за впливу 11c (рис. 4.4). Таким чином можна підсумувати, що і гуанідиновий компонент, і гідроксильна група відіграють роль у токсичності SYN, а їх взаємодія відповідає за загальний рівень ефекту впливу цього ціанотоксину на клітини.

Слід зазначити, що в роботі застосовувалися однакові масові концентрації кожного аналога, і, внаслідок різниці в їх молекулярних масах, молярні концентрації, дії яких піддавалися клітини, незначно варіювали. Однак гіпотеза про те, що збільшена кількість молекул може посилити токсичну дію, не виправдана, оскільки аналог 11c з найвищою молекулярною масою за деякими параметрами виявився найбільш потужним токсикантом.

Можливо, що пов'язані з гуанідином NH-групи, гідроксил та урацил, які є проксимальними у досліджуваних молекулах, можуть взаємодіяти через внутрішньомолекулярні водневі зв'язки, і ці функціональні групи мають

можливість формувати специфічні взаємодії зі своїми біомолекулярними мішенями. Потенційно це може сприяти зниженню полярності середовища, роблячи молекули більш ліпофільними і збільшуючи мембранну проникність (Kuhn, Mohr, and Stahl 2010), тим самим призводячи до підвищеної цитотоксичності та посилення окисного стресу.

РОЗДІЛ 5

**ВИЗНАЧЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ ХАРЧОВИХ ДОБАВОК НА ОСНОВІ
ХЛОРЕЛИ І СПІРУЛІНИ ЗА РЕАКЦІЯМИ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ
*DANIO RERIO (IN VIVO)***

Як було продемонстровано вище, ціанобактерії здатні продукувати не тільки ціанотоксини, а й інші біологічно активні вторинні метаболіти, котрі можуть впливати на організми. До цієї групи, зокрема, належать поліметокси-1-алкени (ПМА) – ліпофільні сполуки, які спершу були ідентифіковані в ціанобактерій *Tolypothrix conlutinate*, а пізніше – і в інших прісноводних мікробіодоростей, включаючи ціанобактерії (*Aphanizomenon ovalisporum*, *Aphanizomenon gracile*, *Raphidiopsis raciborskii*, *Anabaena sp.*, *Nostoc sp.*, *Microcystis sp.*, *Pseudanabaena sp.*, *S. ocellatum* та *S. mirabilum*) та зелені водорості (*Pediastrum sp.* та *Scenedesmus sp.*) (Jaja-Chimedza et al. 2015; 2012; Mynderse and Moore 1979). При цьому варто зазначити, що частки *A. gracile* та *R. raciborskii* серед ціанобактерій Касперівського водосховища у вересні 2017 року становили 7,4 і 9,2 % відповідно. Загалом на сьогодні відомо чотири типи ПМА, які відрізняються між собою довжиною карбонового ланцюга (рис. 5.1). Тератогенний ефект цих сполук був продемонстрований на експериментальній моделі ембріонів *Danio rerio* (Jaja-Chimedza et al. 2015; 2012), однак на моделях гризунів *in vivo* жодних несприятливих ефектів від впливу добавок хлорели або спіруліни не спостерігалось (Pankaj 2015).

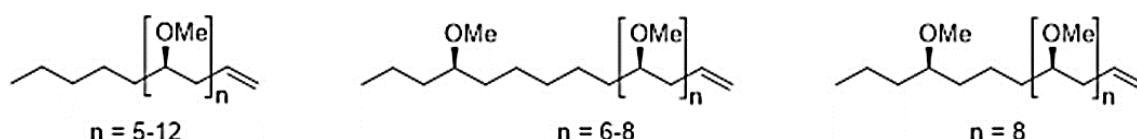


Рис. 5.1: Відомі на сьогодні виділені з ціанобактерій та зелених водоростей поліметокси-1-алкени (Henaо et al., 2020)

З іншого боку, протягом останнього часу зростає інтерес до харчових добавок на основі мікроводоростей, зокрема хлорели *Chlorella sp.* та спіруліни *Arthrospira sp.* Вважається, що споживання харчових добавок на основі біомаси Хлорели чи Артроспіри не пов'язане з ризиками для здоров'я (García, de Vicente, and Galán 2017). Проте існує низка повідомлень стосовно підвищеного вмісту токсичних металів, металоїдів та ціанотоксинів у добавках на основі мікроводоростей, що, найімовірніше, пояснюється низькою якістю виробничого процесу: забрудненням культурального середовища, хімічними методами збирання біомаси, приступністю культур токсикогенних видів ціанобактерій (Rzymiski, Budzulak, et al. 2019). Спостережувані побічні ефекти переважно включали легкі шлунково-кишкові подразнення, наприклад діарею, нудоту, спазми в животі або блювоту (Marles et al. 2011). Хоча зелені мікроводорості є потенційним продуцентами ПМА, їх наявність у біологічних добавках на основі цих водоростей ніколи не піддавалася дослідженню.

Тому нашою подальшою метою стало дослідження вмісту ПМА в харчових добавках хлорели і спіруліни та оцінка токсичності виділених з них ліпофільних фракцій в зв'язку з потенційним ризиком такого шляху отруєння для людини. Через обмежену кількість фракцій, які були виділені з комерційних зразків харчових добавок працівниками Бангорського університету (Велика Британія), об'єктом досліджень було обрано акваріумну рибу родини коропових Данію реріо (*Danio rerio*). Невеликі розміри даніо зробили її зручним об'єктом для продовження досліджень на коропових рибах, а популярність використання даного об'єкта заперечила можливість співставлення одержаних результатів з опублікованими раніше даними (Jaja-Chimedza et al. 2012; 2015; Berry et al. 2016). Для виявлення потенційних токсичних ефектів окремих фракцій харчових добавок було проведено тести на визначення тератогенності у ембріонах, окисного стресу і генотоксичності у тканинах печінки та нейротоксичності у мозку дорослих особин *D. rerio*.

Ідентифікація поліметокси-1-алкенів у харчових добавках

У процесі дослідження було перевірено 10 харчових добавок на основі хлорели (C1–C10) та 13 – на основі спіруліни (S1–S13), випадковим чином придбаних у інтернет-магазинах. Критеріями вибору були офіційна реєстрація як харчової добавки, форма таблетки чи порошку та країна походження, зафіксована на етикетці (табл. 5.1). Відібрані зразки перевіряли на наявність ПМА за допомогою мас-спектрометрії після їх екстрагування у CHCl_3 , сушіння у *high vacuum*, фракціонування з використанням хроматографії на силікагелі та елюювання з поступовим градієнтом етилацетату в бензені до наступних концентрацій: 10 %, 20 %, 40 % та 100 % (Henaо et al., 2020). Через відсутність стандартів та бази даних стосовно виявлення ПМА за допомогою мас-спектрометрії (Jaja-Chimedza et al. 2015; 2012), визначення проводили у всіх досліджуваних фракціях. Аналіз спрямувався на ідентифікацію відомих ПМА та наявність потенційних гомологічних сполук, які містять зайві $[-\text{CH}=\text{CH}-]_n$, $[-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OMe})-]_n$ або $[-\text{CH}_2-\text{CH}_2-]_n$ фрагменти. В досліджуваних зразках не було ідентифіковано жодну з цих молекул, а аналіз основних піків не корелював з будь-якими потенційно пов'язаними структурами (Henaо et al., 2020).

Таблиця 5.1

Загальна характеристика досліджуваних харчових добавок на основі хлорели (n = 10) та спіруліни (n = 13)

Умовне позначення	Вид (згідно даних на етикетці)	Країна походження	Форма випуску
Хлорела			
C1	<i>Chlorella sp.</i>	Китай	Таблетки
C2	<i>Chlorella vulgaris</i>	Тайвань	Таблетки
C3	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Японія	Таблетки
C4	<i>Chlorella sp.</i>	Індія	Таблетки
C5	<i>Chlorella sp.</i>	Китай	Порошок
C6	<i>Chlorella sp.</i>	Китай	Порошок
C7	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Китай	Порошок
C8	<i>Chlorella vulgaris</i>	Китай	Порошок
C9	<i>Chlorella vulgaris</i>	Португалія	Порошок
C10	<i>Chlorella vulgaris</i>	Китай	Таблетки

Спіруліна			
S1	<i>Spirulina</i> sp.	Китай	Порошок
S2	<i>Spirulina</i> sp.	Китай	Порошок
S3	<i>Spirulina</i> sp.	Китай	Порошок
S4	<i>Spirulina platensis</i>	Китай	Порошок
S5	<i>Spirulina</i> sp.	Тайвань	Порошок
S6	<i>Spirulina pacifica</i>	США	Таблетки
S7	<i>Arthrospira platensis</i>	Китай	Порошок
S8	<i>Spirulina platensis</i>	Китай	Таблетки
S9	<i>Spirulina</i> sp.	Китай	Таблетки
S10	<i>Spirulina maxima</i>	Китай	Таблетки
S11	<i>Spirulina</i> sp.	Китай	Таблетки
S12	<i>Spirulina</i> sp.	Китай	Таблетки
S13	<i>Spirulina</i> sp.	Індія	Порошок

Ліпофільні фракції (100 % етилацетат), екстраговані з харчових добавок хлорели (С1–С10) та спіруліни (S1–S13), використовувались для перевірки тератогенності на ембріонах, окисного стресу та генотоксичності в тканинах печінки, генотоксичності в еритроцитах та нейротоксичності у мозку дорослих особин *Danio rerio*.

Оцінка тератогенності ліпофільних фракцій

Усі контрольні ембріони *D. rerio* (як у трис-буфері, так і в трис-буфері + 0,19 % етанолу) відповідали критеріям прийняття: > 90% виживання та нормальний розвиток протягом 120 год експерименту. Вплив ліпофільних фракцій харчових добавок на основі хлорели та спіруліни не спричиняв жодного спостережуваного ефекту на показники виживання та формування структур ембріонів, за винятком двох випадків – С1 та С9 (табл. 5.2). При дії цих зразків були виявлені викривлення хорди, однак цей ефект спостерігався лише після 96 годин впливу.

Таблиця 5.2

Тератогенний ефект ліпофільних фракцій харчових добавок на основі хлорели (С1–С10) на ембріони *Danio rerio* (n = 6) при статичному впливі протягом 120 год.

Дефект розвитку	Зразок										
	CTRL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Коагуляція яєць	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Вади розвитку голови	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Вади розвитку очей	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Деформація хорди	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Вади розвитку хвоста	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Вади розвитку яєчного жовтка	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Затримка росту	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Викривлення хорди	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-

CTRL, контроль; "-" норма; "+" відхилення від норми (відображається у $\geq 50\%$ усіх ембріонів та / або личинок).

Окисний стрес

У зразках печінки дорослих особин *D. rerio* було виявлено підвищений рівень АФО та ТБК-АП при дії 7 з 10 та 6 з 10 дослідних зразків хлорели відповідно. Вплив фракцій спіруліни підвищував ці показники у 5/13 та 3/13 випадках (рис. 5.2, дод. 2, табл. 4-5). Дія фракцій S11–S13 призводила до зниження рівня ТБК-АП порівняно з контролем. Зміни АФО та ТБК-АП відбувалися узгоджено ($r = 0,44$, $p < 0,001$).

Активність каталази в тканинах печінки варіювала від пригнічення після впливу фракцій С5 та S4, до двократного підвищення під дією S13 (рис. 5.2, дод. 2, табл. 4-5). Більшість досліджуваних зразків не впливали на активність GST, за винятком С4, С9, S3 і S11, котрі викликали зниження, та S4 – підвищення цього показника. Активність КАТ негативно корелювала з вмістом АФО і ТБК-АП ($r = -0,22$, $p = 0,007$ та $r = -0,30$, $p = 0,001$ відповідно), тоді як кореляційних зав'язків між активністю GST та АФО/ТБК-АП виявлено не було ($p > 0,05$).

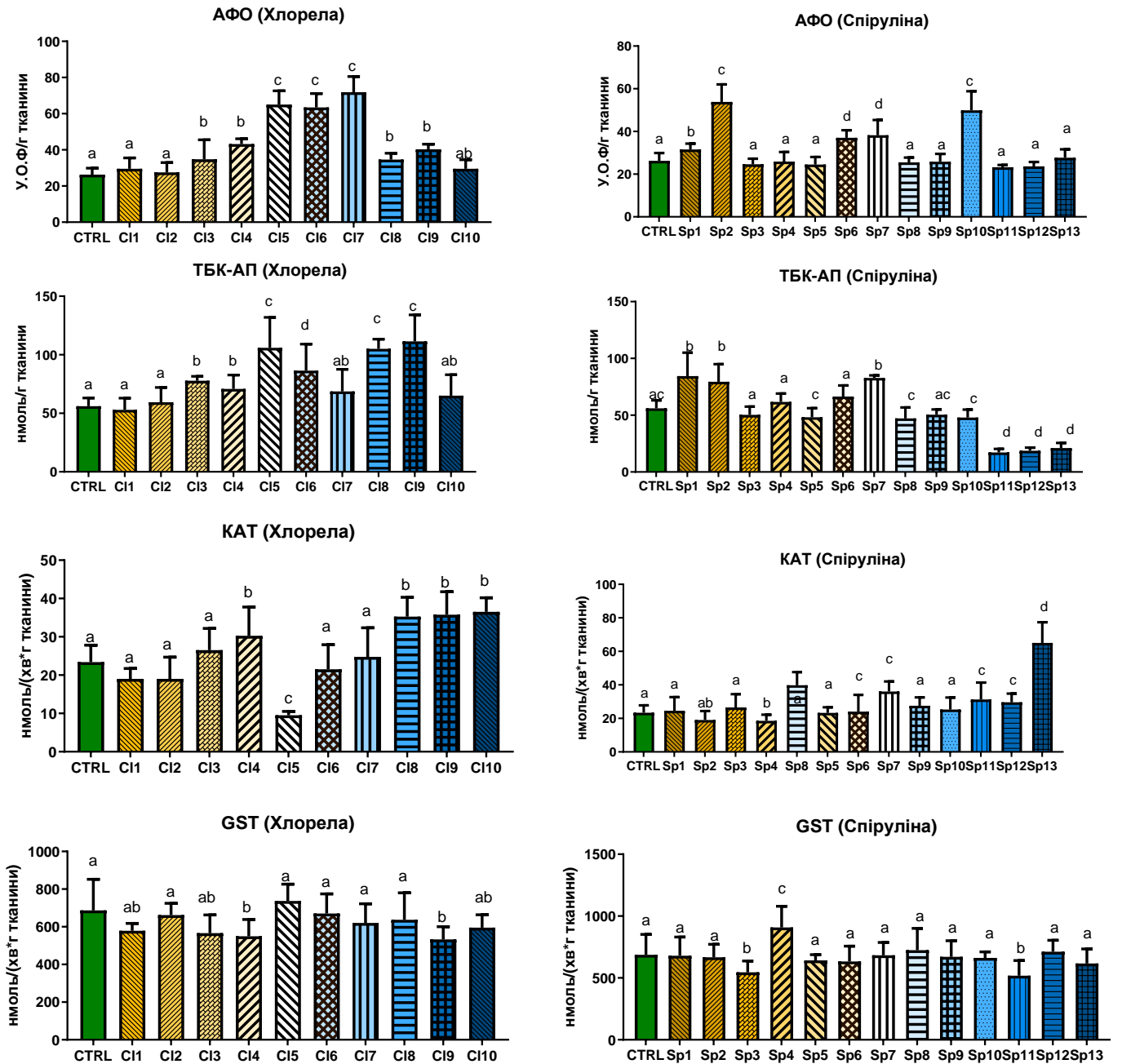


Рис. 5.2: Вплив (середнє значення \pm SD) ліпофільних фракцій, одержаних з харчових добавок на основі хлорели (C) та спіруліни (S) на продукування активних форм оксигену (АФО), пероксидне окислення ліпідів (ТБК-АП) та активність каталази (КАТ) і глутатіон-S-трансферази (GST) у тканинах печінки *Danio rerio* (n= 6). Однакові літери позначають невірні відмінності між досліджуваними групами (Dunn's test after Kruskal–Wallis ANOVA, $p > 0.05$).

CTRL - контроль.

Ознаки geno- та нейротоксичності

Вплив більшості досліджуваних фракцій не спричиняв розривів ланцюгів ДНК у тканинах печінки, проте викликав збільшення частоти мікроядер у периферичних еритроцитах даніо (рис. 5.3, дод. 2, табл. 4-5). Окрім того, дія майже всіх випробовуваних фракцій супроводжувалася змінами активності холінестерази у мозку: значне зниження у випадках С3, S4, S6, S8–S13 та збільшення у випадках С5–С10, S1–S3, S5 (рис. 5.3, дод. 3, табл. 4-5).

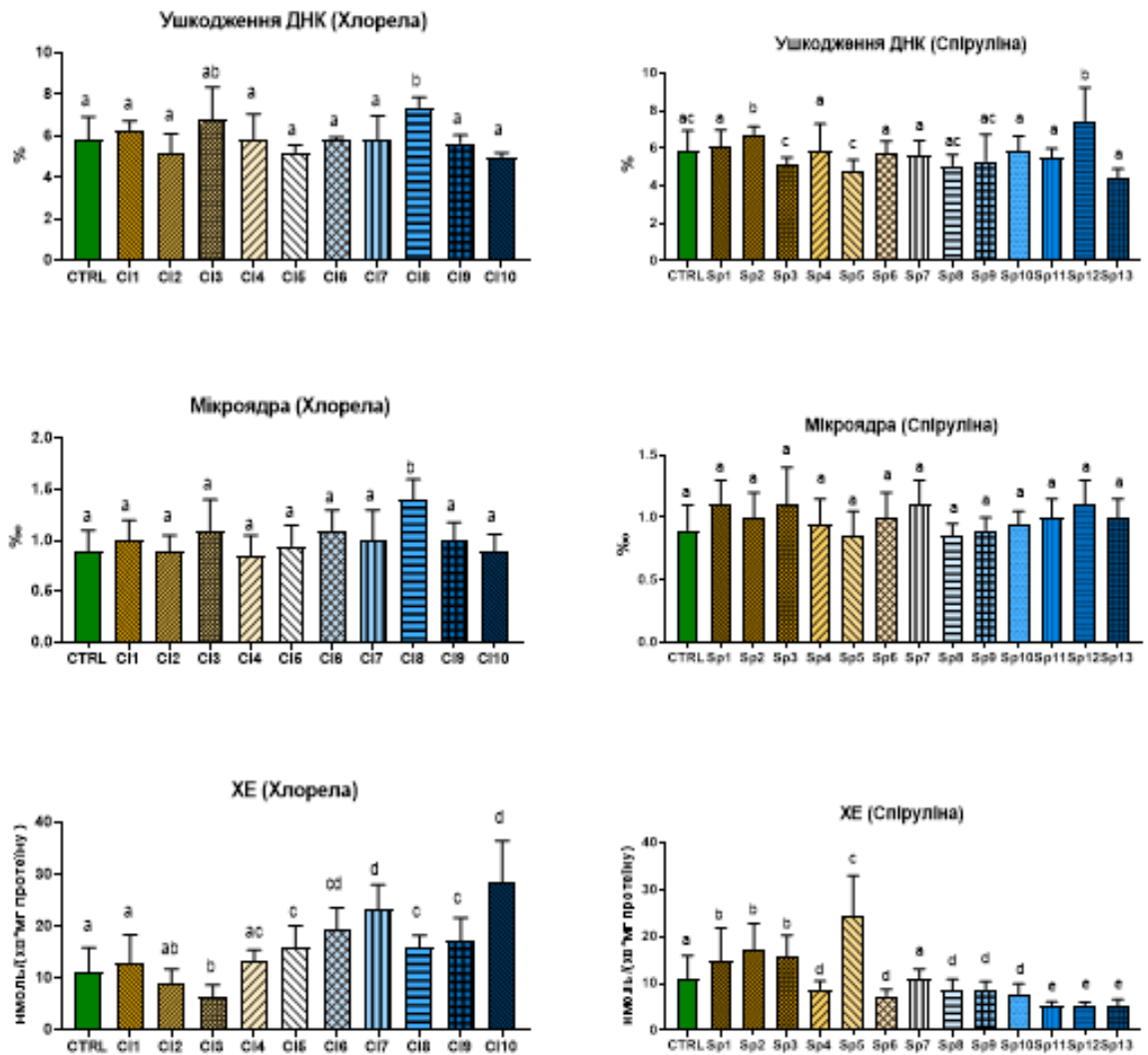


Рис. 5.3: Вплив (середнє значення \pm SD) ліпофільних фракцій, одержаних з харчових добавок на основі хлорели (C) та спіруліни (S) на ушкодження ниток ДНК у тканинах печінки, частоту мікроядер в периферичних еритроцитах і активність холінестерази (ХЕ) в мозку *Danio rerio* (n= 6). Однакові літери позначають невірідні відмінності між досліджуваними групами (Dunn's test after Kruskal–Wallis ANOVA, $p > 0.05$). CTRL - контроль.

Незважаючи на те, що ПМА вперше були виявлені в ціанобактеріях в 1979 році (Mynderse and Moore 1979) з подальшим доведенням їх тератогенного впливу, вміст цих сполук в харчових добавках (в тому числі хлорели та спіруліни) раніше не досліджувався. Найширший з відомих скринінгів ПМА у зелених водоростях та ціанобактеріях охоплював 98 штамів та включав лише один штам *Arthrospira sp.* (Jaja-Chimedza et al. 2015), хоча відомо, що виробництво біоактивних метаболітів мікрководоростями часто є географічно детермінованим і залежить від штаму (Rzymiski, Evans, et al. 2019). Також варто зазначити, що навіть якщо ПМА не продукувався жодним вирощеним для споживання людиною штамом хлорели та артроспіри, наявність цих сполук у харчових добавках може бути спричинена забрудненням іншими видами мікрководоростей. Наприклад, забруднення біомаси *Arthrospira sp.* та *Chlorella sp.* культурами ціанобактерій (*Microcystis*) може стати причиною появи в подальших продуктах гепатотоксичних мікроцистинів (Roy-Lachapelle et al. 2017; XWu et al. 2012).

Окрім того, ПМА є не єдиними тератогенними сполуками, які можуть бути присутніми в клітинах мікрководоростей. Було виявлено, що певні штами ціанобактерій та зелених водоростей виробляють ретиноеві кислоти та каротиноїдні глікозиди, які можуть викликати різноманітний набір тератогенних ефектів у *D. rerio* (Jaja-Chimedza et al. 2017; Wu et al. 2012). Продукування ретиноїдоподібних кислот, як у випадку роду *Chlorella*, було виключено лише для *Chlorella kessleri*, тоді як штами *Arthrospira* не досліджувалися взагалі (Jaja-Chimedza et al. 2017).

З огляду на це, серед інших тестів нами було проведено оцінку тератогенності з використанням типової моделі – ембріонів данію. В ході дослідження було встановлено, що ліпофільні фракції, одержані з обраних харчових добавок, не спричиняють помітних впливів на розвиток ембріонів / личинок, за винятком викривлення хорди, викликаного двома зразками препаратів на основі хлорели. При цьому ватро зазначити, що детермінатор таких порушень залишається невідомим. Враховуючи, що більшість харчових добавок з цієї групи не

призводили до тератогенних ефектів, можна припустити, що причина полягала у низькій якості та потенційному забрудненні даних продуктів. Доведено, що деякі добавки на основі хлорели містять поліциклічні ароматичні вуглеводні, які здатні викликати широкий спектр тератогенних ефектів (van der Spiegel, Noordam, and van der Fels-Klerx 2013; Sen et al. 2010), проте вміст ПМА в мікродобавках потребує подальшого дослідження.

Для подальшого вивчення потенційної токсичності ліпофільних фракцій, отриманих із обраних харчових добавок, використовували дорослих особин *D. rerio* та оцінювали можливі ознаки окисного стресу, гено- та нейротоксичності в умовах *in vivo*. Одержані результати свідчать про цитотоксичність відібраних зразків, на що вказують підвищений рівень АФО, ТБК-АП, активності КАТ та збільшення частоти розривів ланцюгів ДНК у тканинах печінки. Цитотоксичність екстрактів харчових добавок хлорели та спіруліни раніше була продемонстрована *in vitro* на клітинах A549, хоча жоден із випробуваних продуктів не містив достатніх для виявлення рівнів ціанотоксинів (мікроцистин, сакситоксин, анатоксин-а, циліндроспермопсин) (Heussner et al. 2012). Також є інформація про випадки гепатотоксичності, пов'язані із вживанням харчових добавок на основі хлорели та спіруліни (Marles et al. 2011), що ставить під сумнів безпеку вживання даних продуктів. Однак варто зазначити, що фракції трьох, проаналізованих в цьому дослідженні, препаратів спіруліни знижували рівень пероксидного окислення ліпідів порівняно з контролем. Це відповідає гепатопротекторним властивостям цих продуктів, про які раніше повідомлялося в дослідженнях *in vitro*, *in vivo* та в клінічних випробуваннях (Gad et al. 2011).

Згідно з результатами проведеного дослідження, 60 % та 31 % фракцій, одержаних з преперптів на основі хлорели та спіруліни відповідно спричиняли підвищення активності холінестерази у гомогенаті мозку даніо. Це свідчить про ймовірну наявність у даних зразках сполук, які викликають порушення холінергічного гомеостазу, що призводить до деградації ацетилхоліну та зниження регуляції його рецепторів (Soreq 2001). У свою чергу, дії 61,5 % фракцій спіруліни

і однієї фракції хлорели були пов'язані зі зниженням активності холінестерази, що може бути спричинено підвищенням рівня ацетилхоліну та надмірною стимуляцією холінергічної активності (Mersey et al. 2012).

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Враховуючи зростання активності поширення ціанобактерій в поверхневих водах Європи та збільшення кількості викликаних цим випадків цвітіння води, все більше уваги приділяється вивченню негативного впливу наслідків такого явища на екосистеми (Cirés et al., 2017). Оскільки значну частину інвазійних видів ціанобактерій становлять представники ряду *Nostocales*, для яких є властивим продукування ціанотоксинів, то особливо гостро постає необхідність прогнозування результатів впливу останніх на водну біоту. Незважаючи на актуальність проблеми, такі дані є обмеженими. Зокрема, в Україні, попри щорічне зростання кількості випадків цвітіння води як у прісних, так і в солоних водоймах, наукові дослідження з даної тематики більшою мірою стосуються вивчення динаміки поширення ціанобактерії та їх видового складу (Щербак і Задорожня 2013, Вишневецький 2019).

Враховуючи теомофільність потенційно токсичних ціанобактерій ми сконцентрували свою увагу на вивченні водойм, які характеризуються підвищеним температурним режимом через особливості географічного розташування (водосховище Касперівської ГЕС та р. Серет нижче його дамби) чи умови експлуатації (водосховище Нетішинської АЕС). Аналіз фітопланктону показав, що ціанобактерії були домінуючою фракцією в обраних водоймах як у серпні, так і у вересні 2017 року (78–98 %) з чіткіше вираженим переважанням у літній період.

Зокрема, нами 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 (Rzymiski et al. 2018). Колонії ціанобактерій часто включають змішану сукупність токсичних та нетоксичних субпопуляцій, які характеризуються певними відмінностями в генотипі (наприклад, кластером генів MC-синтетази для

Microcystis spp) (Park et al. 2018). Часовий та просторовий розподіл таких субпопуляцій визначається відповідністю умов середовища існування потребам конкоетного виду (рН, температура води, концентрація фосфатфі та нітратів) та конкуренцією за ресурси (Briand et al. 2003; Park et al. 2018; Yoshida et al. 2007). Відсутність у досліджуваних водоймах ціанотоксинів при наявності штамів, здатних їх продукувати, може бути обумовлена поширенням на території Зх. України нетоксичних штамів або більш сприятливими для їх розвитку параметрами середовища існування на час відбору зразків.

Порівняння результатів аналізів фізіологічних та біохімічних параметрів типового представника водойм регіону *S. auratus gibelio* із Касперівського водосховища (КНРРб), р. Серет (КНРРа) та контрольної ділянки забезпечило встановлення ефектів експозиції метаболітами ціанобактерій в умовах природної водойми. Одержані результати свідчать, що риби, які населяють водойми поблизу дамб, характеризуються вищою варіабельністю показників системи антиоксидантного захисту та проявів цитотоксичності порівняно з рибами з контрольної водойми. Більше того, у групи з р. Серет нижче дамби виявлялися ознаки окисного стресу, пов'язані із дисбалансом антиоксидантів та прооксидантів, низьким рівнем металотіонеїнів, аутофагією та ендокринними порушеннями.

Застосований метод головних компонент компонент (PCA) з NIPALS алгоритмом підтверджує розподіл біомаркерів, залежно від місцевості існування риб (рис. 6.1А). Перші дві головні компоненти (PC 1 та 2) пояснюють 60,1 % варіацій досліджуваних показників (рис. 6.1А). Контрольна та КНРРб групи мали протилежні навантаження на фактор 1 відносно групи КНРРа. До характеристичних ознак контрольної групи належать активність СОД, рівень ТБК-АП, фрагментації ДНК та кількість еритроцитів. Група КНРРб, у порівнянні з іншими досліджуваними групами, асоційована з мінімальним набором показників. Найбільший набір даних був пов'язаний з групою КНРРа і включав активність катепсину D, вітелогенін, окисні модифікації протеїнів та лактетдегідрогеназну активність.

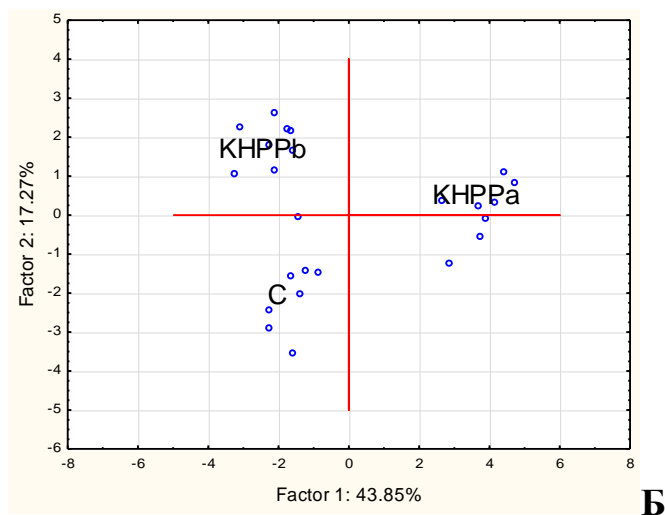
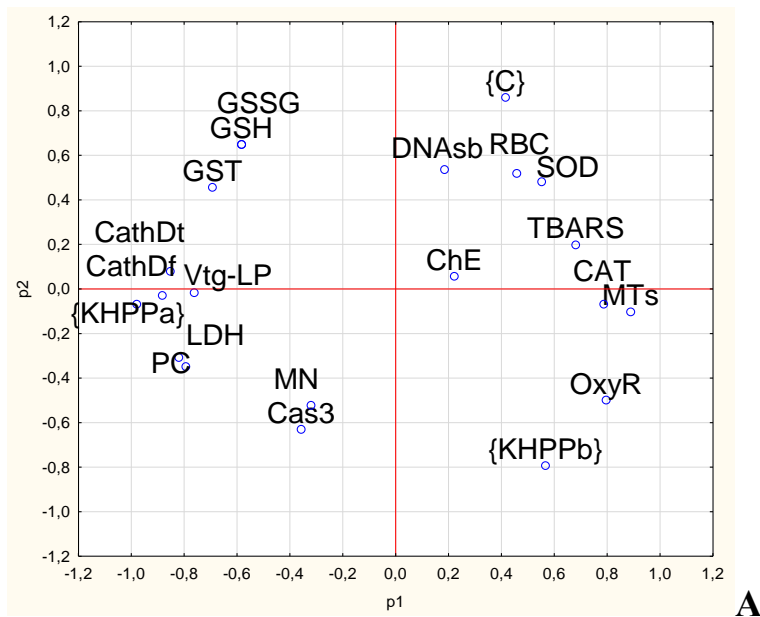


Рис. 6.1: Інтегральний аналіз біомаркерів карася *S. auratus gibelio* з контрольної популяції (C), Касперівського водосховища (KHPPb) та річки Серет нижче дамби (KHPPa) методом головних компонент з NIPALS алгоритмом.

Пригнічення реакцій антиоксидантної системи в аналогічних дослідженнях пов'язують з впливом фізичних факторів, що створює потік води на рибу, життєвий цикл яких не передбачає міграцій на великі відстані (Taylor and Cooke 2012b), оскільки фізична активність може спричинити надмірне продукування АФО, що, в свою чергу, призводить до змін активності ферментів-антиоксидантів як у тварин, так і у людини (Poulsen et al., 1999). У молюсків, на яких даний тип навантажень не впливає в зв'язку з прикріпленим способом життя, таких ефектів не спостерігається (Gnatyshyna et al. 2020). Також причиною виснаження системи антиоксидантного захисту може бути токсичність плумбуму та купруму (особливо враховуючи

підвищену чутливість риб до цього металу (Vieira et al. 2009)), вміст яких у воді змінюється залежно від сезону та положення відносно дамби (Rzymiski et al., 2018). Активність катесину D та рівень ОМП корелює з активністю ЛДГ через здатність останньої запускати лізосомальний шлях апоптозу та аутофагії у метаболічно-дефіцитному мікросередовищі (Rabinowitz and White 2010).

Це підтверджує наші результати, згідно з якими окисний стрес та прояви цитотоксичності, які спостерігаються у риб, вказують на негативний вплив ГЕС на водні організми. Проте наявність відмінностей між *C. auratus gibelio* з КНРРб та контрольного сайту, які характеризуються схожими умовами, є свідченням присутності у дослідних водоймах й інших пошкоджуючих чинників, в тому числі метаболітів ціанобактерій.

Вплив екстрактів культур *R. raciborskii*, виділених із досліджуваних водойм Західної України, на ізольовані клітини коропа звичайного (*Cyprinus carpio*) в умовах експозиції *in vitro* викликав підвищене продукування активних форм кисню та, у більшості випадків, зростання активності каспази-3. Вивчення впливу 4 екстрактів культур *R. raciborskii*, одержаних з озер Зх. Польщі (табл. 4.1), яке було проведено для перевірки значення географічного чинника на токсичні ефекти продуктів ціанобактеріями сполук, показало аналогічні результати. Реакції клітинних тіолів вказують на те, що GSH, GST та MT-SH задіюються при формуванні відповіді організму на вплив екстрактів ціанобактерій, проте зміни цих параметрів залежать від місця та часу відбору зразків штамів *R. raciborskii*. Вміст глутатіону, який має властивість частково нівелювати токсичність мікроцистину, зростає в гепатоцитах, котрі піддавалися дії екстрактів штамів з водойм Зх. України (38–74 % у порівнянні з контрольною групою), проте знижується або залишається практично незмінним (за винятком впливу вищої концентрації PL4) після впливу екстрактів штамів з Польщі. GSH обернено корелює з вмістом металотіонеїнів ($r = -0,44$, $p < 0,05$), які забезпечують протекторну дію від впливу металів і окисного стресу (Falfushynska et al. 2015; Falfushynska, Gnatyshyna, and Stoliar 2013). Зміна рівня MT у *Oncorhynchus mykiss* та *Daphnia pulex* під впливом метаболітів

ціанобактерій, переважно мікроцистину (Gélinas, Juneau, and Gagné 2012), дозволяє припустити, що у проведеному нами дослідженні вони забезпечують антиоксидантний ефект. Відмінність захисних механізмів, які активуються метаболітами штамів з українських і польських водойм, є свідченням того, що місце походження штаму може відігравати ключову роль у визначенні ступеня прояву і механізмів дії токсичних ефектів.

Цитотоксичний ефект, визначений як час утримання NR в еритроцитах коропа, проявлявся тільки в одному з випадків при концентрації 10 мкл/мл, хоча, загалом, це є типовим наслідком як впливу відомих ціанотоксинів, так і сирих екстрактів культур ціанобактерій (Shi et al. 2021; Pappas et al. 2020). Таким чином в результаті наших досліджень встановлено, що ефекти, які виникають під впливом метаболітів ціанобактерій, є специфічними для штамів а також залежать від клітин-мішеней.

Дослідження синтезованих аналогів циліндроспермопсину з використанням ізольованих клітин коропа дозволило розмежувати впливи циліндроспермопсину та інших метаболітів ціанобактерій та з'ясувати окремі особливості механізмів їх дії. За результатами кількох незалежних, проведених раніше досліджень було поокремо встановлено роль урацилу, гуанідину та гідроксильної групи у токсичності, спричиненій CYN (Evans and Murphy 2011; Cartmell et al. 2017). Тестовані у даному випадку аналоги, усі з яких мали групи урацилу, але різні варіанти функціональних груп, викликали продукування АФО, окиснення ліпідів та фрагментацію ДНК. Найбільше зростання кількості ТБК-АП та активності каспази-3 (маркера апоптозу) було викликано аналогом, який подібно до CYN, містить компоненти гуанідину і урацилу та гідроксильну функціональну групу, але не має його складної трициклічної структури. Спостереження, зроблені в процесі дослідження, підтверджують гіпотезу, що токсичність CYN є результатом взаємодії структурних частин урацилу, гуанідину та гідроксилу. Такі висновки відповідають раніше опублікованим даним: нижча активність продукування АФО, інтенсивність ПОЛ та апоптозу / аутофагії при впливі аналогів, які не мають гідроксильної групи, на нейтрофіли людини (Cartmell et al. 2017); відсутність

ефекту інгібування синтезу протеїнів та зміни рівня глутатіону у ретикулоцитарній системі кролика (*in vitro*) при дії сполук, які не містять гідроксильної групи та гуанідину (Runnegar et al. 2002); найвищий ступінь некрозу та апоптозу у клітинах лінії НерG2 при наявності усіх чотирьох функціональних груп – гуанідину, урацилу, гідроксилу С-7 та сульфатного залишку (González-Blanco C et al. 2020).

Порівняння результатів впливів на водну біоту синтетичних аналогів циліндроспермопсину, сирих екстрактів культур ціанобактерій та середовища, в якому іони існують, представлено на рис. 6.2. Незважаючи на відсутність однотипової реакції антиоксидантної системи на дію всіх груп токсичних чинників, зростання вмісту пошкоджених біомолекул (ОМП, рівень ушкодження ДНК) є універсальним наслідком пошкоджувальної дії. Аналогічні ефекти спостерігаються і при дії на водну біоту МС та СУН (Scarlett et al. 2020), (Martins et al. 2017, Lowe, Soverchia, and Moore 1995) та посилюються здатністю останнього інгібувати синтез протеїнів (Froschio et al. 2003). Закономірними наслідками фрагментації ДНК є

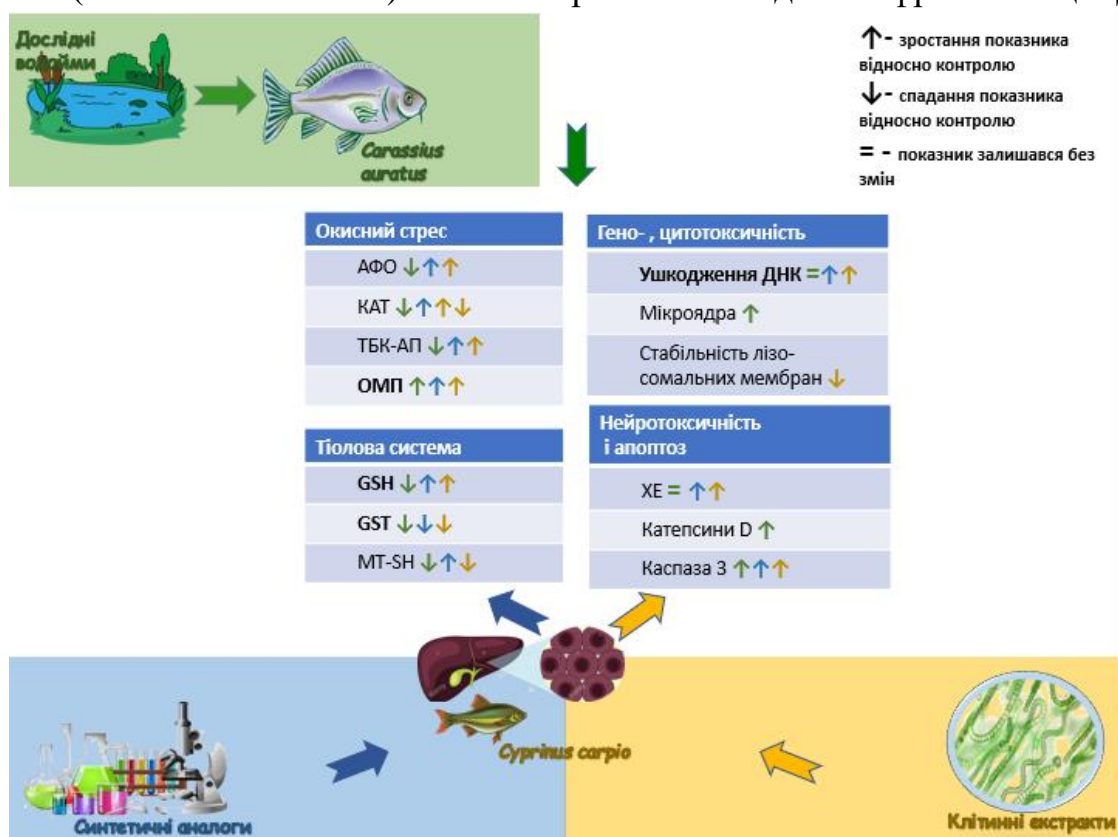


Рис. 6.2: загальнена схема реакції риб на вплив біоактивних сполук ціанобактерій та їх аналогів

прояв ознак цитотоксичності (зростання кількості клітин з мікроядрами) та активація процесів апоптозу (рівень каспази 3). Схожі ефекти спостерігаються і у молюсків та ракоподібних і супроводжуються посиленням внутрішньоклітинного окисного стресу та перокисним окисленням ліпідів (Scarlett et al. 2020).

Ще одним універсальним наслідком впливу ціанотоксинів та їх метаболітів на коропових риб є зміни стану тіолової системи. Вочевидь, вміст глутатіону залежить від природи діючої речовини та ступеня її трансформації організмом. Активність ж глутатінтрансферази знижувалася в усіх випадках, що вказує на виснаження даного ензиму за впливу всіх типів досліджуваних чинників. Ці дані підтверджуються вивченням одноразового та хронічного впливу екстракту *R. fernandoi* на рибу-вовка (*Hoplias malabaricus*) (Paulino M. G. et al. 2017, 2020), тоді як дія очищених ціанотоксинів (напр. мікроцистину) викликає протилежний ефект (Gavrilović et al. 2021).

Обрахунок коефіцієнтів варіацій змін показників біомаркерів коропових риб після впливу метаболітів ціанотоксинів чи їх синтетичних аналогів дозволив виокремити 4 ознаки (рис. 6.3), які знаходяться в інтервалі 21–53 % і свідчать, що сукупність є однорідною а середнє значення – типовою та надійною її характеристикою (Опря 2014). До таких ознак належать: рівень ушкодження ДНК,

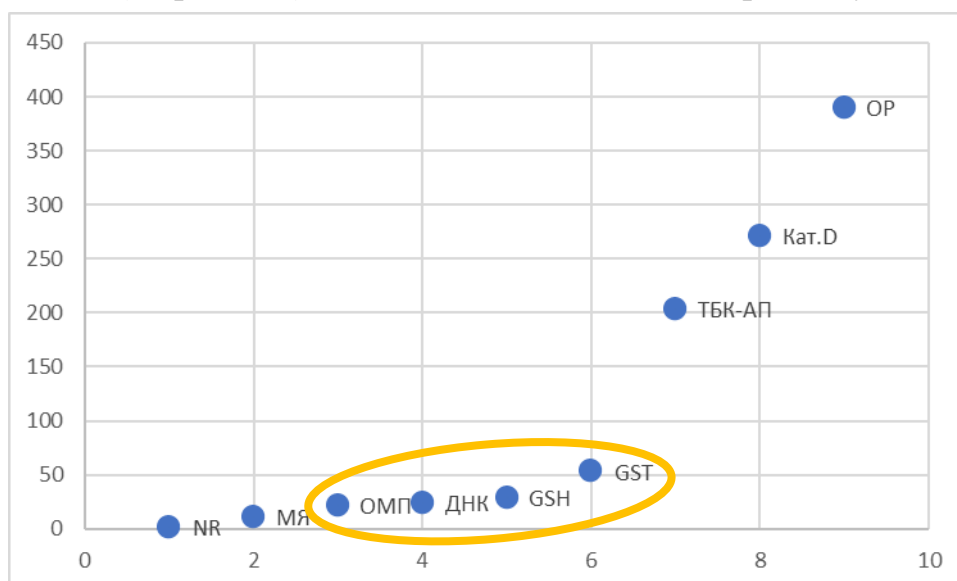


Рис. 6.3: Коефіцієнти варіації біомаркерів коропових риб за впливу досліджуваних чинників

активність глутатіон-S-трансферази, вміст глутатіону та окисних модифікацій протеїнів. Відносно низький коефіцієнт варіації для ознак цитотоксичності (стабільність лізосомальних мембран та кількість клітин з мікроядрами) вказує на недостатню чутливість даних біомаркерів до визначених типів токсикантів, високий (ТБК-АП, вільна та загальна активність катепсинів D, утворення АФО) – неоднорідність вибірки даних через можливий вплив на ці показники інших факторів. Використання таких параметрів для ідентифікації забруднення середовища ціанотоксинами і продуктами їх життєдіяльності рекомендується тільки в поєднанні з іншими характеристиками. Відтак, визначення вмісту глутатіону, окисних модифікацій протеїнів, рівня ушкодження ДНК та активність глутатіон-S-трансферази може бути рекомендована для системи ранньої детекції біоактивних сполук ціанобактерій, ціанотоксинів та їх аналогів. Більш детальний аналіз стану організму вимагає визначення набору чутливих біомаркерів основних систем організму, зокрема окисного стресу, біотрансформації та детоксикації, ендокринної та імунної системи, а також цитотоксичності.

Відомо, що окремі види ціанобактерій та зелених водоростей виробляють ліпофільні поліметокси-1-алкени – поліциклічні ароматичні вуглеводні, які здатні викликати широкий спектр тератогенних ефектів (van der Spiegel, Noordam, and van der Fels-Klerx 2013; Sen et al. 2010). Зважаючи на недостатній рівень інформації щодо ПМА у *Arthospira sp.* (комерційно відома як спіруліна) та *Chlorella sp.*, котрі культивуються для виробництва харчових біодобавок, ми проаналізували вплив ліпофільних фракцій обраних харчових добавок на основі хлорели (n = 10) та спіруліни (n = 13), зареєстрованих у ЄС, на *D. rerio* умовах *in vivo*. Мас-спектрометричний аналіз фракціонованих екстрактів не виявив жодних, потенційно споріднених до ПМА, хімічних сполук у досліджуваних зразках, а їх ліпофільні фракції не проявляли тератогенної дії, за винятком викривлення хорди, викликаного фракціями двох препаратів на основі хлорели (Henaio et al. 2020). Разом з тим, проаналізовані біодобавки викликали прояви окисного стресу та цитотоксичності у тканинах печінки *D. rerio*, на що вказує підвищений рівень

активних форм кисню, активація каталази, посилення перекисного окислення ліпідів та збільшення рівня фрагментації ДНК. Більшість (60 %) фракцій, одержаних з препаратів на основі хлорели, призводили до активації холінестерази у мозку даніо, тоді як вплив 61,5 % фракцій, одержаних з препаратів на основі спіруліни, викликав протилежну реакцію – її пригнічення. Цито- та гепатотоксичність харчових добавок на основі хлорели та спіруліни, незважаючи на відсутність у них ціанотоксинів, раніше вже була продемонстрована на клітинах A549 (*in vitro*) (Heussner et al. 2012; Marles et al. 2011).

Наслідки впливу ліпофільних екстрактів, особливо одержаних з біодобавок на основі хлорели, на *D. rerio* були схожими на реакцію у відповідь на вплив екстрактів ціанобактерій (ушкодження біомолекул через дисбаланс антиоксидантної системи, генотоксичність) (рис. 6.2), що може свідчити про потенційну присутність токсичних метаболітів, продукованих нативними популяціями ціанобактерій, чи мікрободоростями які використовуються як БАД (Falfushynska et al. 2019). Відтак, незважаючи на те, що проведені нами дослідження підтверджують відсутність у проаналізованих препаратах на основі хлорели та спіруліни тератогенних сполук класу поліметокси-1-алкенів, цитотоксичний ефект їх ліпофільних фракцій про необхідність більш ґрунтовного аналізу цього питання.

У підсумку, аналіз фізіолого-біохімічних реакцій коропових риб на вплив біоактивних метаболітів ціанотоксинів та їх аналогів свідчить про задіяння широкого спектру механізмів, універсальним наслідком реакції яких є зростання рівня ушкодження біомолекул та зміни в тіловій системі. Накопичення у водоймах фосфатів та нітратів у поєднанні зі зміною їх температурного режиму в наслідок глобального потепління створює сприятливі умови для експансії ціанобактерій на нові, нетипові для них акваторії. Закономірним наслідком освоєння видами нових ареалів є посилення конкуренції за ресурси. Одним з механізмів такої боротьби у ціанобактерій виступає продукування токсинів та інших, потенційно небезпечних метаболітів. Аналіз фізіолого-біохімічних показників риб у водоймах, де було виявлено потенційних продуцентів ціанотоксинів (*Aph. gracile*, *R. raciborskii*),

свідчить про активацію систем антиоксидантного захисту та детоксикації ксенобіотиків, незважаючи на відсутність CYN, MC та ANA-a. Вплив сирих екстрактів культур штамів *R. raciborskii* із досліджуваних водойм Західної України та Польщі на ізольовані клітини *C. carpio* в умовах *in vitro* підтверджує присутність в них інших біоактивних метаболітів. При цьому специфіка механізму відповіді залежить від місця походження штаму та типу клітин-мішеней. Універсальною реакцією на проаналізовані екстракти, не залежно від їх концентрації, є зростання параметрів окисного стресу (збільшення рівня ушкодження біомолекул) та зміна стану тіолової системи (активність GST та вміст глутатіону). Аналогічна ситуація спостерігається і при дії синтетичних аналогів циліндроспермопсину.

Таким чином результати наших досліджень синтетичних аналогів циліндроспермопсину, сирих екстрактів культур ціанобактерій та фізіолого-хімічних показників середовища їх існування дозволили розкрити особливості фізіолого-біохімічних реакцій коропових риб на цей тип поллютантів, що є надійним підґрунтям для розробки методики ранньої детекції токсичних метаболітів ціанотоксинів та їх аналогів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено дані щодо видового складу ціанобактерій у водоймах, що прилягають до гідроелектро- та атомної електростанцій Західної України та встановлено особливості реакцій показників окисного стресу та пулу клітинних тіолів, а також проявів нейро-, гено- та цитотоксичності у корошових риб за впливу метаболітів ціанобактерій ряду *Nostocales* та їх синтетичних аналогів.

- 1) У водосховищі Касперівської гідроелектростанції були виявлені ціанобактерії родин *Pseudanabaenaceae*, *Microcoleaceae*, *Leptolyngbyaceae*, *Aphanizomenonaceae*, серед яких 7,4 та 9,2 % припадає на *Raphidiopsis raciborskii* та *Aphanizomenon gracile* відповідно. Здатність цих видів за певних умов продукувати ціанотоксин циліндроспермопсин створює постійний екоризик для водної біоти.
- 2) Інтегральний індекс стресу, обчислений на основі відмінностей фізіолого-біохімічних показників риб *Carassius auratus gibelio* з водосховища Касперівської гідроелектростанції (IIS = 3,12) та річки Серет нижче дамби (IIS = 4,44) від контролю вказує на зниження життєвого статусу риб з річки Серет через більшу швидкість течії та вищий вміст купруму і плумбуму у цій ділянці. Відмінності фізіолого-біохімічних показників риб з Касперівського водосховища та контрольної ділянки, які характеризуються схожими умовами, свідчать про присутність у дослідних водоймах й інших пошкоджуючих чинників, зокрема, метаболітів ціанобактерій.
- 3) Штами *Raphidiopsis raciborskii* із водойм, які прилягають до Касперівської гідроелектростанції, не продукують циліндроспермопсин. Проте вони секретують інші метаболіти, які не були ідентифіковані, але спричиняють ініціацію окисного ушкодження біомолекул (зростання рівня окисних модифікацій ліпідів та протеїнів в середньому на 49,67 та 159,67 %, $p > 0,05$) та прояви ознак нейротоксичності (зростання активності холінестерази на 86 %, $p > 0,05$) у корошових риб (*Cyprinus carpio*) в умовах *in vitro*.

- 4) Рівень токсичності циліндроспермопсину визначається стеричною та функціональною взаємодією гідроксильної групи та гуанідинового компонента, що було встановлено за результатами досліджень впливу синтетичних аналогів цилінроспермопсину на показники стресу та токсичності в ізольованих клітинах печінки *Suprinus carpio* в умовах *in vitro*, водночас присутність гідроксильної та/або гуанідинової групи не є визначальною для процесу проникнення токсину через клітинну мембрану гепатоцитів.
- 5) Попри відсутність поліметокси-1-алкенів у досліджуваних зразках харчових добавок на основі біомаси спіруліни та хлорели, 50 % з проаналізованих зразків харчових добавок на основі хлорели та 46 % – на основі спіруліни викликають прояви ознак окисного стресу, 20 % та 46% – генотоксичних і 60 % та 31 % – нейротоксичних ефектів у *Danio rerio* за умов експозиції *in vivo*. Ознак тератогенності зареєстровано не було.
- 6) Нами встановлено мінімальний набір параметрів для системи ранньої детекції біоактивних метаболітів ціанобактерій та їхніх аналогів: визначення вмісту глутатіону, окисних модифікацій протеїнів, рівня ушкодження ДНК та активності глутатіон-S-трансферази. Коефіцієнти варіацій зазначених параметрів у всіх досліджених випадках знаходилися у діапазоні 21–53 %. Показано, що для об'єктивного аналізу фізіолого-біохімічного стану організму риб за впливу метаболітів ціанобактерій необхідно визначати і додатковий набір чутливих біомаркерів – показники окисного стресу, біотрансформації та детоксикації, ендокринної та імунної систем, ознак цитотоксичності.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- Aebi, Hugo, Sonja R Wyss, Bernhard Scherz, and František Skvaril. 1974. “Heterogeneity of Erythrocyte Catalase II. Isolation and Characterization of Normal and Variant Erythrocyte Catalase and Their Subunits.” *European Journal of Biochemistry* 48 (1): 137–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4141308>.
- Akcaalan, Reyhan, Latife Köker, Ayça Oğuz, Lisa Spoofo, Jussi Meriluoto, and Meriç Albay. 2014. “First Report of Cylindrospermopsin Production by Two Cyanobacteria (*Dolichospermum Mendotae* and *Chrysochloris ovalisporum*) in Lake Iznik, Turkey.” *Toxins* 6 (11): 3173–86. <https://doi.org/10.3390/toxins6113173>.
- Al-Thaqafi K, and White KN. 1991. “Effect of Shore Position and Environmental Metal Levels on Body Metal Burdens in the Barnacle, *Elminius Modestus*.” *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)* 69 (2–3): 89–104. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(91\)90136-K](https://doi.org/10.1016/0269-7491(91)90136-K).
- Anderson, Mary E. 1985. “Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide in Biological Samples.” *Methods in Enzymology* 113 (January): 548–55. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)13073-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)13073-9).
- Antal, Otilia, Mariann Karisztl-Gácsi, Anna Farkas, Attila Kovács, András Ács, Norbert Tőro, Gyula Kiss, et al. 2011. “Screening the Toxic Potential of Cylindrospermopsis Raciborskii Strains Isolated from Lake Balaton, Hungary.” *Toxicon* 57 (6): 831–40. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.02.007>.
- Apraiz, Itxaso, Jia Mi, and Susana Cristobal. 2006. “Identification of Proteomic Signatures of Exposure to Marine Pollutants in Mussels (*Mytilus Edulis*).” *Molecular and Cellular Proteomics* 5 (7): 1274–85. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500333-MCP200>.
- Arkhipchuk, V. V., and N. N. Garanko. 2005. “Using the Nucleolar Biomarker and the Micronucleus Test on in Vivo Fish Fin Cells.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62 (1): 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.01.001>.
- Arnold, Winfred, Jeffrey Cotsifas, Richard Ogle, Sarah Depalma, and Scott Smith. 2010. “A Comparison of the Copper Sensitivity of Six Invertebrate Species in Ambient Salt

- Water of Varying Dissolved Organic Matter Concentrations.” *Environmental Toxicology and Chemistry* 29 (2): 311–19. <https://doi.org/10.1002/ETC.45>.
- Asllani, Fisnik H., Melanie Schürz, Nikolaus Bresgen, Peter M. Eckl, and Avdulla J. Alija. 2019. “Genotoxicity Risk Assessment in Fish (*Rutilus Rutilus*) from Two Contaminated Rivers in the Kosovo.” *Science of the Total Environment* 676 (August): 429–35. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.321>.
- Aswani, Vijay, and David Trabucco. 2019. “Biochemical Adaptation in Brain Acetylcholinesterase during Acclimation to Sub-Lethal Temperatures in the Eurythermal Fish *Tilapia Mossambica*.” *Scientific Reports* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56066-x>.
- Banday, Umarah Zahoor, Sadiya Binte Swaleh, and Nazura Usmani. 2020. “Heavy Metal Toxicity Has an Immunomodulatory Effect on Metallothionein and Glutathione Peroxidase Gene Expression in *Cyprinus Carpio* Inhabiting a Wetland Lake and a Culture Pond.” *Chemosphere* 251 (July). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126311>.
- Baršienė, Janina, Laura Andreikėnaitė, and Aleksandras Rybakovas. n.d. “Cytogenetic Damage in Perch (*Perca Fluviatilis* L.) and Duck Mussel (*Anodonta Anatina* L.) Exposed to Crude Oil.”
- Beasley, Val Richard. 2020. “Harmful Algal Blooms (Phycotoxins).” In *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409548-9.11275-8>.
- Beauchamp, Charles, and Irwin Fridovich. 1971. “Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels.” *Analytical Biochemistry* 44 (1): 276–87. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8).
- Belle-Oudry, Deirdre. 2008. “Quantitative Analysis of Sulfate in Water by Indirect EDTA Titration.” *Journal of Chemical Education* 85 (9): 1269–70. <https://doi.org/10.1021/ED085P1269>.
- Belykh, Olga, Anna Gladkikh, Ekaterina Sorokovikova, Irina Tikhonova, and Sergey Potapov. 2013. “Microcystin-Producing Cyanobacteria in Reservoirs of Russia,

- Belarus, and Ukraine.” *Khim. Interesakh Ustoich. Razvit* 21: 363–78.
- Bernard, Cécile, Andreas Ballot, Solène Thomazeau, Selma Maloufi, Ambrose Furey, Joanna Mankiewicz-Boczek, Barbara Pawlik-Skowrońska, Camilla Capelli, and Nico Salmaso. 2017. “Appendix 2: Cyanobacteria Associated With the Production of Cyanotoxins.” In *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, 501–25. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119068761.app2>.
- Berry, John P., Upasana Roy, Asha Jaja-Chimedza, Kristel Sanchez, Joerg Matysik, and A. Alia. 2016. “High-Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance of Intact Zebrafish Embryos Detects Metabolic Changes Following Exposure to Teratogenic Polymethoxyalkenes from Algae.” *Zebrafish* 13 (5): 456–65. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1280>.
- Bester, M.J., H.C. Potgieter, and W.J.H. Vermaak. 1994. “Cholate and PH Reduce Interference by Sodium Dodecyl Sulfate in the Determination of DNA with Hoechst.” *Analytical Biochemistry* 223 (2): 299–305. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1994.1588>.
- Bhandari, Sadikshya, and Michael A. Lynes. 2019. “Analysis of Toxin- and Toxicant-Induced Biomarker Signatures Using Microarrays.” In *Biomarkers in Toxicology*, 1097–1109. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814655-2.00061-x>.
- Bio, Sofia, and Bruno Nunes. 2020. “Acute Effects of Diclofenac on Zebrafish: Indications of Oxidative Effects and Damages at Environmentally Realistic Levels of Exposure.” *Environmental Toxicology and Pharmacology* 78 (August). <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103394>.
- Blalock, Bonnie J., William E. Robinson, and Helen C. Poynton. 2020. “Assessing Legacy and Endocrine Disrupting Pollutants in Boston Harbor with Transcriptomic Biomarkers.” *Aquatic Toxicology* 220 (March). <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105397>.
- Bolognesi, Claudia, and Silvia Cirillo. 2014. “Genotoxicity Biomarkers in Aquatic Bioindicators.” *Current Zoology* 60 (2): 273–84.

- <https://doi.org/10.1093/czoolo/60.2.273>.
- Bolognesi, Claudia, and Makoto Hayashi. 2011. "Micronucleus Assay in Aquatic Animals." *Mutagenesis*. Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq073>.
- Bombail, Vincent, Dennis Aw, Emma Gordon, and Jennifer Batty. 2001. "Application of the Comet and Micronucleus Assays to Butterfish (*Pholis Gunnellus*) Erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland." *Chemosphere* 44 (3): 383–92. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00300-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00300-3).
- Bonomini, S. Dottori, L. Amoroso, A. Arduini, and V. Sirolli. 2004. "Increased Platelet Phosphatidylserine Exposure and Caspase Activation in Chronic Uremia." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2 (8): 1275–81. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00837.x>.
- Bonomo, Marina Marques, João Batista Fernandes, Rose Maria Carlos, and Marisa Narciso Fernandes. 2019. "Mitochondrial and Lysosomal Dysfunction Induced by the Novel Metal-Insecticide [Mg(Hesp)₂(Phen)] in the Zebrafish (*Danio Rerio*) Hepatocyte Cell Line (ZF-L)." *Chemico-Biological Interactions* 307 (July): 147–53. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.05.002>.
- Bourke, A. T.C., R. B. Hawes, A. Neilson, and N. D. Stallman. 1983. "An Outbreak of Hepato-Enteritis (the Palm Island Mystery Disease) Possibly Caused by Algal Intoxication." *Toxicon* 21 (SUPPL. 3): 45–48. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(83\)90151-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(83)90151-4).
- Brammell, Ben F., J. Scott McClain, James T. Oris, David J. Price, Wesley J. Birge, and Adria A. Elskus. 2010. "CYP1A Expression in Caged Rainbow Trout Discriminates among Sites with Various Degrees of Polychlorinated Biphenyl Contamination." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58 (3): 772–82. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9368-x>.
- Briand, Jean François, Stéphan Jacquet, Cécile Bernard, and Jean François Humbert. 2003. "Health Hazards for Terrestrial Vertebrates from Toxic Cyanobacteria in Surface Water Ecosystems." *Veterinary Research* 34 (4): 361–77. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003019>.

- Briand, Jean François, Xavier Pochon, Susanna A. Wood, Christine Bressy, Cédric Garnier, Karine Réhel, Félix Urvois, Gérald Culioli, and Anastasija Zaiko. 2018. “Metabarcoding and Metabolomics Offer Complementarity in Deciphering Marine Eukaryotic Biofouling Community Shifts.” *Biofouling* 34 (6): 657–72. <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1480757>.
- Brieger, Katharine, Stefania Schiavone, Francis J. Miller, and Karl Heinz Krause. 2012. “Reactive Oxygen Species: From Health to Disease.” *Swiss Medical Weekly*. EMH Media. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13659>.
- Calvo, Jenifer, Hunmin Jung, and Gabriele Meloni. 2017. “Copper Metallothioneins.” *IUBMB Life*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/iub.1618>.
- Campos, Alexandre, Sara Tedesco, Vitor Vasconcelos, and Susana Cristobal. 2012. “Proteomic Research in Bivalves. Towards the Identification of Molecular Markers of Aquatic Pollution.” *Journal of Proteomics*. J Proteomics. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.027>.
- Carmichael, Wayne W. 2001. “Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: ‘The CyanoHABs.’” *Human and Ecological Risk Assessment (HERA)* 7 (5): 1393–1407. <https://doi.org/10.1080/20018091095087>.
- Carmichael, Wayne W., and D. F. Biggs. 1978. “Muscle Sensitivity Differences in Two Avian Species to Anatoxin-a Produced by the Freshwater Cyanophyte *Anabaena Flos-Aquae* NRC-44-1.” *Canadian Journal of Zoology* 56 (3): 510–12. <https://doi.org/10.1139/z78-071>.
- Cartmell, Christopher, Daniel M. Evans, Jessica M.L. Elwood, Hisham S. Fituri, Patrick J. Murphy, Thomas Caspari, Barbara Poniedziątek, and Piotr Rzymiski. 2017. “Synthetic Analogues of Cyanobacterial Alkaloid Cylindrospermopsin and Their Toxicological Activity.” *Toxicology in Vitro* 44 (October): 172–81. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.07.007>.
- Casquilho, Natália V., Maria Diana Moreira-Gomes, Clarissa B. Magalhães, Renata T. Okuro, Victor Hugo Ortenzi, Emanuel K. Feitosa-Lima, Lidia M. Lima, et al. 2018. “Oxidative Imbalance in Mice Intoxicated by Microcystin-LR Can Be Minimized.”

- Toxicon* 144 (March): 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.02.008>.
- Catherine, Arnaud, Cécile Bernard, Lisa Spoof, and Milena Bruno. 2017. “Microcystins and Nodularins.” In *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, 107–26. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch11>.
- Chapra, Steven C., Brent Boehlert, Charles Fant, Victor J. Bierman, Jim Henderson, David Mills, Diane M.L. Mas, et al. 2017. “Climate Change Impacts on Harmful Algal Blooms in U.S. Freshwaters: A Screening-Level Assessment.” *Environmental Science and Technology* 51 (16): 8933–43. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01498>.
- Chen, Xiu Mei, Gui Liang Guo, Li Sun, Qiu Shi Yang, Gui Qin Wang, and Dong Ming Zhang. 2017. “Modulatory Role of L-Carnitine against Microcystin-LR-Induced Immunotoxicity and Oxidative Stress in Common Carp.” *Fish Physiology and Biochemistry* 43 (4): 1081–93. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0354-3>.
- Chernoff, N, D. J. Hill, I. Chorus, D. L. Diggs, H. Huang, D. King, J. R. Lang, et al. 2018. “Cylindrospermopsin Toxicity in Mice Following a 90-d Oral Exposure.” *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* 81 (13): 549–66. <https://doi.org/10.1080/15287394.2018.1460787>.
- Cirés, Samuel, and Andreas Ballot. 2016. “A Review of the Phylogeny, Ecology and Toxin Production of Bloom-Forming Aphanizomenon Spp. and Related Species within the Nostocales (Cyanobacteria).” *Harmful Algae* 54 (April): 21–43. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2015.09.007>.
- Colas, Simon, Benjamin Marie, Emilie Lance, Catherine Quiblier, Hélène Tricoire-Leignel, and César Mattei. 2021. “Anatoxin-a: Overview on a Harmful Cyanobacterial Neurotoxin from the Environmental Scale to the Molecular Target.” *Environmental Research*. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110590>.
- Cristobal, Susana. 2008. “Proteomics-Based Method for Risk Assessment of Peroxisome Proliferating Pollutants in the Marine Environment.” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 410: 123–35. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-548-0_8.

- Dannis, Michael. 1951. "Determination of Phenols by the Amino-Antipyrine Method on JSTOR." *Sewage and Industrial Wastes* 23 (12): 1516–22. <https://www.jstor.org/stable/25031773>.
- Delahaut, Vyshal, Oceanne Daelemans, Amit Kumar Sinha, Gudrun De Boeck, and Lieven Bervoets. 2019. "A Multibiomarker Approach for Evaluating Environmental Contamination: Common Carp (*Cyprinus Carpio*) Transplanted along a Gradient of Metal Pollution." *Science of the Total Environment* 669 (June): 481–92. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.028>.
- Dellinger J., Dorevitch S., Faustman E., Foldy S., and Takaro T. 2017. "Effects of Cyanobacterial Toxins in the Great Lakes Region: A Science and Monitoring Assessment." *A Report Submitted to the International Joint Commission by the Health Professionals Advisory Board* 73 (7): 117. <https://www.ijc.org/en/hpab/human-health-effects-cyanobacterial-toxins-great-lakes-region-science-and-monitoring>.
- Derikvandy, Azam, Hamid Reza Pourkhabbaz, Mahdi Banaee, Antoni Sureda, Nematdoost Haghi, and Ali Reza Pourkhabbaz. 2020. "Genotoxicity and Oxidative Damage in Zebrafish (*Danio Rerio*) after Exposure to Effluent from Ethyl Alcohol Industry." *Chemosphere* 251 (July). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126609>.
- Díez-Quijada L, Puerto M, Gutiérrez-Praena D, Llana-Ruiz-Cabello M, Jos A, and Cameán AM. 2019. "Microcystin-RR: Occurrence, Content in Water and Food and Toxicological Studies. A Review." *Environmental Research* 168 (January): 467–89. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2018.07.019>.
- Ding, Wen Xing, Han Ming Shen, and Choon Nam Ong. 2002. "Calpain Activation after Mitochondrial Permeability Transition in Microcystin-Induced Cell Death in Rat Hepatocytes." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291 (2): 321–31. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6453>.
- DRAFT PROPOSAL FOR A NEW GUIDELINE. 2006. "OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS." *Fish Embryo Toxicity (FET) Test*, April.

- Du, Benben, Guangfu Liu, Mingjing Ke, Zhenyan Zhang, Meng Zheng, Tao Lu, L. Sun, and Haifeng Qian. 2019. "Proteomic Analysis of the Hepatotoxicity of *Microcystis Aeruginosa* in Adult Zebrafish (*Danio Rerio*) and Its Potential Mechanisms." *Environmental Pollution* 254 (November): 113019. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113019>.
- Dumas, Thibaut, Bénilde Bonnefille, Elena Gomez, Julien Boccard, Nancy Ariza Castro, Hélène Fenet, and Frédérique Courant. 2020. "Metabolomics Approach Reveals Disruption of Metabolic Pathways in the Marine Bivalve *Mytilus Galloprovincialis* Exposed to a WWTP Effluent Extract." *Science of the Total Environment* 712 (April). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136551>.
- Elia, Antonia Concetta, William T Waller, and S. J. Norton. 2002. "Biochemical Responses of Bluegill Sunfish (*Lepomis Macrochirus*, Rafinesque) to Atrazine Induced Oxidative Stress." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 2002 68:6 68 (6): 809–16. <https://doi.org/10.1007/S00128-002-0027-4>.
- Epa, Us, and Environmental Response Team. n.d. "STANDARD OPERATING PROCEDURES SOP: 2013 PAGE: 1 of 14 SURFACE WATER SAMPLING."
- Estévez, Jorge, Eugenio Vilanova, and Miguel A. Sogorb. 2019. "Biomarkers for Testing Toxicity and Monitoring Exposure to Xenobiotics." In *Biomarkers in Toxicology*, 1165–74. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814655-2.00066-9>.
- Evans, Daniel M., and Patrick J. Murphy. 2011. "A Biomimetic Approach to the Cylindrospermopsin Alkaloids." *Chemical Communications* 47 (11): 3225–26. <https://doi.org/10.1039/c0cc05034b>.
- Falfushynska, Halina, Lesya Gnatyshyna, Irina Yurchak, Inna Sokolova, and Oksana Stoliar. 2015. "The Effects of Zinc Nanooxide on Cellular Stress Responses of the Freshwater Mussels *Unio Tumidus* Are Modulated by Elevated Temperature and Organic Pollutants." *Aquatic Toxicology* 162 (May): 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.006>.
- Falfushynska, Halina, Oksana Horyn, Agnieszka Brygider, Olga Fedoruk, Bogdan Buyak, Dmytro Poznansky, Barbara Poniedziałek, Mikołaj Kokociński, and Piotr

- Rzyski. 2019. "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* 206 (January): 105–13. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.11.012>.
- Falfushynska, Halina I., Lesya L. Gnatyshyna, Oksana Horyn, and Oksana B. Stoliar. 2017. "Vulnerability of Marsh Frog Pelophylax Ridibundus to the Typical Wastewater Effluents Ibuprofen, Triclosan and Estrone, Detected by Multi-Biomarker Approach." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 202 (November): 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.07.004>.
- Falfushynska, Halina I., Lesya L. Gnatyshyna, and Oksana B. Stoliar. 2013. "Effect of in Situ Exposure History on the Molecular Responses of Freshwater Bivalve Anodonta Anatina (Unionidae) to Trace Metals." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 89 (March): 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.024>.
- Fastner, Jutta, Andrew R. Humpage, U. Mischke, Geoffrey K. Eaglesham, and Ingrid Chorus. 2003. "Cylindrospermopsin Occurrence in Two German Lakes and Preliminary Assessment of Toxicity and Toxin Production of Cylindrospermopsis Raciborskii (Cyanobacteria) Isolates." *Toxicon* 42 (3): 313–21. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00150-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00150-8).
- Felline, Serena, Roberto Caricato, Adele Cutignano, Stefania Gorbi, Maria Giulia Lionetto, Ernesto Mollo, Francesco Regoli, and Antonio Terlizzi. 2012. "Subtle Effects of Biological Invasions: Cellular and Physiological Responses of Fish Eating the Exotic Pest Caulerpa Racemosa." Edited by Senjie Lin. *PLoS ONE* 7 (6): e38763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038763>.
- Ferrão-Filho, Aloysio Da S., and Betina Kozlowsky-Suzuki. 2011. "Cyanotoxins: Bioaccumulation and Effects on Aquatic Animals." *Marine Drugs*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md9122729>.
- Floreani, Maura, Eleonora Napoli, and Pietro Palatini. 2002. "Role of Antioxidant Defences in the Species-Specific Response of Isolated Atria to Menadione."

- Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP* 132 (2): 143–51. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00060-1).
- Francisco, Carine De Mendonça, Sueli Moura Bertolino, Robson José De Oliveira Júnior, Sandra Morelli, and Boscolli Barbosa Pereira. 2019. “Genotoxicity Assessment of Polluted Urban Streams Using a Native Fish *Astyanax Altiparanae*.” *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* 82 (8): 514–23. <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1624235>.
- Frosco, Suzanne M., Andrew R. Humpage, Philip C. Burcham, and Ian R. Falconer. 2003. “Cylindrospermopsin-Induced Protein Synthesis Inhibition and Its Dissociation from Acute Toxicity in Mouse Hepatocytes.” *Environmental Toxicology* 18 (4): 243–51. <https://doi.org/10.1002/tox.10121>.
- Fujiki, Hirota, and Masami Suganuma. 2012. “Tumor Promoters - Microcystin-LR, Nodularin and TNF- α ; and Human Cancer Development.” *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 11 (1): 4–18. <https://doi.org/10.2174/187152011794941163>.
- Gad, Ahmed S., Yasser A. Khadrawy, Aziza A. El-Nekeety, Sherif R. Mohamed, Nabila S. Hassan, and Mosaad A. Abdel-Wahhab. 2011. “Antioxidant Activity and Hepatoprotective Effects of Whey Protein and Spirulina in Rats.” *Nutrition* 27 (5): 582–89. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.04.002>.
- Gao, Yu, Zidong Liu, Dan Jia, Qing Hu, Li Li, Rong Tang, and Dapeng Li. 2020. “Acute Microcystin-LR Exposure Interfere Thyroid Hormones Homeostasis in Adult Zebrafish (*Danio Rerio*).” *Chemosphere* 243 (March): 125258. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125258>.
- García, José L., Marta de Vicente, and Beatriz Galán. 2017. “Microalgae, Old Sustainable Food and Fashion Nutraceuticals.” *Microbial Biotechnology*. John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12800>.
- Gavrilović, Branka R., Tamara G. Petrović, Tijana B. Radovanović, Svetlana G. Despotović, Jelena P. Gavrić, Imre I. Krizmanić, Miloš D. Ćirić, and Marko D. Prokić. 2021. “Hepatic Oxidative Stress and Neurotoxicity in *Pelophylax Kl. Esculentus* Frogs: Influence of Long-Term Exposure to a Cyanobacterial Bloom.”

- Science of the Total Environment* 750 (January).
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141569>.
- Gawehn K. 1988. "D-(-)-Lactate." *Met. Enzym. Anal. (Bergmeyer H. U. Ed.)*. 6: 588–92.
<https://www.readcube.com/articles/10.1002%2F%28sici%291522-7278%28199912%2914%3A5%3C455%3A%3Aaid-tox2%3E3.0.co%3B2-8>.
- Gélinas, Malorie, Philippe Juneau, and François Gagné. 2012. "Early Biochemical Effects of Microcystis Aeruginosa Extracts on Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*)." *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 161 (3): 261–67.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.12.002>.
- Ghanizadeh-Kazerouni, Ensiyeh, Craig E. Franklin, and Frank Seebacher. 2017. "Living in Flowing Water Increases Resistance to Ultraviolet B Radiation." *The Journal of Experimental Biology* 220 (4): 582–87. <https://doi.org/10.1242/jeb.151019>.
- GL, ELLMAN, COURTNEY KD, ANDRES V, and FEATHER-STONE RM. 1961. "A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity." *Biochemical Pharmacology* 7 (2). [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
- Gnatyshyna, Lesya, Vira Khoma, Olena Mishchuk, Viktoria Martinyuk, Gunta Sprinģe, and Oksana Stoliar. 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* 27 (10): 11038–49.
<https://doi.org/10.1007/s11356-020-07698-4>.
- Gonick, Harvey C. 2011. "Lead-Binding Proteins: A Review." *Journal of Toxicology*.
<https://doi.org/10.1155/2011/686050>.
- González-Blanco C, Dörr F A, Albuquerque R, Onuki J, and Pinto E. 2020. "Alternative Isolation Protocol for Desulfo and Zwitterionic Cyindrospermopsin Alkaloids and Comparison of Their Toxicity in HepG2 Cells." *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (13). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25133027>.
- Griffith, Owen W. 1980. "Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Using Glutathione Reductase and 2-Vinylpyridine." *Analytical Biochemistry* 106 (1): 207–

12. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90139-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90139-6).
- Griffiths, Dilwyn J., and Martin L. Saker. 2003. "The Palm Island Mystery Disease 20 Years on: A Review of Research on the Cyanotoxin Cylindrospermopsin." *Environmental Toxicology*. Environ Toxicol. <https://doi.org/10.1002/tox.10103>.
- Grunow, Bianka, Noglick Sarah, Charli Kruse, and Marina Gebert. 2011. "Isolation of Cells from Atlantic Sturgeon *Acipenser Oxyrinchus Oxyrinchus* and Optimization of Culture Conditions." *Aquatic Biology* 14 (1): 67–75. <https://doi.org/10.3354/AB00383>.
- Guo, Lucie. 2007. "Ecology: Doing Battle with the Green Monster of Taihu Lake." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.317.5842.1166>.
- Guzmán-Guillén, R., A. I. Prieto, I. Moreno, V. Ríos, V. M. Vasconcelos, and A. M. Cameán. 2014. "Effects of Depuration on Oxidative Biomarkers in *Tilapia* (*Oreochromis Niloticus*) after Subchronic Exposure to Cyanobacterium Producing Cylindrospermopsin." *Aquatic Toxicology* 149 (April): 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.026>.
- Guzmán-Guillén, Remedios, Ana I. Prieto Ortega, Isabel M. Moreno, Victoria Ríos, Rosario Moyano, Alfonso Blanco, Vitor Vasconcelos, and Ana M. Cameán. 2017. "Effects of Depuration on Histopathological Changes in *Tilapia* (*Oreochromis Niloticus*) after Exposure to Cylindrospermopsin." *Environmental Toxicology* 32 (4): 1318–32. <https://doi.org/10.1002/tox.22326>.
- Habig, W H, M J Pabst, and W B Jakoby. 1974. "Glutathione S-Transferases. The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation." *The Journal of Biological Chemistry* 249 (22): 7130–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4436300>.
- Harada, Ken Ichi, Kiyomi Tsuji, Mariyo F. Watanabe, and Fumio Kondo. 1996. "Stability of Microcystins from Cyanobacteria - III. Effect of PH and Temperature." *Phycologia* 35 (SUPPL.): 83–88. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-35-6s-83.1>.
- Henao, Eliana, Patrick J. Murphy, Halina I. Falfushynska, Oksana Horyn, Daniel M. Evans, Piotr Klimaszyk, and Piotr Rzymiski. 2020. "Polymethoxy-1-Alkenes Screening of *Chlorella* and *Spirulina* Food Supplements Coupled with in Vivo

- Toxicity Studies.” *Toxins* 12 (2). <https://doi.org/10.3390/toxins12020111>.
- Heussner, Alexandra, Lorena Mazija, Jutta Fastner, and Daniel R Dietrich. 2012. “Toxin Content and Cytotoxicity of Algal Dietary Supplements.” *Toxicology and Applied Pharmacology* 265 (2): 263–71. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.10.005>.
- Hinojosa, María Gracia, Daniel Gutiérrez-Praena, A. I. Prieto, Remedios Guzmán-Guillén, Angeles Jos, and A. M. Cameán. 2019. “Neurotoxicity Induced by Microcystins and Cylindrospermopsin: A Review.” *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.426>.
- Ho, Kay T., Igor M. Konovets, Anna V. Terletskaia, Mykhailo V. Milyukin, Artem V. Lyashenko, Larisa I. Shitikova, Lyudmila I. Shevchuk, et al. 2020. “Contaminants, Mutagenicity and Toxicity in the Surface Waters of Kyiv, Ukraine.” *Marine Pollution Bulletin* 155 (June): 111153. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2020.111153>.
- Houtman, Corine J., Petra Booij, Karin M. Van Der Valk, Peter M. Van Bodegom, Frank Van Den Ende, Anton A.M. Gerritsen, Marja H. Lamoree, Juliette Legler, and Abraham Brouwer. 2007. “Biomonitoring of Estrogenic Exposure and Identification of Responsible Compounds in Bream from Dutch Surface Waters.” *Environmental Toxicology and Chemistry* 26 (5): 898–907. <https://doi.org/10.1897/06-326R.1>.
- Huang, Dejun, Xiaoning Zhang, Chen Zhang, Hui Li, Dong Li, Yan Hu, Feng Yang, and Yongmei Qi. 2018. “2,4-Dichlorophenol Induces DNA Damage through ROS Accumulation and GSH Depletion in Goldfish *Carassius Auratus*.” *Environmental and Molecular Mutagenesis* 59 (9): 798–804. <https://doi.org/10.1002/em.22209>.
- Huisman, Jef, Geoffrey A. Codd, Hans W. Paerl, Bas W. Ibelings, Jolanda M.H. Verspagen, and Petra M. Visser. 2018. “Cyanobacterial Blooms.” *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>.
- Jaja-Chimedza, Asha, Miroslav Gantar, Patrick D.L. Gibbs, Michael C. Schmale, and John P. Berry. 2012. “Polymethoxy-1-Alkenes from *Aphanizomenon Ovalisporum* Inhibit Vertebrate Development in the Zebrafish (*Danio Rerio*) Embryo Model.”

- Marine Drugs* 10 (10): 2322–36. <https://doi.org/10.3390/md10102322>.
- Jaja-Chimedza, Asha, Christopher Saez, Kristel Sanchez, Miroslav Gantar, and John P. Berry. 2015. “Identification of Teratogenic Polymethoxy-1-Alkenes from *Cylindrospermopsis Raciborskii*, and Taxonomically Diverse Freshwater Cyanobacteria and Green Algae.” *Harmful Algae* 49 (November): 156–61. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.09.010>.
- Jaja-Chimedza, Asha, Kristel Sanchez, Miroslav Gantar, Patrick Gibbs, Michael Schmale, and John P. Berry. 2017. “Carotenoid Glycosides from Cyanobacteria Are Teratogenic in the Zebrafish (*Danio Rerio*) Embryo Model.” *Chemosphere* 174: 478–89. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.145>.
- James, H. A., C. Smith, and A. Sutton. 1993. “The Persistence of Anatoxin-a in Reservoir Water.” Foundation for Water Research.
- Jiang, Jinlin, Yue Shi, Zhengjun Shan, Liuyan Yang, Xiaorong Wang, and Lili Shi. 2012. “Bioaccumulation, Oxidative Stress and HSP70 Expression in *Cyprinus Carpio* L. Exposed to Microcystin-LR under Laboratory Conditions.” *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 155 (3): 483–90. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.12.008>.
- Jüttner, Friedrich, and Susan B. Watson. 2007. “Biochemical and Ecological Control of Geosmin and 2-Methylisoborneol in Source Waters.” *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.02250-06>.
- Kawan, Atufa, Tongzhou Zhang, Wanjing Liu, Hina Mukhtar, Chunhua Zhan, and Xuezheng Zhang. 2019. “Recovery of Reproductive Function of Female Zebrafish from the Toxic Effects of Microcystin-LR Exposure.” *Aquatic Toxicology* 214 (September). <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105240>.
- Khaniyan, Maryam, Negin Salamat, Alireza Safahieh, and Abdolali Movahedinia. 2016. “Detection of Benzo[a]Pyrene-Induced Immunotoxicity in Orange Spotted Grouper (*Epinephelus Coioides*).” *Environmental Toxicology* 31 (3): 329–38. <https://doi.org/10.1002/tox.22047>.
- Khoma, Vira, Lesya Gnatyshyna, Viktoria Martinyuk, Tetyana Mackiv, Lidiya

- Mishchenko, Levonas Manusadžianas, and Oksana Stoliar. 2021a. “Common and Particular Biochemical Responses of *Unio Tumidus* to Herbicide, Pharmaceuticals and Their Combined Exposure with Heating.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 208 (January): 111695. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111695>.
- . 2021b. “Common and Particular Biochemical Responses of *Unio Tumidus* to Herbicide, Pharmaceuticals and Their Combined Exposure with Heating.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 208 (January): 111695. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111695>.
- Klimenko, N. A., Y. V. Pylypenko, and O. O. Biedunkova. 2016. “Health Assessment of Hydro-Ecosystems Based on Homeostasis Indicators of Fish: Review of Approaches.” *Biosystems Diversity* 24 (1): 61–71. <https://doi.org/10.15421/011607>.
- Kodzhahinchev, Vladimir, Kamran Shekh, Lynn P. Weber, and Som Niyogi. 2021. “Interactive Effects of Cadmium and Benzo[a]Pyrene in Adult Zebrafish (*Danio Rerio*) during Short-Term Aqueous Co-Exposure.” *Environmental Pollution* 272 (March). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116027>.
- Kokociński, Mikołaj, Ilona Gagala, Iwona Jasser, Jurate Karosiene, Jurate Kasperovičiene, Justyna Kobos, Judita Koreiviene, et al. 2017. “Distribution of Invasive *Cylindrospermopsis Raciborskii* in the East-Central Europe Is Driven by Climatic and Local Environmental Variables.” *FEMS Microbiology Ecology* 93 (4). <https://doi.org/10.1093/femsec/fix035>.
- Kokociński, Mikołaj, Joanna Mankiewicz-Boczek, Tomasz Jurczak, Lisa Spoof, Jussi Meriluoto, Edyta Rejmonczyk, Henna Hautala, Markus Vehniäinen, Jakub Pawełczyk, and Janne Soininen. 2013. “*Aphanizomenon Gracile* (Nostocales), a *Cylindrospermopsis*-Producing Cyanobacterium in Polish Lakes.” *Environmental Science and Pollution Research* 20 (8): 5243–64. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1426-7>.
- Kreżel, Artur, and Wolfgang Maret. 2017. “The Functions of Metamorphic Metallothioneins in Zinc and Copper Metabolism.” *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18061237>.

- Kroon, Frederieke, Claire Streten, and Simon Harries. 2017. "A Protocol for Identifying Suitable Biomarkers to Assess Fish Health: A Systematic Review." Edited by James P. Meador. *PLOS ONE* 12 (4): e0174762. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174762>.
- Kubečka, J., J. Matěna, and P. Hartvich. 1997. "Adverse Ecological Effects of Small Hydropower Stations in the Czech Republic: 1. Bypass Plants." *Regulated Rivers: Research & Management* 13 (2): 101–13. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1646\(199703\)13:2<101::AID-RRR439>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1646(199703)13:2<101::AID-RRR439>3.0.CO;2-U).
- Kuhn, Bernd, Peter Mohr, and Martin Stahl. 2010. "Intramolecular Hydrogen Bonding in Medicinal Chemistry." *Journal of Medicinal Chemistry* 53 (6): 2601–11. <https://doi.org/10.1021/jm100087s>.
- Kumar, Ashok, T Schei, Rodriguez A Ahenkorah, R. Caceres Devernay, and J.-M. Freitas. 2004. "IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation." Cambridge, UK and New York, USA.
- Kurelec Branko, Tvrtko Smital, Nancy A Eufemia, B Pivèevia, and D. Epel. 2000. "Multixenobiotic Resistance, P-Glycoprotein, and Chemosensitizers." *Ecotoxicology*. Springer. <https://doi.org/10.1023/A:1026560922731>.
- Lamb, Madison C, David G Kimme, and Erin K Field. 2019. "The Effects of Temperature on *Bosmina Longirostris* Susceptibility to Microcystin-LR Acute Toxicity." *PloS One* 14 (7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0219342>.
- Lamprecht W, and Heinz F. 1988. "Pyruvate." *Met. Enzym. Anal. (Bergmeyer H. U. Ed.)*. 6 (March): 570–77. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2017.10.004>.
- Lee, Yew Mun, Caixia Li, Siew Hong Lam, Zhiyuan Gong, and Qingsong Lin. 2018. "Proteomic Analysis of Zebrafish (*Danio Rerio*) after Chemical Exposure." In *Methods in Molecular Biology*, 1797:443–59. Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7883-0_24.
- Leomanni, Alessandro, Trifone Schettino, Antonio Calisi, Stefania Gorbi, M Mezzelani, Francesco Regoli, and Maria Giulia Lionetto. 2015. "Antioxidant and Oxidative Stress Related Responses in the Mediterranean Land Snail *Cantareus Apertus*

- Exposed to the Carbamate Pesticide Carbaryl.” *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology* 168 (February): 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.11.003>.
- Levine, Beth, Noboru Mizushima, and Herbert W. Virgin. 2011. “Autophagy in Immunity and Inflammation.” *Nature* 469 (7330): 323–35. <https://doi.org/10.1038/nature09782>.
- Li, Xiaoyu, Xiangyang Zhang, Wenjie Xie, Chune Zhou, Yao Li, and Xiuhua Zhang. 2017. “Alterations in Transcription and Protein Expressions of HCC-Related Genes in HepG2 Cells Caused by Microcystin-LR.” *Toxicology in Vitro* 40 (April): 115–23. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.12.016>.
- Lionetto, Maria G., Roberto Caricato, and Maria E. Giordano. 2019. “Pollution Biomarkers in Environmental and Human Biomonitoring.” *The Open Biomarkers Journal* 9 (1): 1–9. <https://doi.org/10.2174/1875318301909010001>.
- Lionetto, Maria Giulia, Roberto Caricato, Maria Elena Giordano, and Trifone Schettino. 2004. “Biomarker Application for the Study of Chemical Contamination Risk on Marine Organisms in the Taranto Marine Coastal Area.” *Chemistry and Ecology* 20 (SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1080/02757540310001629215>.
- Liu, Qingqing, Wei Wang, Yiming Zhang, Yuan Cui, Shiwen Xu, and Shu Li. 2020. “Bisphenol A Regulates Cytochrome P450 1B1 through MiR-27b-3p and Induces Carp Lymphocyte Oxidative Stress Leading to Apoptosis.” *Fish and Shellfish Immunology* 102 (July): 489–98. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.009>.
- Longnecker, Krista, and Elizabeth B. Kujawinski. 2020. “Intracellular Metabolites in Marine Microorganisms during an Experiment Evaluating Microbial Mortality.” *Metabolites* 10 (3). <https://doi.org/10.3390/metabo10030105>.
- Lowe, David, Claudia Soverchia, and Michael N. Moore. 1995. “Lysosomal Membrane Responses in the Blood and Digestive Cells of Mussels Experimentally Exposed to Fluoranthene.” *Aquatic Toxicology* 33 (2): 105–12. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(95\)00015-V](https://doi.org/10.1016/0166-445X(95)00015-V).
- Lowry, O H, N J Rosebrough, A L Farr, and R J Randall. 1951. “Protein Measurement

- with the Folin Phenol Reagent.” *The Journal of Biological Chemistry* 193 (1): 265–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>.
- Macirella, Rachele, Antonello Guardia, Daniela Pellegrino, Ilaria Bernabò, Valentina Tronci, Lars O.E. Ebbesson, Lars O.E. Ebbesson, Sandro Tripepi, and Elvira Brunelli. 2016. “Effects of Two Sublethal Concentrations of Mercury Chloride on the Morphology and Metallothionein Activity in the Liver of Zebrafish (*Danio Rerio*).” *International Journal of Molecular Sciences* 17 (3). <https://doi.org/10.3390/ijms17030361>.
- Mankiewicz-Boczek, Joanna, Jadwiga Palus, Ilona Gagała, Katarzyna Izydorczyk, Tomasz Jurczak, Elzbieta Dziubałowska, Maciej Stepnik, et al. 2011. “Effects of Microcystins-Containing Cyanobacteria from a Temperate Ecosystem on Human Lymphocytes Culture and Their Potential for Adverse Human Health Effects.” *Harmful Algae* 10 (4): 356–65. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.01.001>.
- Marbun, Yovita Ramos, Hung Kai Yen, Tsair Fuh Lin, Hsiu Lian Lin, and Atsuko Michinaka. 2012. “Rapid On-Site Monitoring of Cylindrospermopsin-Producers in Reservoirs Using Quantitative PCR.” *Sustainable Environment Research* 22 (3): 143–51. <https://researchoutput.ncku.edu.tw/en/publications/rapid-on-site-monitoring-of-cylindrospermopsin-producers-in-reser>.
- Maret, Wolfgang. 2011. “Redox Biochemistry of Mammalian Metallothioneins.” *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 16 (7): 1079–86. <https://doi.org/10.1007/s00775-011-0800-0>.
- Mariño, Guillermo, Mireia Niso-Santano, Eric H Baehrecke, and Guido Kroemer. 2014. “Self-Consumption: The Interplay of Autophagy and Apoptosis.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (2): 81–94. <https://doi.org/10.1038/nrm3735>.
- Marins, Katuska, Luan Marcos Valentini Lazzarotto, Gabrielle Boschetti, Kanandra Taisa Bertoncello, Adrieli Sachett, Monica Santin Zanatta Schindler, Rafael Chitolina, et al. 2019. “Iron and Manganese Present in Underground Water Promote Biochemical, Genotoxic, and Behavioral Alterations in Zebrafish (*Danio Rerio*).” *Environmental Science and Pollution Research* 26 (23): 23555–70.

<https://doi.org/10.1007/s11356-019-05621-0>.

- Markert, Bernd A., Anton M. Breure, and Harald G. Zechmeister. 2003. "Chapter 1 Definitions, Strategies and Principles for Bioindication/Biomonitoring of the Environment." *Trace Metals and Other Contaminants in the Environment* 6 (C): 3–39. [https://doi.org/10.1016/S0927-5215\(03\)80131-5](https://doi.org/10.1016/S0927-5215(03)80131-5).
- Marles, Robin J., Marilyn L. Barrett, Joanne Barnes, Mary L. Chavez, Paula Gardiner, Richard Ko, Gail B. Mahady, et al. 2011. "United States Pharmacopeia Safety Evaluation of Spirulina." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51 (7): 593–604. <https://doi.org/10.1080/10408391003721719>.
- Martins, Nathan Dias, João Sarkis Yunes, Diana Amaral Monteiro, Francisco Tadeu Rantin, and Ana Lúcia Kalinin. 2017. "Microcystin-LR Leads to Oxidative Damage and Alterations in Antioxidant Defense System in Liver and Gills of Brycon Amazonicus (SPIX & AGASSIZ, 1829)." *Toxicon* 139 (December): 109–16. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.10.006>.
- McCuaig, Lisa M., Christopher J. Martyniuk, and Vicki Lee Marlatt. 2020. "Morphometric and Proteomic Responses of Early-Life Stage Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) to the Aquatic Herbicide Diquat Dibromide." *Aquatic Toxicology* 222 (May). <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105446>.
- Mercey, Guillaume, Tristan Verdelet, Julien Renou, Maria Kliachyna, Rachid Baati, Florian Nachon, Ludovic Jean, and Pierre Yves Renard. 2012. "Reactivators of Acetylcholinesterase Inhibited by Organophosphorus Nerve Agents." *Accounts of Chemical Research* 45 (5): 756–66. <https://doi.org/10.1021/ar2002864>.
- Merel, Sylvain, David Walker, Ruth Chicana, Shane Snyder, Estelle Baurès, and Olivier Thomas. 2013. "State of Knowledge and Concerns on Cyanobacterial Blooms and Cyanotoxins." *Environment International*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.013>.
- Messineo, Valentina, Sara Bogialli, Serena Melchiorre, Nicola Sechi, Antonella Lugliè, Paola Casiddu, Maria Antonietta Mariani, et al. 2009. "Cyanobacterial Toxins in Italian Freshwaters." *Limnologica* 39 (2): 95–106.

<https://doi.org/10.1016/j.limno.2008.09.001>.

- Miles, Christopher O., Morten Sandvik, Hezron E. Nonga, Andreas Ballot, Alistair L. Wilkins, Frode Rise, J. Atle H. Jaabaek, and Jared I. Loader. 2016. “Conjugation of Microcystins with Thiols Is Reversible: Base-Catalyzed Deconjugation for Chemical Analysis.” *Chemical Research in Toxicology* 29 (5): 860–70. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00028>.
- Monserrat, José M, Pablo E Martínez, Laura A Geracitano, Lílian Lund Amado, Camila de Martinez Gaspar Martins, Leães Pinho G Lopes, Chaves I Soares, Marlize Ferreira-Cravo, Juliane Ventura-Lima, and Adalto Bianchini. 2007. “Pollution Biomarkers in Estuarine Animals: Critical Review and New Perspectives.” *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP* 146 (1–2): 221–34. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2006.08.012>.
- Moore, Michael N., J. Icarus Allen, and Allan McVeigh. 2006. “Environmental Prognostics: An Integrated Model Supporting Lysosomal Stress Responses as Predictive Biomarkers of Animal Health Status.” *Marine Environmental Research* 61 (3): 278–304. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2005.10.005>.
- Moosova, Zdena, Michaela Pekarova, Lenka Svihalkova Sindlerova, Ondrej Vasicek, Lukas Kubala, Ludek Blaha, and Ondrej Adamovsky. 2019. “Immunomodulatory Effects of Cyanobacterial Toxin Cylindrospermopsin on Innate Immune Cells.” *Chemosphere* 226 (July): 439–46. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.143>.
- Moura, Fernando Rafael de, Kamila Ribeiro Brentegani, Aline Gemelli, Adilson Paulo Senhorin, and Valéria Dornelles Gindri Senhorin. 2017. “Oxidative Stress in the Hybrid Fish Jundiara (*Leiarius Marmoratus* × *Pseudoplatystoma Reticulatum*) Exposed to Roundup Original®.” *Chemosphere* 185: 445–51. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.030>.
- Mueller, Matthias, J Pander, and J Geist. 2017. “Evaluation of External Fish Injury Caused by Hydropower Plants Based on a Novel Field-Based Protocol.” *Fisheries Management and Ecology* 24 (3): 240–55. <https://doi.org/10.1111/fme.12229>.

- Mynderse, Jon S., and Richard E. Moore. 1979. "Isotactic Polymethoxy-1-Alkenes from the Blue-Green Alga *Tolypothrix Conglutinata* Var. *Chlorata*." *Phytochemistry* 18 (7): 1181–83. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(79\)80130-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(79)80130-2).
- Nagler, James J., Sylvia M. Ruby, David R. Idler, and Ying P. So. 2011. "Serum Phosphoprotein Phosphorus and Calcium Levels as Reproductive Indicators of Vitellogenin in Highly Vitellogenic Mature Female and Estradiol-Injected Immature Rainbow Trout (*Salmo Gairdneri*)." <https://doi.org/10.1139/Z87-365> 65 (10): 2421–25. <https://doi.org/10.1139/Z87-365>.
- Nguyen, Thi Thu Lien, Tien Hien Hoang, Trung Kien Nguyen, and Thi Thuy Duong. 2017. "The Occurrence of Toxic Cyanobacterium *Cylindrospermopsis Raciborskii* and Its Toxin *Cylindrospermopsin* in the Huong River, Thua Thien Hue Province, Vietnam." *Environmental Monitoring and Assessment* 189 (10). <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6209-7>.
- Nishiwaki-Matsushima, Rie, Tetsuya Ohta, Shinji Nishiwaki, Masami Suganuma, Kiyomi Kohyama, Takatoshi Ishikawa, Wayne W. Carmichael, and Hirota Fujiki. 1992. "Liver Tumor Promotion by the Cyanobacterial Cyclic Peptide Toxin Microcystin-LR." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 118 (6): 420–24. <https://doi.org/10.1007/BF01629424>.
- Norris, Ross L., Alan A. Seawright, Glen R. Shaw, Maree J. Smith, Robyn K. Chiswell, and Michael R. Moore. 2001. "Distribution Of¹⁴C *Cylindrospermopsin* in Vivo in the Mouse." *Environmental Toxicology* 16 (6): 498–505. <https://doi.org/10.1002/tox.10008>.
- Novosiolova, Tatyana, and Alexander Protasov. 2016. "Findings of Cyanobacteria of Tropical and Subtropical Origin in Technoecosystems of NPP and TPP of Ukraine." *Hydrobiological Journal* 52 (6): 103–7. <https://doi.org/10.1615/hydrobj.v52.i6.110>.
- Nunes, Bruno, Gaio A, Carvalho F, and Guilhermino L. 2008. "Behaviour and Biomarkers of Oxidative Stress in *Gambusia Holbrooki* after Acute Exposure to Widely Used Pharmaceuticals and a Detergent." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71 (2): 341–54. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2007.12.006>.

- O'Neil, Judith M, Timothy W. Davis, Michele Astrid Burford, and Christopher J Gobler. 2012. "The Rise of Harmful Cyanobacteria Blooms: The Potential Roles of Eutrophication and Climate Change." *Harmful Algae* 14 (February): 313–34. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.027>.
- Oehlmann, J, and Bernd A Markert. 1997. *Humantoxikologie. Eine Einführung Für Apotheker, Ärzte, Natur- Und Ingenieurwissenschaftler. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MbH Stuttgart*.
- Ohkawa, Hiroshi, Nobuko Ohishi, and Kunio Yagi. 1979. "Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction." *Analytical Biochemistry* 95 (2): 351–58. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
- Olive, Peggy L. 1988. "DNA Precipitation Assay: A Rapid and Simple Method for Detecting DNA Damage in Mammalian Cells." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 11 (4): 487–95. <https://doi.org/10.1002/em.2850110409>.
- Osswald, Joana, Sandra Rellán, Ana Gago-Martinez, and Vítor Vasconcelos. 2009. "Production of Anatoxin-a by Cyanobacterial Strains Isolated from Portuguese Fresh Water Systems." *Ecotoxicology* 18 (8): 1110–15. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0375-5>.
- Osswald, Joana, Sandra Rellán, Ana Gago, and Vítor Vasconcelos. 2007. "Toxicology and Detection Methods of the Alkaloid Neurotoxin Produced by Cyanobacteria, Anatoxin-A." *Environment International*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.06.003>.
- Paerl, Hans W., and Timothy G. Otten. 2013. "Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls." *Microbial Ecology* 65 (4): 995–1010. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0159-y>.
- Paerl, Hans W., and Valerie J. Paul. 2012. "Climate Change: Links to Global Expansion of Harmful Cyanobacteria." *Water Research* 46 (5): 1349–63. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.002>.
- Palíková, Miroslava, Roman Krejčí, Klára Hilscherová, Pavel Babica, Stanislav Navrátil, Radovan Kopp, and Luděk Bláha. 2007. "Effect of Different Cyanobacterial

- Biomasses and Their Fractions with Variable Microcystin Content on Embryonal Development of Carp (*Cyprinus Carpio* L.).” *Aquatic Toxicology* 81 (3): 312–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.01.001>.
- Pander, J., M. Mueller, J. Knott, and J. Geist. 2018. “Catch-Related Fish Injury and Catch Efficiency of Stow-Net-Based Fish Recovery Installations for Fish-Monitoring at Hydropower Plants.” *Fisheries Management and Ecology* 25 (1): 31–43. <https://doi.org/10.1111/fme.12263>.
- Pandey, Atindra Kumar, Naresh S. Nagpure, and Sunil P. Trivedi. 2018. “Genotoxicity Assessment of Pesticide Profenofos in Freshwater Fish *Channa Punctatus* (Bloch) Using Comet Assay and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).” *Chemosphere* 211 (November): 316–23. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.182>.
- Pankaj, Pranay Punj. 2015. “Efficacy of *Spirulina Platensis* in Improvement of the Reproductive Performance and Easing Teratogenicity in Hyperglycemic Albino Mice.” *Indian Journal of Pharmacology* 47 (4): 430–35. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.161271>.
- Papadimitriou, Th, Matina Katsiapi, Konstantinos Vlachopoulos, A. Christopoulos, Chrysi S. Laspidou, Maria Moustaka-Gouni, and Konstantinos A. Kormas. 2018. “Cyanotoxins as the ‘Common Suspects’ for the Dalmatian Pelican (*Pelecanus Crispus*) Deaths in a Mediterranean Reconstructed Reservoir.” *Environmental Pollution* 234 (March): 779–87. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.022>.
- Pappas, Dimitris, Manthos Panou, Ioannis-Dimosthenis S Adamakis, Spyros Gkelis, and Emmanuel Panteris. 2020. “Beyond Microcystins: Cyanobacterial Extracts Induce Cytoskeletal Alterations in Rice Root Cells.” *International Journal of Molecular Sciences* 21 (24): 1–27. <https://doi.org/10.3390/IJMS21249649>.
- Park, Bum Soo, Zhun Li, Yoon Ho Kang, Hyeon Ho Shin, Jae Hyoung Joo, and Myung Soo Han. 2018. “Distinct Bloom Dynamics of Toxic and Non-Toxic Microcystis (Cyanobacteria) Subpopulations in Hoedong Reservoir (Korea).” *Microbial Ecology* 75 (1): 163–73. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1030-y>.

- Parmar, Trishala K., Deepak Rawtani, and Y. K. Agrawal. 2016. "Bioindicators: The Natural Indicator of Environmental Pollution." *Frontiers in Life Science* 9 (2): 110–18. <https://doi.org/10.1080/21553769.2016.1162753>.
- Paulino, Marcelo Gustavo, Driele Tavares, Flavia Bieczynski, P Pedrão, M. M. Sakuragui, Carlos M. Luquet, Ana Paula Terezan, João Batista Fernandes, Alessandra Giani, and Marisa Narciso Fernandes. 2017. "Crude Extract of Cyanobacteria (*Radiocystis Fernandoi*, Strain R28) Induces Liver Impairments in Fish." *Aquatic Toxicology* 182 (January): 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.11.012>.
- Paulino, Marcelo Gustavo, Driele Tavares, Ana Paula Terezan, Marise Margareth Sakuragui, Emanuele Pesenti, Alessandra Giani, Marta Margareth Cestari, João Batista Fernandes, and Marisa Narciso Fernandes. 2020. "Biotransformations, Antioxidant System Responses, and Histopathological Indexes in the Liver of Fish Exposed to Cyanobacterial Extract." *Environmental Toxicology and Chemistry* 39 (5): 1041–51. <https://doi.org/10.1002/etc.4696>.
- Pellerin, Jocelyne. n.d. "Determination of Vitellogenin-like Properties In *Mya Arenaria* Hemolymph (Saguenay Fjord, Canada): A Potential Biomarker for Endocrine Disruption." *Environmental Toxicology*. Accessed July 15, 2021. https://www.academia.edu/4874378/Determination_of_vitellogenin_like_properties_inMya_arenaria_hemolymph_Saguenay_Fjord_Canada_A_potential_biomarker_for_endocrine_disruption.
- Peng, Xiandong, Xiaoxi Sun, Min Yu, Wei Fu, Hua Chen, and Jiazhou Chen. 2019. "Chronic Exposure to Environmental Concentrations of Phenanthrene Impairs Zebrafish Reproduction." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 182 (October). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109376>.
- Penha, Larissa Cristine de Carvalho, Regina Coimbra Rola, Claudia Bueno dos Reis Martinez, and Camila de Martinez Gaspar Martins. 2021. "Effects of Anti-Inflammatory Diclofenac Assessed by Toxicity Tests and Biomarkers in Adults and Larvae of *Danio Rerio*." *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C*:

- Toxicology and Pharmacology* 242 (April).
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108955>.
- Petrovic, Mira, Montserrat Solé, María J López de Alda, and Damià Barceló. 2002. “Endocrine Disruptors in Sewage Treatment Plants, Receiving River Waters, and Sediments: Integration of Chemical Analysis and Biological Effects on Feral Carp.” *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 (10): 2146–56.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12371491>.
- Pitois, Frederic, Jutta Fastner, Christelle Pagotto, and Magali Dechesne. 2018. “Multi-Toxin Occurrences in Ten French Water Resource Reservoirs.” *Toxins* 10 (7).
<https://doi.org/10.3390/toxins10070283>.
- Pla, Antoni, María Pascual, and Consuelo Guerri. 2016. “Autophagy Constitutes a Protective Mechanism against Ethanol Toxicity in Mouse Astrocytes and Neurons.” Edited by Thierry Amédée. *PloS One* 11 (4): e0153097.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153097>.
- Poniedziałek, Barbara, Piotr Rzymiski, Mikołaj Kokociński, and Jacek Karczewski. 2015. “Toxic Potencies of Metabolite(s) of Non-Cylindrospermopsin Producing *Cylindrospermopsis Raciborskii* Isolated from Temperate Zone in Human White Cells.” *Chemosphere* 120 (February): 608–14.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.09.067>.
- Poniedziałek, Barbara, Piotr Rzymiski, and Krzysztof Wiktorowicz. 2014. “Toxicity of *Cylindrospermopsin* in Human Lymphocytes: Proliferation, Viability and Cell Cycle Studies.” *Toxicology in Vitro* 28 (5): 968–74.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.04.015>.
- Poulsen, Henrik E., Allan Weimann, and Steffen Loft. 1999. “Methods to Detect DNA Damage by Free Radicals: Relation to Exercise.” In *Proceedings of the Nutrition Society*, 58:1007–14. CAB International.
<https://doi.org/10.1017/S0029665199001329>.
- Qin, Boqiang, Guangwei Zhu, Guang Gao, Yunlin Zhang, Wei Li, Hans W. Paerl, and Wayne W. Carmichael. 2010. “A Drinking Water Crisis in Lake Taihu, China:

- Linkage to Climatic Variability and Lake Management.” *Environmental Management*. <https://doi.org/10.1007/s00267-009-9393-6>.
- Rabalais, N. N., R. J. Díaz, L. A. Levin, R. E. Turner, D. Gilbert, and J. Zhang. 2010. “Dynamics and Distribution of Natural and Human-Caused Hypoxia.” *Biogeosciences* 7 (2): 585–619. <https://doi.org/10.5194/bg-7-585-2010>.
- Rabcheniuk, O. O., V. O. Khomenchuk, Yu. I. Senyk, and V. Z. Kurant. 2019. “Lipid Metabolism in Carp and Pike under Impact of Fe (III) Ions.” *Hydrobiological Journal* 55 (1): 66–74. <https://doi.org/10.1615/HYDROBJ.V55.I1.70>.
- Rabinowitz, Joshua D., and Eileen White. 2010. “Autophagy and Metabolism.” *Science*. American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.1193497>.
- Radak, Zsolt, Hae Young Chung, and Sataro Goto. 2008. “Systemic Adaptation to Oxidative Challenge Induced by Regular Exercise.” *Free Radical Biology & Medicine* 44 (2): 153–59. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.029>.
- Rai, Ashutosh Kumar, Rupesh Chaturvedi, and Ashok Kumar. 2018. “Proteomic Evidences for Microcystin-RR-Induced Toxicological Alterations in Mice Liver.” *Scientific Reports* 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19299-w>.
- Recknagel, Friedrich, Tamar Zohary, Jacqueline Rücker, Philip T. Orr, Christina Castelo Branco, and Brigitte Nixdorf. 2019. “Causal Relationships of Raphidiopsis (Formerly *Cylindrospermopsis*) Dynamics with Water Temperature and N:P-Ratios: A Meta-Analysis across Lakes with Different Climates Based on Inferential Modelling.” *Harmful Algae* 84 (April): 222–32. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.04.005>.
- Regoli, Francesco, and Maria Elisa Giuliani. 2014. “Oxidative Pathways of Chemical Toxicity and Oxidative Stress Biomarkers in Marine Organisms.” *Marine Environmental Research* 93 (February): 106–17. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.07.006>.
- Rivera, Jacqueline F, Safia Costes, Tatyana Gurlo, Charles G Glabe, and Peter C Butler. 2014. “Autophagy Defends Pancreatic β Cells from Human Islet Amyloid Polypeptide-Induced Toxicity.” *The Journal of Clinical Investigation* 124 (8): 3489–

3500. <https://doi.org/10.1172/JCI71981>.
- Roy-Lachapelle, Audrey, Morgan Solliec, Maryse F. Bouchard, and Sébastien Sauvé. 2017. "Detection of Cyanotoxins in Algae Dietary Supplements." *Toxins* 9 (3). <https://doi.org/10.3390/toxins9030076>.
- Rücker, Jacqueline, Anke Stüken, Brigitte Nixdorf, Jutta Fastner, Ingrid Chorus, and Claudia Wiedner. 2007. "Concentrations of Particulate and Dissolved Cylindrospermopsin in 21 Aphanizomenon-Dominated Temperate Lakes." *Toxicon* 50 (6): 800–809. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.06.019>.
- Runnegar, Maria T., Chaoyu Xie, Barry B. Snider, Grier A. Wallace, Steven M. Weinreb, and John Kuhlenkamp. 2002. "In Vitro Hepatotoxicity of the Cyanobacterial Alkaloid Cylindrospermopsin and Related Synthetic Analogues." *Toxicological Sciences* 67 (1): 81–87. <https://doi.org/10.1093/toxsci/67.1.81>.
- Rzymiski, Piotr, Agnieszka Brygider, and Mikołaj Kokociński. 2017. "On the Occurrence and Toxicity of Cylindrospermopsis Raciborskii in Poland." *Limnological Review* 17 (1): 23–29. <https://doi.org/10.1515/limre-2017-0003>.
- Rzymiski, Piotr, Joanna Budzulak, Przemysław Niedzielski, Piotr Klimaszyk, Jędrzej Proch, Lidia Kozak, and Barbara Poniedziałek. 2019. "Essential and Toxic Elements in Commercial Microalgal Food Supplements." *Journal of Applied Phycology* 31 (6): 3567–79. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1681-1>.
- Rzymiski, Piotr, Daniel M. Evans, Patrick J. Murphy, and Mikołaj Kokociński. 2019. "A Study of Polymethoxy-1-Alkenes in Raphidiopsis (Cylindrospermopsis) Raciborskii and Aphanizomenon Gracile Isolated in Poland." *Toxicon* 171 (December): 51–53. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.10.002>.
- Rzymiski, Piotr, Oksana Horyn, Agnieszka Budzyńska, Tomasz Jurczak, Mikołaj Kokociński, Przemysław Niedzielski, Piotr Klimaszyk, and Halina Falfushynska. 2018. "A Report of Cylindrospermopsis Raciborskii and Other Cyanobacteria in the Water Reservoirs of Power Plants in Ukraine." *Environmental Science and Pollution Research* 25 (15): 15245–52. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2010-6>.
- Rzymiski, Piotr, and Barbara Poniedziałek. 2014. "In Search of Environmental Role of

- Cylindrospermopsin: A Review on Global Distribution and Ecology of Its Producers.” *Water Research*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.029>.
- Rzyski, Piotr, Barbara Poniedziałek, Joanna Mankiewicz-Boczek, Elisabeth J. Faassen, Tomasz Jurczak, Ilona Gaęała-Borowska, Andreas Ballot, Miquel Lüring, and Mikołaj Kokociński. 2017. “Polyphasic Toxicological Screening of *Cylindrospermopsis Raciborskii* and *Aphanizomenon Gracile* Isolated in Poland.” *Algal Research* 24 (June): 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.011>.
- Samanta, Palas, Hyungjoon Im, Joorim Na, and Jinho Jung. 2018. “Ecological Risk Assessment of a Contaminated Stream Using Multi-Level Integrated Biomarker Response in *Carassius Auratus*.” *Environmental Pollution* 233 (February): 429–38. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.061>.
- Sánchez-Marín, Paula, Leticia Vidal-Liñán, Laura Emilia Fernández-González, Rosa Montes, Rosario Rodil, José Benito Quintana, Mónica Carrera, Jesús Mateos, Angel P. Diz, and Ricardo Beiras. 2021. “Proteomic Analysis and Biochemical Alterations in Marine Mussel Gills after Exposure to the Organophosphate Flame Retardant TDCPP.” *Aquatic Toxicology* 230 (January). <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105688>.
- Sanchez, Brian C., Kimberly Ralston-Hooper, and María S. Sepúlveda. 2011. “Review of Recent Proteomic Applications in Aquatic Toxicology.” *Environmental Toxicology and Chemistry* 30 (2): 274–82. <https://doi.org/10.1002/etc.402>.
- Sandu, Maria, Tudor Lupascu, Anatol Tarita, Tatiana Goreacioc, Sergiu Turcan, and Elena Mosanu. 2017. “Method for Nitrate Determination in Water in the Presence of Nitrite.” *Chemistry Journal of Moldova* 9 (2): 8–13. [https://doi.org/10.19261/CJM.2014.09\(2\).01](https://doi.org/10.19261/CJM.2014.09(2).01).
- Sauliutė, Gintarė, Arvydas Markuckas, and Milda Stankevičiūtė. 2020. “Response Patterns of Biomarkers in Omnivorous and Carnivorous Fish Species Exposed to Multicomponent Metal (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn) Mixture. Part III.” *Ecotoxicology* 29 (3): 258–74. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02170-y>.

- Scarlett, Kendall R., Sujin Kim, Lea M. Lovin, Saurabh Chatterjee, J. Thad Scott, and Bryan W. Brooks. 2020. "Global Scanning of Cyindrospermopsin: Critical Review and Analysis of Aquatic Occurrence, Bioaccumulation, Toxicity and Health Hazards." *Science of the Total Environment* 738 (October): 139807. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139807>.
- Scheffer, M., S. H. Hosper, M. L. Meijer, B. Moss, and E. Jeppesen. 1993. "Alternative Equilibria in Shallow Lakes." *Trends in Ecology and Evolution*. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90254-M](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90254-M).
- Schettino, Trifone, Roberto Caricato, A Calisi, M. E. Giordano, and M. G. Lionetto. 2012. "Biomarker Approach in Marine Monitoring and Assessment: New Insights and Perspectives." *Open Environmental Sciences*. <https://doi.org/10.2174/1876325101206010020>.
- Schüürmann, G, and B. Markert. 1998. *Ecotoxicology: Ecological Fundamentals, Chemical Exposure, and Biological Effects. Choice Reviews Online*. Vol. 36. American Library Association. <https://doi.org/10.5860/choice.36-0304>.
- Segner, Helmut, Martina Fenske, Colin Janssen, Gerd Maack, Christoph Schäfers, and Andrea Wenzel. 2003. "Identification of Endocrine-Disrupting Effects in Aquatic Vertebrates and Invertebrates: Report from the European IDEA Project." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54 (3): 302–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12651186>.
- Sen, Alaattin, Onur Kenan Ulutas, Begum Tutuncu, Nusret Ertas, and Ismet Cok. 2010. "Determination of 7-Ethoxyresorufin-o-Deethylase (EROD) Induction in Leaping Mullet (*Liza Saliens*) from the Highly Contaminated Aliaga Bay, Turkey." *Environmental Monitoring and Assessment* 165 (1–4): 87–96. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-0928-3>.
- Serra-Compte, Albert, Diana Álvarez-Muñoz, Montserrat Solé, Núria Cáceres, Damià Barceló, and Sara Rodríguez-Mozaz. 2019. "Comprehensive Study of Sulfamethoxazole Effects in Marine Mussels: Bioconcentration, Enzymatic Activities and Metabolomics." *Environmental Research* 173 (June): 12–22.

- <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.03.021>.
- Shah, Shruti, and Samir Damare. 2019. "Proteomic Response of Marine-Derived: *Staphylococcus Cohnii* #NIOSBK35 to Varying Cr(vi) Concentrations." *Metallomics* 11 (9): 1465–71. <https://doi.org/10.1039/c9mt00089e>.
- Shang, Lixia, Muhua Feng, Xiangen Xu, Feifei Liu, Fan Ke, and Wenchao Li. 2018. "Co-Occurrence of Microcystins and Taste-and-Odor Compounds in Drinking Water Source and Their Removal in a Full-Scale Drinking Water Treatment Plant." *Toxins* 10 (1). <https://doi.org/10.3390/toxins10010026>.
- Shi, Kun, Yunlin Zhang, Yongqiang Zhou, Xiaohan Liu, Guangwei Zhu, Boqiang Qin, and Guang Gao. 2017. "Long-Term MODIS Observations of Cyanobacterial Dynamics in Lake Taihu: Responses to Nutrient Enrichment and Meteorological Factors." *Scientific Reports* 7 (January). <https://doi.org/10.1038/srep40326>.
- Shi, Linjia, Xingde Du, Haohao Liu, Xinghai Chen, Ya Ma, Rui Wang, Zhihui Tian, Shiyu Zhang, Hongxiang Guo, and Huizhen Zhang. 2021. "Update on the Adverse Effects of Microcystins on the Liver." *Environmental Research*. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110890>.
- Sieroslawska, Anna, Anna Rymuszka, and Łukasz Adaszek. 2015. "Effects of Cylindrospermopsin on the Phagocytic Cells of the Common Carp (*Cyprinus Carpio* L.)." *Journal of Applied Toxicology* 35 (11): 1406–14. <https://doi.org/10.1002/jat.3118>.
- Silva Barreto, Juliano da, Fabio de Melo Tarouco, and Carlos Eduardo da Rosa. 2020. "Chlorothalonil Causes Redox State Change Leading to Oxidative Stress Generation in *Danio Rerio*." *Aquatic Toxicology* 225 (August). <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105527>.
- Silva, Rodrigo de Cássio da, Sonia Regina Grötzner, Daniele Dietrich Moura Costa, Juan Ramón Esquivel Garcia, Juan Muelbert, Valéria Freitas de Magalhães, Francisco Filipak Neto, and Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro. 2018. "Comparative Bioaccumulation and Effects of Purified and Cellular Extract of Cylindrospermopsin to Freshwater Fish *Hoplias Malabaricus*." *Journal of Toxicology and Environmental*

- Health - Part A: Current Issues* 81 (14): 620–32.
<https://doi.org/10.1080/15287394.2018.1469101>.
- Simiyu, Benard Mucholwa, Steve Omondi Oduor, Thomas Rohrlack, Lewis Sitoki, and Rainer Kurmayer. 2018. “Microcystin Content in Phytoplankton and in Small Fish from Eutrophic Nyanza Gulf, Lake Victoria, Kenya.” *Toxins* 10 (7): 275.
<https://doi.org/10.3390/toxins10070275>.
- Skuja, Handeliella. 1937. “Süßwasseralgen Aus Griechenland Und Kleinasien.” *Hedwigia*. 77: 15–73.
- Skulberg, Olav M., Randi Skulberg, Wayne W. Carmichael, Rolf A. Andersen, Shigeki Matsunaga, and Richard E. Moore. 1992. “Investigations of a Neurotoxic Oscillatorialean Strain (Cyanophyceae) and Its Toxin. Isolation and Characterization of Homoanatoxin-a.” *Environmental Toxicology and Chemistry* 11 (3): 321–29.
<https://doi.org/10.1002/etc.5620110306>.
- Smutná, Marie, Jana Priebojová, Jaroslava Večerková, and Klára Hilscherová. 2017. “Retinoid-like Compounds Produced by Phytoplankton Affect Embryonic Development of *Xenopus Laevis*.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 138 (April): 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.12.018>.
- Sogin, Emilia M., Erik Puskás, Nicole Dubilier, and Manuel Liebeke. 2019. “Marine Metabolomics: A Method for Nontargeted Measurement of Metabolites in Seawater by Gas Chromatography–Mass Spectrometry.” *MSystems* 4 (6).
<https://doi.org/10.1128/msystems.00638-19>.
- Soreq, Hermona. 2001. “Acetylcholinesterase — New Roles for an Old Actor.” *Nature Reviews Neuroscience* 2 (4): 294–302. <https://doi.org/10.1038/35067589>.
- Spiegel, M. van der, M. Y. Noordam, and H. J. van der Fels-Klerx. 2013. “Safety of Novel Protein Sources (Insects, Microalgae, Seaweed, Duckweed, and Rapeseed) and Legislative Aspects for Their Application in Food and Feed Production.” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12 (6): 662–78.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12032>.
- Stefano, Bonacci, Corsi Ilaria, and Focardi Silvano. 2008. “Cholinesterase Activities in

- the Scallop *Pecten Jacobaeus*: Characterization and Effects of Exposure to Aquatic Contaminants.” *Science of The Total Environment* 392 (1): 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.11.029>.
- Stolyar, Oksana, Nikolaos S Loumbourdis, Halina Falfushinska, and Liliya D Romanchuk. 2008. “Comparison of Metal Bioavailability in Frogs from Urban and Rural Sites of Western Ukraine.” *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54 (1): 107–13. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9012-6>.
- Svirčev, Zorica, Vesna Obradović, Geoffrey A. Codd, Prvoslav Marjanović, Lisa Spooft, Damjana Drobac, Nada Tokodi, et al. 2016. “Massive Fish Mortality and *Cylindrospermopsis Raciborskii* Bloom in Aleksandrovac Lake.” *Ecotoxicology* 25 (7): 1353–63. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1687-x>.
- Takser, Larissa, Nora Benachour, Barry Husk, Hubert Cabana, and Denis Gris. 2016. “Cyanotoxins at Low Doses Induce Apoptosis and Inflammatory Effects in Murine Brain Cells: Potential Implications for Neurodegenerative Diseases.” *Toxicology Reports* 3 (January): 180–89. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.12.008>.
- Tanabe, Yuuhiko, Tomoharu Sano, Fumie Kasai, and Makoto M. Watanabe. 2009. “Recombination, Cryptic Clades and Neutral Molecular Divergence of the Microcystin Synthetase (Mcy) Genes of Toxic Cyanobacterium *Microcystis Aeruginosa*.” *BMC Evolutionary Biology* 9 (1): 115. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-115>.
- Taranu, Zofia E., Irene Gregory-Eaves, Peter R. Leavitt, Lynda Bunting, Teresa Buchaca, Jordi Catalan, Isabelle Domaizon, et al. 2015. “Acceleration of Cyanobacterial Dominance in North Temperate-Subarctic Lakes during the Anthropocene.” *Ecology Letters* 18 (4): 375–84. <https://doi.org/10.1111/ele.12420>.
- Taylor, Mark K., and Steven J. Cooke. 2012a. “Meta-Analyses of the Effects of River Flow on Fish Movement and Activity.” *Environmental Reviews*. NRC Research Press . <https://doi.org/10.1139/a2012-009>.
- . 2012b. “Meta-Analyses of the Effects of River Flow on Fish Movement and Activity.” *Environmental Reviews* 20 (4): 211–19. <https://doi.org/10.1139/a2012->

009.

- Terlizzi, Antonio, Serena Felling, Maria Giulia Lionetto, Roberto Caricato, Vincenzo Perfetti, Adele Cutignano, and Ernesto Mollo. 2011. "Detrimental Physiological Effects of the Invasive Alga *Caulerpa Racemosa* on the Mediterranean White Seabream *Diplodus Sargus*." *Aquatic Biology* 12 (2): 109–17. <https://doi.org/10.3354/ab00330>.
- Valério, Elisabete, Arminda Vilares, Alexandre Campos, Paulo Pereira, and Vitor Vasconcelos. 2014. "Effects of Microcystin-LR on *Saccharomyces Cerevisiae* Growth, Oxidative Stress and Apoptosis." *Toxicon* 90 (November): 191–98. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.08.059>.
- Vazzana, Mirella, Giuseppina Salerno, Aiti Vizzini, Daniela Parrinello, Maria Luigia Di Bella, and Vincenzo Arizza. 2016. "Effect of in Vitro Exposure to Cadmium and Copper on Sea Bass Blood Cells." [Http://Dx.Doi.Org/10.4081/Ijas.2009.S2.884](http://Dx.Doi.Org/10.4081/Ijas.2009.S2.884) 8 (SUPPL. 2): 884–86. <https://doi.org/10.4081/IJAS.2009.S2.884>.
- Vermeirssen, Etiënne L M, Richard Burki, Caroline Joris, Armin Peter, Helmut Segner, Marc J F Suter, and Patricia Burkhardt-Holm. 2005. "Characterization of the Estrogenicity of Swiss Midland Rivers Using a Recombinant Yeast Bioassay and Plasma Vitellogenin Concentrations in Feral Male Brown Trout." *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (9): 2226–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16193750>.
- Verspagen, Jolanda M.H., Dedmer B. Van De Waal, Jan F. Finke, Petra M. Visser, Ellen Van Donk, and Jef Huisman. 2014. "Rising CO₂ Levels Will Intensify Phytoplankton Blooms in Eutrophic and Hypertrophic Lakes." *PLoS ONE* 9 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104325>.
- Viarengo, Aldo, Bruno Burlando, Maria Cavaletto, Barbara Marchi, Enrica Ponzano, and Julián Blasco. 1999. "Role of Metallothionein against Oxidative Stress in the Mussel *Mytilus Galloprovincialis*." *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 277 (6): R1612–19. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.277.6.R1612>.

- Viarengo, Aldo, Bruno Burlando, Nadia Ceratto, and Isabella Panfoli. 2000. "Antioxidant Role of Metallothioneins: A Comparative Overview." *Cellular and Molecular Biology* (Noisy-Le-Grand, France) 46 (2): 407–17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10774929>.
- Viarengo, Aldo, Bruno Burlando, Francesco Dondero, Anna Marro, and Rita Fabbri. 1999. "Metallothionein as a Tool in Biomonitoring Programmes." In *Biomarkers*, 4:455–66. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/135475099230615>.
- Viarengo, Aldo, David Lowe, Claudia Bolognesi, Elena Fabbri, and Angela N Koehler. 2007. "The Use of Biomarkers in Biomonitoring: A 2-Tier Approach Assessing the Level of Pollutant-Induced Stress Syndrome in Sentinel Organisms." *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.04.011>.
- Viarengo, Aldo, Enrica Ponzano, Francesco Dondero, and Rita Fabbri. 1997. "A Simple Spectrophotometric Method for Metallothionein Evaluation in Marine Organisms: An Application to Mediterranean and Antarctic Molluscs." *Marine Environmental Research* 44 (1): 69–84. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(96\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(96)00103-1).
- Vicario-Parés, Unai, Jose M. Lacave, Paul Reip, Miren P. Cajaraville, and Amaia Orbea. 2018. "Cellular and Molecular Responses of Adult Zebrafish after Exposure to CuO Nanoparticles or Ionic Copper." *Ecotoxicology* 27 (1): 89–101. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1873-5>.
- Vieira, Luís R, Carlos Gravato, Amadeu Soares, Fernando M Morgado, Beta Guilhermino, and Lúcia Guilhermino. 2009. "Acute Effects of Copper and Mercury on the Estuarine Fish *Pomatoschistus Microps*: Linking Biomarkers to Behaviour." *Chemosphere* 76 (10): 1416–27. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.06.005>.
- Vodka, Marina. 2017. "Chloroplasts Ultrastructural Changes as Biomarkers of Acid Rain and Heavy Metals Pollution." *Biotechnologia Acta* 10 (3): 57–64. <https://doi.org/10.15407/biotech10.03.057>.
- Wagner, Carola, and Rita Adrian. 2009. "Cyanobacteria Dominance: Quantifying the Effects of Climate Change." *Limnology and Oceanography* 54 (6 PART 2): 2460–

68. https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.6_part_2.2460.
- Wang, Linping, Qilong Wang, Guosheng Xiao, Guoliang Chen, Lin Han, and Tingzhang Hu. 2020. “Adverse Effect of Cylindrospermopsin on Embryonic Development in Zebrafish (*Danio Rerio*).” *Chemosphere* 241 (February): 125060. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125060>.
- Wang, Nan, Zhengyao Guo, Yilin Zhang, Peijun Zhang, Jia Liu, Yi Cheng, Lei Zhang, and Yuehong Li. 2020. “Effect on Intestinal Microbiota, Bioaccumulation, and Oxidative Stress of *Carassius Auratus Gibelio* under Waterborne Cadmium Exposure.” *Fish Physiology and Biochemistry* 46 (6): 2299–2309. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00870-0>.
- Wejnerowski, Łukasz, Halina Falfushynska, Oksana Horyn, Inna Osypenko, Mikołaj Kokociński, Jussi Meriluoto, Tomasz Jurczak, Barbara Poniedziałek, Filip Pniewski, and Piotr Rzymiski. 2020. “In Vitro Toxicological Screening of Stable and Senescing Cultures of *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, and *Raphidiopsis*.” *Toxins* 12 (6): 400. <https://doi.org/10.3390/toxins12060400>.
- Wetzel, Robert G., and Gene E. Likens. 2000. “Lake Basin Characteristics and Morphometry.” *Limnological Analyses*, 1–14. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3250-4_1.
- Wiese, Maria, Paul M. D’Agostino, Troco K. Mihali, Michelle C. Moffitt, and Brett A. Neilan. 2010. “Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and Its Analogs.” *Marine Drugs*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md8072185>.
- Williams, Christopher D., Mark T. Aubel, Andrew D. Chapman, and Peter E. D’Aiuto. 2007. “Identification of Cyanobacterial Toxins in Florida’s Freshwater Systems.” In *Lake and Reservoir Management*, 23:144–52. Taylor & Francis Group . <https://doi.org/10.1080/07438140709353917>.
- Williams, Tim D., Karl Gensberg, Stephen D. Minchin, and James K Chipman. 2003. “A DNA Expression Array to Detect Toxic Stress Response in European Flounder (*Platichthys Flesus*).” *Aquatic Toxicology* 65 (2): 141–57. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00119-X](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00119-X).

- Wilson-Frank, Christina. 2019. "Proteomics in Biomarkers of Chemical Toxicity." In *Biomarkers in Toxicology*, 1153–63. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814655-2.00065-7>.
- Wimmer, Katie M., Wendy K. Strangman, and Jeffrey L.C. Wright. 2014. "7-Deoxy-Desulfo-Cylindrospermopsin and 7-Deoxy-Desulfo-12-Acetylcylindrospermopsin: Two New Cylindrospermopsin Analogs Isolated from a Thai Strain of *Cylindrospermopsis Raciborskii*." *Harmful Algae* 37 (July): 203–6. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.06.006>.
- Wonnacott, Susan, and Timothy Gallagher. 2006. "The Chemistry and Pharmacology of Anatoxin-a and Related Homotropenes with Respect to Nicotinic Acetylcholine Receptors." *Marine Drugs*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md403228>.
- Wu, Qin, Wei Yan, Houcheng Cheng, Chunsheng Liu, Tien Chieh Hung, Xiaochun Guo, and Guangyu Li. 2017. "Parental Transfer of Microcystin-LR Induced Transgenerational Effects of Developmental Neurotoxicity in Zebrafish Offspring." *Environmental Pollution* 231 (Pt 1): 471–78. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.038>.
- Wu, Su Mei, Li Hsin Shu, and Jia Hao Liu. 2016. "Anti-Oxidative Functions of Mt2 and SmtB mRNA Expression in the Gills and Brain of Zebrafish (*Danio Rerio*) upon Cadmium Exposure." *Fish Physiology and Biochemistry* 42 (6): 1709–20. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0251-1>.
- Wu, Su Mei, Li Hsin Shu, Jia Hao Liu, and Ching Hsein Chen. 2017. "Anti-Oxidative Responses on Hepatic Tissue of Zebrafish (*Danio Rerio*) in a Short Duration of Sub-Lethal Concentrations of Cadmium Exposure." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 98 (5): 612–18. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2063-0>.
- Wu, Xiaoqin, Jieqiong Jiang, Yi Wan, John P. Giesy, and Jianying Hu. 2012. "Cyanobacteria Blooms Produce Teratogenic Retinoic Acids." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (24): 9477–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200062109>.

- Xiang, Qian Qian, Ying Gao, Qin Qin Li, Jian Ling, and Li Qiang Chen. 2020. "Proteomic Profiling Reveals the Differential Toxic Responses of Gills of Common Carp Exposed to Nanosilver and Silver Nitrate." *Journal of Hazardous Materials* 394 (July). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122562>.
- Xie, Shaolin, Aiguo Zhou, Yongyong Feng, Yue Zhang, Junyi Li, Zhuolin Sun, Lanfen Fan, and Jixing Zou. 2020. "Cytochrome P450 1A MRNA in the *Gambusia Affinis* and Response to Several PAHs." *Biochemical Genetics* 58 (4): 551–65. <https://doi.org/10.1007/s10528-020-09955-0>.
- Xu, Chengbin, Yongmei Fan, Xiaokai Zhang, Weihao Kong, Weiguo Miao, and Qing X. Li. 2020. "DNA Damage in Liver Cells of the Tilapia Fish *Oreochromis Mossambicus* Larva Induced by the Insecticide Cyantraniliprole at Sublethal Doses during Chronic Exposure." *Chemosphere* 238 (January): 124586. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124586>.
- Yamamoto, Flávia Y, Juan Garcia, Allison J Kupsco, and Ciro A Oliveira Ribeiro. 2017. "Vitellogenin Levels and Others Biomarkers Show Evidences of Endocrine Disruption in Fish Species from Iguaçu River - Southern Brazil." *Chemosphere* 186 (November): 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.111>.
- Yang, Yiming, Gongliang Yu, Youxin Chen, Nannan Jia, and Renhui Li. 2021. "Four Decades of Progress in Cylindrospermopsin Research: The Ins and Outs of a Potent Cyanotoxin." *Journal of Hazardous Materials*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124653>.
- Yin, Yuwei, Peijun Zhang, Xinyan Yue, Xiaoyan Du, Wei Li, Yulin Yin, Cheng Yi, and Yuehong Li. 2018. "Effect of Sub-Chronic Exposure to Lead (Pb) and *Bacillus Subtilis* on *Carassius Auratus Gibelio*: Bioaccumulation, Antioxidant Responses and Immune Responses." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 161 (October): 755–62. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.056>.
- Yoshida, Mitsuhiro, Takashi Yoshida, Yukari Takashima, Naohiko Hosoda, and Shingo Hiroishi. 2007. "Dynamics of Microcystin-Producing and Non-Microcystin-Producing Microcystis Populations Is Correlated with Nitrate Concentration in a

- Japanese Lake.” *FEMS Microbiology Letters* 266 (1): 49–53.
<https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2006.00496.X>.
- Zanchett, Giliane, and Eduardo C. Oliveira-Filho. 2013. “Cyanobacteria and Cyanotoxins: From Impacts on Aquatic Ecosystems and Human Health to Anticarcinogenic Effects.” *Toxins*. MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/toxins5101896>.
- Zhang, Zhenzhong, Jun Wang, Zongbao Pan, Yabin Zhang, Xiaona Zhang, Hua Tian, Wei Wang, and Shaoguo Ru. 2019. “Distribution of Vitellogenin in Japanese Flounder (*Paralichthys Olivaceus*) for Biomarker Analysis of Marine Environmental Estrogens.” *Aquatic Toxicology* 216 (November).
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105321>.
- Zhao, Yanyan, Qingju Xue, Xiaomei Su, Liqiang Xie, Yunjun Yan, and Alan D. Steinman. 2015. “Microcystin-LR Induced Thyroid Dysfunction and Metabolic Disorders in Mice.” *Toxicology* 328 (February): 135–41.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.12.007>.
- Zhong, Yuchi, Lilai Shen, Xueping Ye, Dongren Zhou, Yunyi He, Yan Li, Ying Ding, Weiqin Zhu, Jiafeng Ding, and Hangjun Zhang. 2020. “Neurotoxic Anatoxin-a Can Also Exert Immunotoxicity by the Induction of Apoptosis on *Carassius Auratus* Lymphocytes in Vitro When Exposed to Environmentally Relevant Concentrations.” *Frontiers in Physiology* 11 (April). <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00316>.
- Zuccarello, Pietro, Maura Manganelli, Gea Oliveri Conti, Chiara Copat, Alfina Grasso, Antonio Cristaldi, Giovanna De Angelis, et al. 2021. “Water Quality and Human Health: A Simple Monitoring Model of Toxic Cyanobacteria Growth in Highly Variable Mediterranean Hot Dry Environments.” *Environmental Research* 192 (January): 110291. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110291>.
- Андрусин, Татьяна, Костюк Екатерина, та Грубинко Василий. 2015. “Структурные Изменения в Клеточных Мембранах Lemna Minor Из р. Збруч Как Индикатор Загрязнения Тяжелыми Металлами” 51 (4): 53–57.
- Вишневський, Віктор. 2019. “Просторово-Часова Мінливість Цвітіння” Води у

- Дніпровських Водосховищах.” *Український Журнал Дистанційного Зондування Землі*, no. 20: 18–27. <http://www.irbis-nbuv.gov.ua/cgi->
- Гандзюра, Володимир. 2020. Системний аналіз якості навколишнього середовища: *Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів*. К. 180 с.
- Гандзюра, Володимир, Коваленко Валентина, Злацькій Ігор, та Пелішенко Ольга. 2017. “Адаптації Риб і Ракоподібних До Токсичного Водного Середовища.” *Наукові Записки Тернопільського Національного Педагогічного Університету Імені Володимира Гнатюка. Серія : Біологія*, no. 4: 85–92.
- Гандзюра, Володимир, Томищ Юра, та Корево Ніна. 2015. “Особливості Впливу Важких Металів На Риб За Хронічного Та Періодичного Забруднення Водного Середовища.” *Наукові Записки Тернопільського Національного Педагогічного Університету Імені Володимира Гнатюка. Серія : Біологія*, no.
- Грубінко, Василь, та Скиба Олена. 2020. “Формування Вмісту Та Розподіл Сполук Фосфору у Річках Тернопільщини Та Притоках Дністра у Зв’язку Із Ступенем Антропогенного Навантаження.”
- Дем’яненко, Світлана. 2011. *Антропогенна Трансформація Природно-Господарських Систем в Зонах Впливу Атомних Електростанцій: (На Прикладі Хмельницької АЕС) : Автореф. Дис ... Канд. Геогр. Наук : 11.00.11. К. : [Б.В.]. К.: Київ. нац. ун-т ім. Т. Шевченка.*
- “Державна Екологічна Інспекція України.” 2019. «Цвітіння» Чорного Моря. June 2019.
- Дингла, Дж., Ю.С. Ченцова, С.Е. Горина, та М.Г. Дудиной. 1980. *Лизосомы [Текст] : Методы Исследования /*. М. Москва: Мир.
- “Інвестиційний Паспорт Заліщицького Району Тернопільської Облaсті.” n.d.
- Клименко, Микола, та Бедункова Ольга. 2017. *Біоіндикація Стану Гідроекосистем За Морфологічними Та Цитогенетичними Характеристиками Гомеостазу Риб*. НУВГП.
- “Клімат Касперівці: Середня Температура, Погода По Місяцях, Середні Погоди в Касперівцях - Climate-Data.Org.” n.d. Accessed April 26, 2021.

- Красота, Людмила. 2015. “Оцінка Якості Довкілля Північно-Західної Частини Чорного моря По Результатах Біотестування Вод у 2008–2014 Роках.” *Наукові Записки Тернопільського Національного Педагогічного Університету Імені Володимира Гнатюка. Сер. Біологія* 64 (3): 358–61.
- Лановенко, Олена, та Шевченко Ярослав. 2019. “Вплив Ціанотоксинів *Microcystis Aeruginosa* На Лейкоцити Людини.” In *Актуальні Проблеми Дослідження Довкілля. Збірник Наукових Праць (За Матеріалами VIII Міжнародної Наукової Конференції, Присвяченої 10-Річчю Створення Гетьманського Національного Природного Парку, 24-26 Травня 2019 р., м. Суми)*, 229–32. Суми: СумДПУ імені АС Макаренка.
- Луцак Володимир, Багнюкова Тетяна, та Луцак Олег. 2004. “Показники Оксидативного Стресу. 1. Тіобарбітуратактивні Продукти і Карбонільні Групи Білків.” *Укр. Біохім. Журн* 76 (3): 136–41. <http://ubj.biochemistry.org.ua/index.php/journal-archiveac/2004vc/3-may-juneffg/3041-1>.
- Мислюк, Ольга Олександрівна, Хоменко Олена Михайлівна, та Єгорова Оксана В'ячеславівна Єгорова. 2021. “Сучасні Природні й Антропогенні Загрози Екологічному Благополуччю Прісноводних Екосистем.” *Вісник Черкаського Державного Технологічного Університету*, no. 4 (March): 120–30. <https://doi.org/10.24025/2306-4412.4.2020.216090>.
- Опря, Анатолій. 2014. *Статистика. Навчальний Посібник 2-Ге Видання, Перероблене Та Доповнене. - «Центр Учбової Літератури»*. «Центр учб. Київ: «Центр учбової літератури».
- Рачинська, Олександра. 2017. “Водорості Мікрофітобентосу в Біоіндикації Якості Морського Довкілля Одеського Регіону.” *Наукові Записки Тернопільського Національного Педагогічного Університету Імені Володимира Гнатюка. Сер. Біологія* 69 (2): 64–70.
- Руднева Ирина, Скуратовская Елена, Дорохова Ирина, Граб Юлия, Залевская Инна и Омельченко Светлана. 2011. “Биоиндикация Экологического Состояния

- Морских Акваторий с Помощью Биомаркеров Рыб.” *Водные Ресурсы* 37 (1): 92–97.
- Фальфушинська Галина та Горин Оксана. Патент на корисну модель № 139060 - Спосіб виявлення потенційно токсичних синьо-зелених водоростей у водних екосистемах. *Спосіб Виявлення Потенційно Токсичних Синьо-Зелених Водоростей у Водних Екосистемах*. Accessed July 15, 2021. <https://iprop-ua.com/inv/0dqaqu32/>.
- “ХАЕС:Офіційний Веб-Сайт.” n.d. Accessed April 26, 2021. <http://www.xaes.org.ua/store/pages/ukr/khnppnews/2014-10-09/308.html>.
- Хоменчук Володимир, Ляврін Богдан, Курант Володимир. 2020. “Морфометричні Показники Деяких Видів Риб Малих Річок Західного Поділля Як Індикатор Забруднення Водойм.” *Наукові Записки Тернопільського Національного Педагогічного Університету Імені Володимира Гнатюка. Сер. Біологія* 78 (4): 35–40. <https://doi.org/10.25128/2078-2357.19.4.6>.
- Щербак Владимир, Задорожная Анна. 2013. “Сезонная Динамика Фитопланктона Киевского Участка Каневского Водохранилища.” *Гидробиологический Журнал* 49 (2): 28–38. http://hydrobiolog.com.ua/2013/2013_2.htm.
- Яцик Анатолій, Шевчук Василь. 2006. Якість вод(и). *Енциклопедія водного господарства, природокористування, природовідтворення, сталого розвитку* К. : Генеза, 2006. 827 с. ISBN 966-504-471-0
- Яцентюк Юрій. 2017. “Парадинамічна Антропогенна Ландшафтна Система Хмельницької Атомної Електростанції.” *Вісник Харківського Національного Університету Імені В. Н. Каразіна. Серія : Екологія*, no. 16: 107–12.

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 (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., Sprinґe 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 біостаціонару 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.** – №u2019 03561; 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 : "Sciencsee Publishing", 2019. – 198 p. P. 85-99. ISBN 978-1-9993071-3-4

Додаток 2

Таблиця 1

Показники фізіологічних і біохімічних маркерів стресу, ефекту та токсичності у *Carassius auratus gibelio* із Касперівського водосховища (KR), річки Серет нижче дамби (SR) та контрольної ділянки (С)

Група	С	KR	SR
Показник	M±m	M±m	M±m
СОД, У.О./мг протеїну	7,2±3,3	4,2±1,3*	2,4±0,5*
Загальний GSH, мкмоль/г тканини	2,7±0,2	2,1±0,2	2,8±0,2
GSSG, нмоль/г тканини	297,2±30,7	229,9±22,1*	320,9±31,7
GSH, мкмоль/г тканини	2,4±0,2	1,9±0,15*	2,5±0,2
GST, мкмоль/(хв*г тканини)	3,6±0,6	2,4±0,2*	4,1±0,6
ТБК-АП, нмоль/г тканини	9,3±1	8,9±1,4	6,7±1,4*
ОМП, мкмоль/г тканини	0,54±0,05	0,65±0,1*	0,88±0,15*
ХЕ, нмоль/(хв*мг протеїну)	17,6±5,9	17,5±2	16,2±3,9
Каспаза-3, нмоль/(хв*г тканини)	0,27±0,07	0,43±0,07*	0,44±0,1*
Лактат, мкмоль/г тканини	3,6±0,4	4,2±0,4	4,1±0,2
Піруват, мкмоль/г тканини	0,9±0,2	1,5±0,2	2±0,2
Лактат/Піруват	4,3±1,1	3±0,7	2,1±0,3
МТ, мкг/г тканини	131,2±28,5	143,1±18,2	60,5±8,5*
Втг-ПП, мкг Р/мг протеїну	1±0,2	1±0,1	1,7±0,5*
Катепсини D (вільна активність), нмоль/(хв*г тканини)	7,4±0,9	6,5±1,1	15,7±4,4*
Катепсини D (загальна активність), нмоль/(хв*г тканини)	26,5±6,3	21,4±3,8	46,8±11,4*
КАТ, мкмоль/(хв*мг протеїну)	94,2±16,5	102,1±12,1	66,9±11,7*
АФО, У.О.Ф/г тканини	14±4,1	16,6±3	5±1,5*
Ушкодження ДНК, %	10,5±1,6	9,3±0,8	9,5±0,8
Мікроядра, ‰	2,4±1,1	4,3±0,9*	4,5±1,8*
ЛДГ, мкмоль/(хв*г тканини)	0,54±0,09	0,59±0,08	0,77±0,05*

* – різниця з контрольною групою вірогідна (p< 0,05)

Таблиця 2

Показники фізіологічних і біохімічних маркерів стресу, ефекту та токсичності у гепатоцитах *Cyprinus carpio* за впливу екстрактів штамів R. Rasiborskii (1 мкл екстрактів / мл) із водойм Західної Польщі (PL 1-4) та Західної України (UA1-3) (n = 8)

Група	C	PL1	PL2	PL3	PL4	UA1	UA2	UA3
Показник	M±m	M±m	M±m	M±m	M±m	M±m	M±m	M±m
Загальний GSH, мкмоль/г тканини	1,17±0,1	1,05±0,1*	1,18±0,1	1,22±0,1	1,03±0,1*	2,04±0,1*	1,94±0,3*	1,61±0,2*
GST, мкмоль/(хв*г тканини)	4,5±0,5	3,4±0,6*	3,6±0,6	4±0,4	5,8±0,9*	3,2±0,3*	3,7±0,9	3,8±0,3*
ТБК-АП, нмоль/г тканини	13 ±1,1	15,1±1,8*	22 ±2,3*	19,1 ±0,9*	18,3 ±0,8*	18,9±1,6*	18,4±1,7*	15,7±0,8*
ОМП, мкмоль/г тканини	0,65±0,01	1,19±0,1*	1,65 ±0,29*	1,78 ±0,2*	1,35 ±0,09*	1,55±0,13*	1,93±0,1*	1,58±0,2*
ХЕ, нмоль/(хв*мг протеїну)	333,10 ±61,20	479,62 ±51,7*	526,57 ±62,6*	504,50 ±55,4*	507,30 ±32,5*	544,98 ±80,9*	667,98 ±93,5*	579,26 ±102,3*
МТ, мкг/г тканини	34,61±3,8	50,32±6,3*	44,29 ±4,58*	72,4 ±5,7*	42,95 ±5,3*	34,92±3,2	18,79±2,2*	15,73±4,6*
КАТ, мкмоль/(хв*мг протеїну)	5,78±0,3	6,01±1,3*	6,92 ±0,5*	7,46 ±0,6*	5,74 ±1,9	4,63±1,5*	6,44±0,6*	7,79±0,4)
ЛДГ, мкмоль/(хв*г тканини)	0,57±0,09	0,4±0,07*	0,28 ±0,04*	0,71 ±0,07*	0,34 ±0,06*	0,76±0,1*	0,21 ±0,03*	0,49±0,09*
Стабільність лізосомальних мембран	0,43±0,07	0,44±0,02	0,43±0,02	0,67 ±0,01	0,55±0,07	0,26±0,05*	0,5±0,07	0,64±0,07

* – різниця з контрольною групою вірогідна (p < 0,05)

Таблиця 3

Показники фізіологічних і біохімічних маркерів стресу, ефекту та токсичності у гепатоцитах *Cyprinus carpio* за впливу екстрактів штамів *R. Raciborskii* (10 мкл екстрактів / мл) із водойм Західної Польщі (PL 1-4) та Західної України (UA1-3) (n = 8)

Група	C	PL1	PL2	PL3	PL4	UA1	UA2	UA3
Показник	M±m	M±m	M±m	M±m	M±m	M±m	M±m	M±m
Загальний GSH, мкмоль/г тканини	1,17±0,1	0,92±0,1*	1,27±0,1	1,12±0,1	1,91±0,3*	1,86±0,2*	1,87±0,2*	1,47±0,1*
GST, мкмоль/(хв*г тканини)	4,5±0,5	2,9±0,4*	3,7±0,6	4,9±0,7	3,8±0,6	3,4±0,6*	4,1±0,4	3,4±0,4*
ТБК-АП, нмоль/г тканини	13±1,1	18,4±1,7*	19,4±0,8*	20,1±1,6*	18,3±0,8*	20,5±0,9*	22,5±1,8*	20,9±0,1*
ОМП, мкмоль/г тканини	0,65±0,06	1,86±0,1*	1,66±0,2*	1,52±0,1*	1,77±0,1*	1,89±0,3*	1,7±0,1*	1,48±0,1*
ХЕ, нмоль/(хв*мг протеїну)	333±61,2	515±21,6*	597±49,5*	501,3±80,5*	592 ±102,9*	614±36,2*	654±57,7*	637±92,7?
МТ, мкг/г тканини	34,6±3,8	33,1±6,2	40,2±5,2	57±7,7*	36,5±3,7	26,2±3,5*	20,3±2,6*	26,7±2,7*
КАТ, мкмоль/(хв*мг протеїну)	5,8±0,4	4,8±0,9*	7,3±1,4*	6,5±0,5*	6,2±1,1*	6,7±1,7	6,3±1,2*	5,8±0,5*
ЛДГ, мкмоль/(хв*г тканини)	0,57±0,09	0,81±0,09	0,63±0,16*	0,28±0,5*	0,33±0,06*	0,37±0,06*	0,49±0,08	0,82±0,12*
Стабільність лізосомальних мембран	0,43±0,07	0,5±0,11	0,52±0,01	0,72±0,03	0,61±0,07	0,48±0,05*	0,47±0,01	0,51±0,05

* – різниця з контрольною групою вірогідна (p < 0,05)

Таблиця 4

Показники фізіологічних і біохімічних маркерів стресу, ефекту та токсичності у *Danio rerio* за впливу ліпофільних фракцій, одержаних з харчових добавок на основі хлорели ($M \pm m$, $n = 6$)

	GST, мкмоль / (хв*г тканини)	ТБК-АП, нмоль / г тканини	ХЕ, нмоль / (хв*мг протеїну)	КАТ, мкмоль/ (хв*мг протеїну)	АФО, У.О.Ф/ г тканини	Ушко- дження ДНК, %	Мікро- ядра, %	Терато- генність
CNTR	687,39± 164,67	56,03± 7,03	11,15±4,78	23,38±4,43	26,26±3,63	5,85±1,09	0,9±0,2	–
C11	579,07± 39,26	52,95± 9,98	12,94±5,45	19,00±2,71	29,50±6,00	6,32±0,42	1,00±0,2	–
C12	662,39± 62,24	59,49± 12,56	8,97±2,82	19,00±5,71	27,53±5,39	5,18±0,96	0,90±0,15	+
C13	566,58± 96,38	77,82± 3,77*	6,44±2,29*	26,50±5,71	34,78± 10,75*	6,78±1,59	1,10±0,3	–
C14	549,91± 88,73*	70,77± 11,97*	13,35±2,12	30,25±7,54*	43,17±2,93*	5,87±1,21	0,85±0,2	–
C15	737,38± 88,73	105,90± 26,08*	15,89±4,22*	9,50±1,02*	65,00±7,61*	5,24±0,35	0,95±0,2	–
C16	670,73± 103,87	86,41± 22,65*	19,34±4,32*	21,50±6,45	63,47±7,66*	5,85±0,12	1,10±0,2	–
C17	620,73± 101,43	68,72± 18,87	23,37±4,73*	24,75±7,62	71,90±8,64*	5,88±1,1	1,00±0,3	–
C18	637,40± 142,72	105,00± 8,35*	15,97±2,31*	35,25±5,06*	34,60±3,52*	7,41±0,47*	1,40±0,2*	–
C19	533,25± 67,38*	111,41± 22,69*	17,33±4,36*	35,75±6,01*	40,30±2,82*	5,68±0,37	1,00±0,18	+
C110	595,74± 68,30	65,00± 17,91	28,44±8,08*	36,50±3,69*	29,57±4,97	4,99±0,21	0,90±0,16	–

* – різниця з контрольною групою вірогідна ($p < 0,05$)

Таблиця 5

Показники фізіологічних і біохімічних маркерів стресу, ефекту та токсичності у *Danio rerio* за впливу ліпофільних фракцій, одержаних з харчових добавок на основі спіруліни ($M \pm m$, $n = 6$)

	GST, мкмоль / (хв*г тканини)	ТБК-АП, нмоль / г тканини	ХЕ, нмоль / (хв*мг протеїну)	КАТ, мкмоль/ (хв*мг протеїну)	АФО, У.О.Ф/ г тканини	Ушко- дження ДНК, %	Мікро- ядра, ‰	Терато- генність
CNTR	687,39± 164,67	56,03± 7,03	11,15±4,78	23,38±4,43	26,26±3,63	5,85±1,09	0,90±0,2	–
S1	679,06± 151,77	84,49± 20,54*	14,84±6,94*	24,50±8,2	31,54±2,73*	6,07±0,91	1,10±0,2	–
S2	666,56± 105,66	79,49± 15,48*	17,38±5,36*	19,00±5,38	53,80±8,2*	6,76±0,4*	1,00±0,2	–
S3	545,75± 91,04*	50,26± 7,35	15,87±4,44*	26,50±7,95	24,60±2,61	5,14±0,38*	1,10±0,3	–
S4	908,19± 170,76	61,67± 7,36	8,82±1,72*	18,50±3,69	25,90±4,46	5,89±1,42	0,95±0,2	–
S5	641,56± 46,54	48,21± 7,94*	24,57±8,48*	23,25±3,35	24,50±3,55	4,83±0,56*	0,85±0,2	–
S6	633,23± 123,13	66,41± 9,8	7,39±1,36*	24,00±10,02*	37,00±3,59*	5,75±0,65	1,00±0,2	–
S7	683,22± 103,87	82,82± 2,29*	11,15±1,95	36,00±6,04*	38,20±7,16*	5,62±0,8	1,10±0,2	–
S8	724,88± 175,69	47,18± 9,62*	8,46±2,46*	39,75±7,91*	25,50±2,29	5,09±0,58	0,85±0,1	–
S9	670,73± 129,56	50,38± 4,76	8,79±1,66*	27,50±5,03	25,83±3,66	5,33±1,43	0,90±0,1	–
S10	662,39± 48,73	47,95± 7,04*	7,88±2,04*	25,25±7,24	49,91±8,89*	5,88±0,78	0,95±0,1	–
S11	518,67± 121,88*	17,18± 3,1*	5,44±0,69*	31,25±10,09*	23,23±1,08	5,50±0,49	1,00±0,15	–
S12	712,37± 91,5	18,72± 2,76*	5,41±0,54*	29,63±5,15*	23,63±2,05	7,49±1,76*	1,10±0,2	–
S13	616,57± 117,42	21,03± 4,49*	5,39±1,19*	65,00±12,41*	27,67±3,96	4,47±0,43	1,00±0,15	–

* – різниця з контрольною групою вірогідна ($p < 0,05$)