

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Тихоокеанский океанологический институт им. В. И. Ильичева»
Дальневосточного отделения Российской академии наук**

На правах рукописи



КУКЛА СЕРГЕЙ ПЕТРОВИЧ

**ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДОВ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ
(CuO, ZnO, TiO₂, SiO₂) НА МОРСКИХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ
(НА ПРИМЕРЕ *MYTILUS TROSSULUS* И *SCAPHESCHINUS MIRABILIS*)**

1.5.15. Экология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ростов-на-Дону – 2023

Работа выполнена в лаборатории 5/1 «Морская экотоксикология»
федерального государственного бюджетного учреждения науки «Тихоокеанский
океанологический институт им. В.И. Ильичева» Дальневосточного отделения
Российской академии наук

Научный руководитель: **Челомин Виктор Павлович**,
доктор биологических наук, с.н.с., федеральное
государственное бюджетное учреждение науки
«Тихоокеанский океанологический институт им. В.И.
Ильичева» Дальневосточного отделения Российской
академии наук, лаборатория 5/1 «Морская
экотоксикология», заведующий

Официальные оппоненты: **Чуйко Григорий Михайлович**,
доктор биологических наук,
федеральное государственное бюджетное научное
учреждение науки «Институт биологии внутренних
вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук»,
заведующий лабораторией
Бугаев Леонид Анатольевич,
кандидат биологических наук, доцент по
специальности «Экология»,
федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Всероссийский научно-
исследовательский институт рыбного хозяйства и
океанографии», лаборатория молекулярной генетики и
физиологии рыб, заведующий

Защита диссертации состоится **22 ноября 2023 года в 14:00** на заседании
диссертационного совета ЮФУ801.01.01 по биологическим наукам на базе Академии
биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального
университета по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1, к. 712.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке им Ю.А.
Жданова Южного федерального университета по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону,
ул. Р. Зорге, 21 Ж и на сайте Южного федерального университета
<https://hub.sfedu.ru/diss/show/1319200/>

Автореферат разослан «__»_____2023 г.

Отзыв на автореферат в 2-х экз. (с указанием даты, полностью ФИО, ученой степени со
специальностью, звания, организации, подразделения, должности, адреса, телефона, e-mail),
заверенный печатью организации, просим направлять по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону,
пр. Стачки, 194/1, к. 803а, ученому секретарю диссертационного совета ЮФУ 801.01.01
Тимошенко А.Н., а также в формате .pdf на e - mail: atimoshenko@sfedu.ru

Ученый секретарь
диссертационного совета

Тимошенко Алёна Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. С конца XX века продукты нанотехнологии стали прочно входить в повседневную жизнь человека. На сегодняшний день наночастицы (НЧ) применяются практически во всех областях человеческой деятельности – от электроники и машиностроения до предметов личной гигиены, – производство и использование НЧ продолжает расти (Giese et al., 2017, Ahamed et al., 2021). НЧ уже содержатся в таких товарах, непосредственно контактирующих с человеком, как лекарственные средства и косметика (D'Mello et al., 2017, Fytianos et al., 2020).

При достижении наноразмеров материалы приобретают новые, не характерные для макроразмерных частиц того же материала, физические и химические свойства. Эти свойства дают товарам, содержащим НЧ, преимущество по сравнению с аналогичными товарами. Однако эти же свойства могут быть причиной высокой биологической активности НЧ. Существуют данные, что НЧ могут попадать в организм человека, преодолевая тканевой барьер, как через слизистые лёгких и пищеварительной системы, так и через непосредственно кожный эпидермис (Chen et al., 2020); внутри организма НЧ способны пересекать плацентарный и гематоэнцефалические барьеры (Sawicki et al., 2019, Bongaerts et al., 2020).

Кроме риска для здоровья человека, вызывают беспокойство последствия воздействия НЧ на экосистемы, в том числе морские. Ведь в процессе производства, эксплуатации и утилизации НЧ-содержащих продуктов неизбежно их попадание в окружающую среду. Конечной точкой их миграции чаще всего оказываются водные объекты. НЧ в том или ином виде обнаруживают в сточных, речных, озёрных и морских водах (Kaegi et al., 2008, Gondikas et al. 2014, Marcus et al. 2018, Souza et al. 2019). На сегодняшний день показан негативный эффект воздействия НЧ различной природы на водные организмы разных систематических групп (Baker et al., 2014). При этом НЧ склонны к постепенной седиментации в морской среде, постепенно накапливаясь в донных осадках (Bundschuh et al., 2018). Таким образом, воздействию НЧ будут подвержены чувствительные планктонные организмы и организмы бентосного сообщества. Тем не менее, такие характеристики взаимодействия НЧ с данными группами организмов, как биодоступность и особенности взаимодействия на клеточном и молекулярном уровнях организации до сих пор изучены слабо. Основная масса исследований в этой области проводится либо в рамках моделирования воздействия на человека, либо на модельных *in vitro* системах. Количество реальных экотоксикологических исследований воздействия НЧ оксидов металлов на сегодняшний день недостаточно для составления полной картины загрязнения ими окружающей среды.

Цель работы – изучить экотоксикологические последствия воздействия наночастиц оксидов микроэлементов (CuO , ZnO , TiO_2 , SiO_2) на типичных представителей дальневосточной фауны морских беспозвоночных: мидию тихоокеанскую *Mytilus trossulus* и необыкновенного плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis*.

Для достижения цели были определены следующие задачи:

1. Оценить биодоступность наночастиц оксидов микроэлементов (CuO , ZnO , TiO_2 , SiO_2) в сублетальных концентрациях для *Mytilus trossulus* и *Scaphechinus mirabilis*.
2. Выявить способность наночастиц оксидов микроэлементов, на примере CuO и TiO_2 , индуцировать окислительный стресс в клетках *Mytilus trossulus* и *Scaphechinus mirabilis*.

3. Оценить степень повреждения генома в тканевых клетках и гаметах модельных организмов (*Mytilus trossulus* и *Scaphechinus mirabilis*), при воздействии наночастиц оксидов микроэлементов (CuO, ZnO, TiO₂, SiO₂).

Научная новизна. Впервые на основе биомаркеров представлена сравнительная оценка сублетальных эффектов наноразмерных частиц оксидов металлов (CuO, ZnO, TiO₂) и неметаллов (SiO₂) на дальневосточные морские организмы. Показано, что исследованные наночастицы проявляют биологическую активность, вызывая окислительный стресс и повреждение генома в тканях *Mytilus trossulus* и гаметах *Scaphechinus mirabilis*.

Практическая значимость. Полученные данные вносят существенный вклад и дополняют уже существующие знания о токсичности наночастиц для морских организмов. И использованный в работе метод ДНК-комет может быть рекомендован в качестве экспресс-оценки экотоксикологической ситуации в морских акваториях с различной антропогенной нагрузкой. Результаты научного исследования могут быть включены в лекционные курсы программ бакалавриата, магистратуры и аспирантуры биологических направлений по таким дисциплинам как «Общая экология», «Биоиндикация и биотестирование», «Экотоксикология».

Защищаемые положения:

1. Несмотря на интенсивную агрегацию в морской среде, наночастицы оксидов микроэлементов (CuO, ZnO, TiO₂, SiO₂) проявляют биодоступность и накапливаются в мягких тканях (жабрах и пищеварительной железе) *M. trossulus* и гонадах *S. mirabilis*.

2. Наночастицы оксидов микроэлементов (CuO, ZnO, TiO₂, SiO₂) оказывают сублетальные эффекты на морских беспозвоночных, выражающееся в индицировании окислительного стресса и повреждении генома, как в соматических, так в половых клетках.

Личный вклад. Автор принимал непосредственное участие в планировании и постановки экспериментов, лежащих в основе диссертации. Автор лично участвовал в пробоподготовке, анализе и интерпретации данных о генотоксичности исследуемых материалов. Всего проведено для настоящей работы 7 серий экспериментов с 4 видами НЧ.

Соответствие паспорту специальности. Диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.15. «Экология», прежде всего, в пункте 10: «Антропогенное воздействие на популяции, сообщества и экосистемы. Биологические эффекты загрязнения среды токсичными веществами (экотоксикология). Разработка биологических методов и критериев оценки состояния среды, биоиндикация, биотестирование, биомониторинг. Разработка экологически обоснованных норм воздействия хозяйственной деятельности человека на живую природу».

Апробация работы. Результаты исследований были представлены и неоднократно обсуждались на: 6, 7, 8, 9-ой конференциях молодых ученых «Океанологические исследования», Владивосток, 2013, 2016, 2018, 2021 гг.; I межрегиональной молодежной школы-конференции «Актуальные проблемы биологических наук» (Владивосток, 2013); III Международной научно-технической конференции «Актуальные проблемы освоения биологических ресурсов Мирового океана» (Владивосток, 2014); V Всероссийской конференции по водной экотоксикологии, посвященной памяти Б.А. Флерова, с приглашением специалистов из стран ближнего зарубежья «Антропогенное влияние на водные организмы и системы» (Борок, 2014); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, приуроченной к 145-летию Севастопольской

биологической станции «Морские биологические исследования: достижения и перспективы» (Севастополь, 2016); Второй всероссийской конференции с международным участием, приуроченной к году экологии в России «Дальневосточные моря и их бассейны: биоразнообразие, ресурсы, экологические проблемы» (Владивосток, 2017); Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 20-летию Международной кафедры ЮНЕСКО «Морская экология» ДВФУ «Прибрежно-морская зона Дальнего Востока России: от освоения к устойчивому развитию» (Владивосток, 2018).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 110 страницах, состоит из введения, 7 глав, выводов, списка литературы, включает 5 таблиц и 21 рисунка. Список литературы включает 190 источник, из которых 174 иностранных.

Публикации. По теме диссертации опубликованы 17 научных работ, из них 8 статей, опубликованных в изданиях, входящих в базы данных международных индексов научного цитирования Scopus и/или Web of Science.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю д.б.н., старшему научному сотруднику ТОИ ДВО РАН Челомину В.П. за помощь на всех этапах планирования и выполнения работы и анализа полученных результатов. Автор благодарит научного сотрудника ТОИ ДВО РАН, к.б.н. Слободскову В.В., а также к.б.н., доцента Международной кафедры ЮНЕСКО «Морская экология» Института мирового океана ДВФУ Журавель Е.В., без участия которых данная работа не была бы выполнена. Кроме этого, автор выражает благодарность всему коллективу лаборатории морской экотоксикологии ТОИ ДВО РАН за постоянную моральную поддержку и внимание, конструктивные замечания и советы в процессе исследования.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе представлен обзор основных источников НЧ оксидов микроэлементов, а также предполагаемые их концентрации в окружающей среде. Дана краткая историческая справка о формировании господствующей на сегодняшний день модели взаимодействия НЧ с живой клеткой. Описаны современные гипотезы об аккумуляции НЧ клеткой, их способности генерировать в среде клетки активные формы кислорода (АФК), механизмы их генотоксичности.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследований были выбраны два вида, являющиеся типичными массовыми представителями литоральной зоны Японского моря: *Mytilus trossulus* для скальных грунтов и *Mytilus trossulus* – для песчаных. Оба вида в виду своих характеристик являются удобным объектом для экспериментальных экотоксикологических исследований.

Тип *Mollusca* (Моллюски)

Класс *Bivalvia* (Двустворчатые)

Отряд *Mytilida* (Мидиеобразные)

Семейство *Mytilidae* (Мидии)

Вид *Mytilus trossulus* (Gould, 1850)

Тип *Echinodermata* (Иглокожие)

Класс *Echinoidea* (Морские ежи)

Отряд *Clypeasteroidea* (Плоские ежи)

Семейство *Scutellidae* (Плоские ежи)

Вид *Scaphechinus mirabilis* (Agassiz, 1864)

2.1. Мидия тихоокеанская

Мидия тихоокеанская *Mytilus trossulus* (Gould, 1850) – небольшой (до 6 см) двустворчатый моллюск, ведущий прикрепленный образ жизни. Образует большие скопления на скальных выходах и различных антропогенных сооружениях, являясь доминантным видом на образовавшихся сообществах. Как моллюск-фильтратор, способна пропускать через себя большой объем воды за короткий срок. Является промысловым видом.

2.2. Необыкновенный плоский морской ёж

Необыкновенный плоский морской ёж *Mytilus trossulus* (Agassiz, 1864) – небольшой (6 см в диаметре) плоский морской ёж темно фиолетового или пурпурного цвета дисковидной или пятиугольной формы. Образует большие многолетние скопления на песчаных грунтах. Питается взвешенным органическим веществом, одноклеточными, в особенности диатомовыми, водорослями, мелкими веслоногими и корненожками. Кроме этого, потребляет их вместе с грунтом. Является потенциальным промысловым видом, т. к. является источником нескольких биологически активных веществ.

ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Описание экспериментов

В основу диссертации положены результаты, полученные автором с 2013 по 2020 гг.

Животные подвергались воздействию НЧ оксидов микроэлементов: оксида меди (50 нм), оксида цинка (50 нм) и диоксида титана (20 нм) (рис.1) и диоксида кремния (20 нм). Время экспозиции и используемая доза НЧ представлены в таблице 1. В экспериментах использовались концентрации, наиболее широко распространённые в работах подобного плана для данного вида НЧ.

Таблица 1 – Перечень экспериментов по изучению экотоксикологического эффекта НЧ оксидов микроэлементов, с указанием времени воздействия и концентрации.

НЧ	<i>M. trossulus</i>	<i>S. mirabilis</i> взрослые	<i>S. Mirabilis</i> сперматозоиды
CuO	20 мкг/л (7 дней)	20, 40 мкг/л (10 дней)	-
ZnO	-	100, 200 мкг/л (10 дней)	20, 50, 100, 200 мкг/л (1ч)
TiO ₂	200, 1000 мкг/л (10 дней)	-	-
SiO ₂	5 мг/л (6 дней)	-	5, 10, 100 мг/л (1ч)

Каждая группа (20 особей), как контрольная так и экспериментальная, размещались в отдельных 20 л аквариумах. Вода в аквариумах полностью менялась раз в сутки.

После окончания эксперимента жабры и пищеварительная железа мидий, а также в гонады плоского ежа извлекались и использовались для определения содержания элементов, содержания продуктов перекисного окисления и оценки степени повреждения ДНК (в случае *S. mirabilis*, в зависимости от эксперимента, использовались сперматозоиды и личинки). Кроме того, для оценки качества сперматозоидов использовался стандартный эмбриотест.

3.2. Используемые методы

3.2.1. Эмбриотест

Эмбриотест проводился по стандартной для подобного рода исследования методике (Kobayashi, 1984), заключающейся в подсчёте доли нормально развитых эмбрионов на таких стадиях развития, как оплодотворение (по наличие оболочки оплодотворения - 30 с), формирование бластулы (через 8 ч), гаструлы (через 18 ч) и среднего плутеуса (48 ч). На стадии среднего плутеуса так же оценивался размер личинки. Промеры личинок проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Axio ImagerA1 (Carl Zeiss). Подсчет проводили в 4 родительских парах, каждая в 4 параллелях ($n = 16$), содержащих не менее 100 зигот.

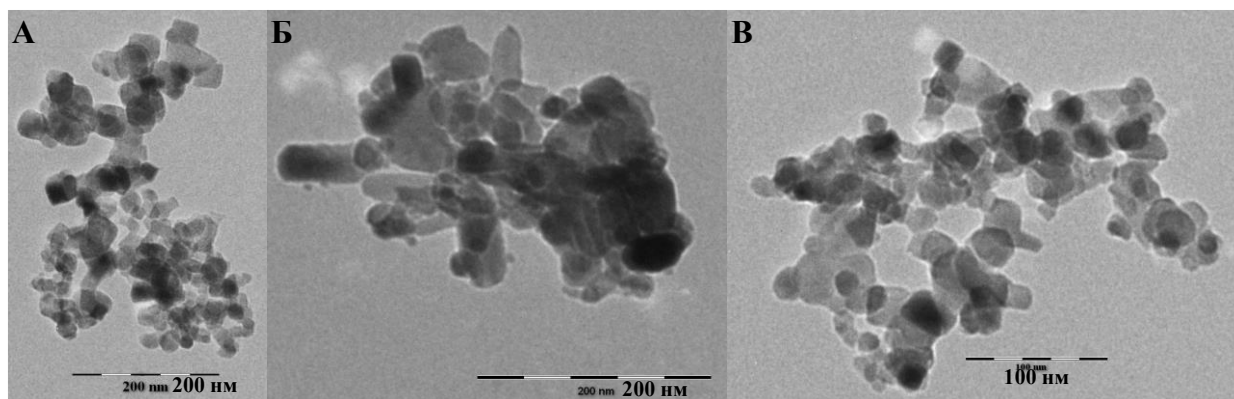


Рисунок 1 – Электронные фотографии используемых в экспериментах НЧ.

А – НЧ оксида меди, Б – НЧ оксида цинка, В – НЧ диоксида титана.

3.2.2. Метод ДНК-комет

Для оценки генотоксичности НЧ использовался метод гель электрофореза одиночной клетки, так же известный, как «кометный анализ». Метод основан на повышенной подвижности поврежденных участков ДНК в агарозном геле, под действием электрического поля. В результате чего ДНК клетки представляет собой «комету», состоящую из неповрежденной «головы» и образованного мигрирующими повреждёнными участками ДНК «хвоста». Доля ДНК в хвосте, позволяет оценить степень повреждения ДНК. Кометный анализ состоит из приготовления агарозно-клеточной суспензии, лизиса клеток, инкубации в щелочной среде, электрофореза, нейтрализации щелочной среды, окраски флуоресцентным красителем, микроскопического анализа и обработки полученных данных.

Готовые гель слайды фотографировались с помощью сканирующего флуоресцентного микроскопа (Zeiss, AxioImager A1), оснащенного цифровой фотокамерой AxioCam MRc. Полученные фотографии анализировались при помощи компьютерной программы CaspLab. Для анализа использовались ткани/гаметы 5 животных, в 3 параллелях ($n = 15$), содержащих не менее 100 комет.

3.2.3. Определение малонового диальдегида

В качестве показателя окислительного стресса был выбран малоновый диальдегид (МДА) являющейся конечным продуктом перекисного окисления липидов (ПОЛ). Концентрацию МДА определяли при помощи цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (Buege and Aust, 1978). Все операции с тканью проводилось на льду. Необработанный

материал хранился при температуре -80°C . Подсчет проводили на 5 животных, в 3 параллелях ($n = 15$).

3.2.4. Определение микроэлементов

Концентрацию микроэлементов в пищеварительной железе, жабрах и гонадах определяли при помощи спектрофотометра «Shimadzu AA-610S». Пробоподготовка производилась по методу мокрого озоления в смеси концентрированных кислот. Процесс минерализации протекал до потери цвета в исследуемых образцах. Полученный остаток растворялся в соляной кислоте и использовался непосредственно в атомно-абсорбционном анализе. Контроль качества анализа проводился, используя сертифицированные образцы моллюсков. Подсчет проводили на 5 животных, в 3 параллелях ($n = 15$).

3.2.5. Статистическая обработка

Полученные в ходе всех экспериментов данные обрабатывали с помощью пакетов программ MS Excel и Statistica 10. Нормальность распределения определяли при помощи критерия Шапиро-Уилка. После того, как было установлено, что распределение имеет не нормальный характер, достоверную значимость различий определяли, используя однофакторный дисперсионный анализа ANOVA по непараметрическому критерию Краскела-Уоллиса с последующим парным тестом Манна-Уитни ($p < 0,05$).

ГЛАВА 4. ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА МЕДИ

4.1. Сравнение воздействия наночастиц CuO и Cu^{2+} на *M. trossulus*

За время пребывания в равных экспериментальных условиях (20 мкг CuO/л, 7 сут.) в клетках моллюсков, подвергшихся воздействию НЧ и ионов меди, были отмечены достоверные различия в скорости аккумуляции меди и образовании повреждений молекулы ДНК.

Таблица 2 – Концентрация меди (мкг/г сырой массы) в органах *M. trossulus*, после воздействия НЧ и ионов меди (среднее $\pm$ станд. откл $n=15$)

* – отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$.

	Контроль	Cu^{2+}	НЧ CuO
Жабры	10,9 $\pm$ 0,5	147 $\pm$ 13*	31,9 $\pm$ 6,8*
Пищеварительная железа	9,1 $\pm$ 0,5	91 $\pm$ 9*	115 $\pm$ 9*

По завершению опыта у мидий, подвергшихся воздействию ионов меди, отмечено увеличение содержания этого металла более чем в 8 раз в пищеварительной железе и более чем 16 раз в жабрах по сравнению с контрольными. При этом после воздействия НЧ медь накапливалась активней в пищеварительной железе (в 10,5 раз, по сравнению с контролем), чем в жабрах, где увеличение концентрации меди увеличилась в 3,5 раза (табл. 2). Полученные результаты свидетельствуют о том, что агрегированные НЧ в основном доступны пищеварительной железе, в то время как растворённые формы более доступны жабрам моллюска.

При анализе полученных ДНК-комет видно, что воздействие, как ионов меди, так и НЧ вызвало деструктивные изменения в ДНК, как жабр, так и пищеварительной железы *M.*

trossulus (рис. 1). При этом следует подчеркнуть, что клетки жабр показали статистически более высокий уровень повреждения ДНК, демонстрируя повышенную чувствительность к потенциальной генотоксичности этих соединений. Очевидно, защитные системы в клетках жабр слабее, чем в клетках пищеварительной железы, поэтому логично предположить, что ДНК клеток жабр является чувствительной мишенью воздействия НЧ на моллюсков.

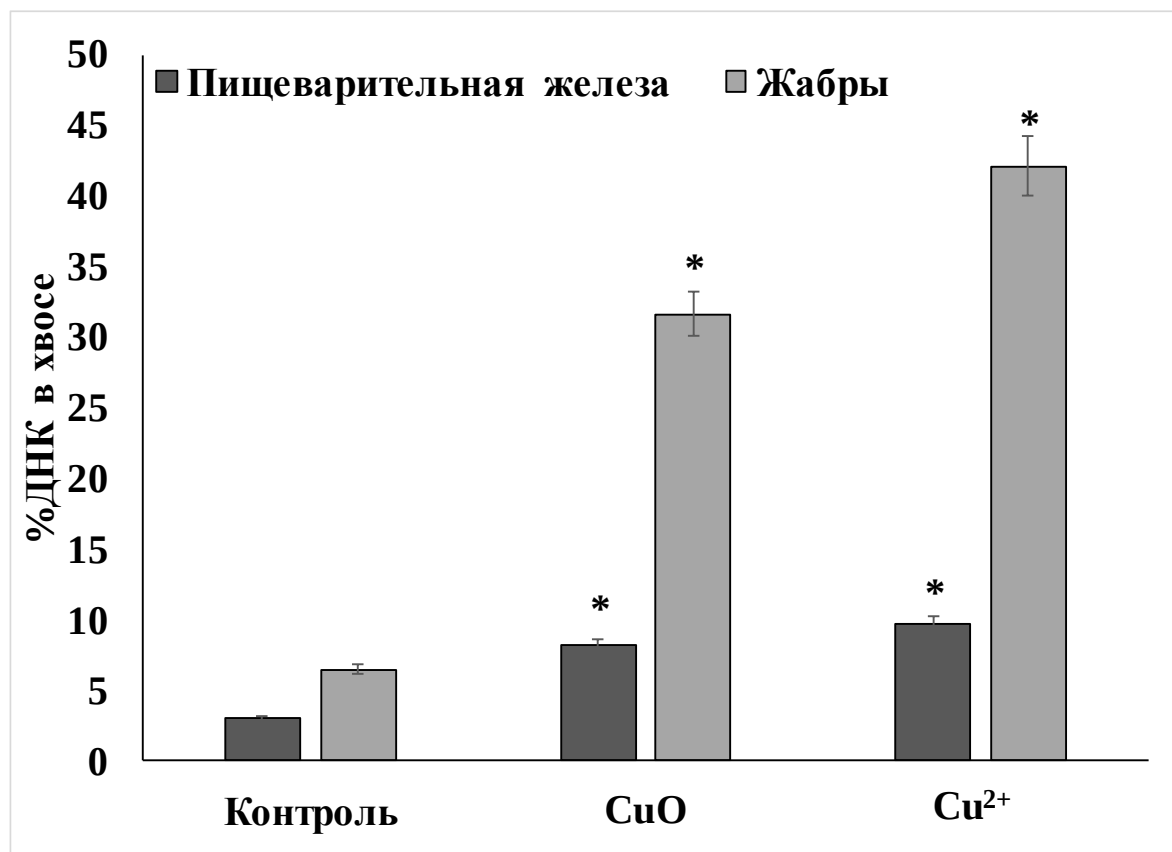


Рисунок 2 – Степень повреждения ДНК жабр и пищеварительной железы *M. trossulus* после воздействия НЧ CuO и ионов меди (среднее $\pm$ станд. откл $n=15$)
* – отличие от контроля достоверно при $p<0,05$

4.2. Воздействие наночастиц CuO на плоского морского ежа *S. mirabilis*

Взрослые морские ежи подвергались воздействию НЧ оксида меди в течение 10 суток.

Атомно абсорбционный анализ гонад *S. mirabilis* показал, что после 10 дней воздействия CuO-НЧ содержание меди в этой ткани возросло в 3 раза (рис. 2А). Результаты подтверждают биодоступность CuO-НЧ для плоского морского ежа. Частицы могли поступить в тело ежа через пищеварительную или амбулокральную системы, после чего быть захваченными целоμοцитами, а далее разнестись по другим системам организма. Так же следует отметить, что достоверного различия в накоплении меди между концентрациями 20 мкг/л и 40 мкг/л не было выявлено.

Измерение содержания МДА в гонадах плоского морского ежа показало, что в организмах, подвергавшихся воздействию CuO-НЧ в концентрации 20 мкг/л, он вырос в два раза, а при 40 мкг/л – более чем в три раза (рис. 3Б). Выявленные изменения уровня МДА, как одного из главных продуктов перекисного окисления, свидетельствуют о том, что гонады ежа находились в состоянии окислительного стресса.

Процент ДНК в хвосте, в клетках гонад ежа после воздействия CuO-НЧ вырос почти в 4 раза по сравнению с соответствующим показателем у контрольных организмов (рис. 3В). Повышение этого показателя говорит о том, что воздействие CuO-НЧ на плоского морского ежа привело к повреждению ДНК в его сперматозоидах. Нельзя исключать возможность непосредственного взаимодействия НЧ с генетическим аппаратом сперматозоидов. Тем не менее, наличие явно выраженного окислительного стресса, свидетельствует о том, что наиболее вероятной причиной повреждения ДНК является воздействие на него активных форм кислорода (АФК). Однако это не исключает сценарий, при котором НЧ попадают в клетку, т.к. активное образование АФК могло происходить при непосредственном взаимодействии НЧ с внутренней средой клетки, за счёт огромной площади НЧ.

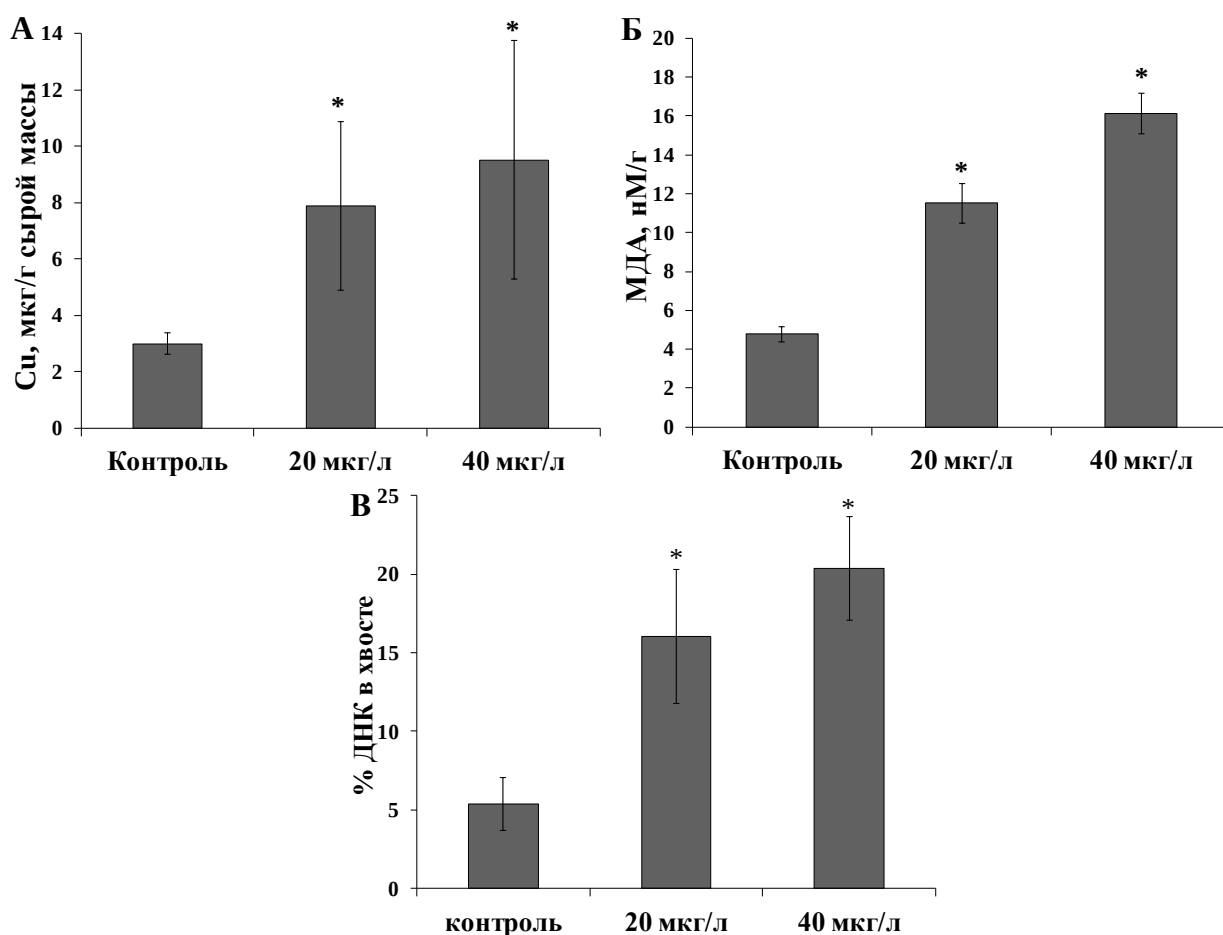


Рисунок 3 – Влияние НЧ оксида меди на гонады ежа *S. mirabilis*. А – содержания меди; Б – концентрация МДА; В – повреждение ДНК (среднее $\pm$ станд. откл $n=15$)

* – отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$.

Стандартный эмбриотест показал достоверно значимые отличия в показателях оплодотворения между контролем и экспериментальными группами только при концентрации 40 мкг/л. Отклонений развития на стадиях бластулы, гастрюлы и раннего плутеуса так же не наблюдалось (рис. 4А). Средний размер личинки так же не отличался от группы к группе (рис. 4Б).

Сравнивая результаты эмбриотеста с данными кометного анализа и анализа уровня МДА, следует учитывать, что ответ организма на субклеточном и биохимическом уровнях наступает значительно раньше по времени и при меньших концентрациях загрязняющих веществ. Важно заметить, что повреждения ДНК, могут иметь более длительные

последствия и привести к нарушениям у взрослых особей, либо в будущих генерациях морских ежей.

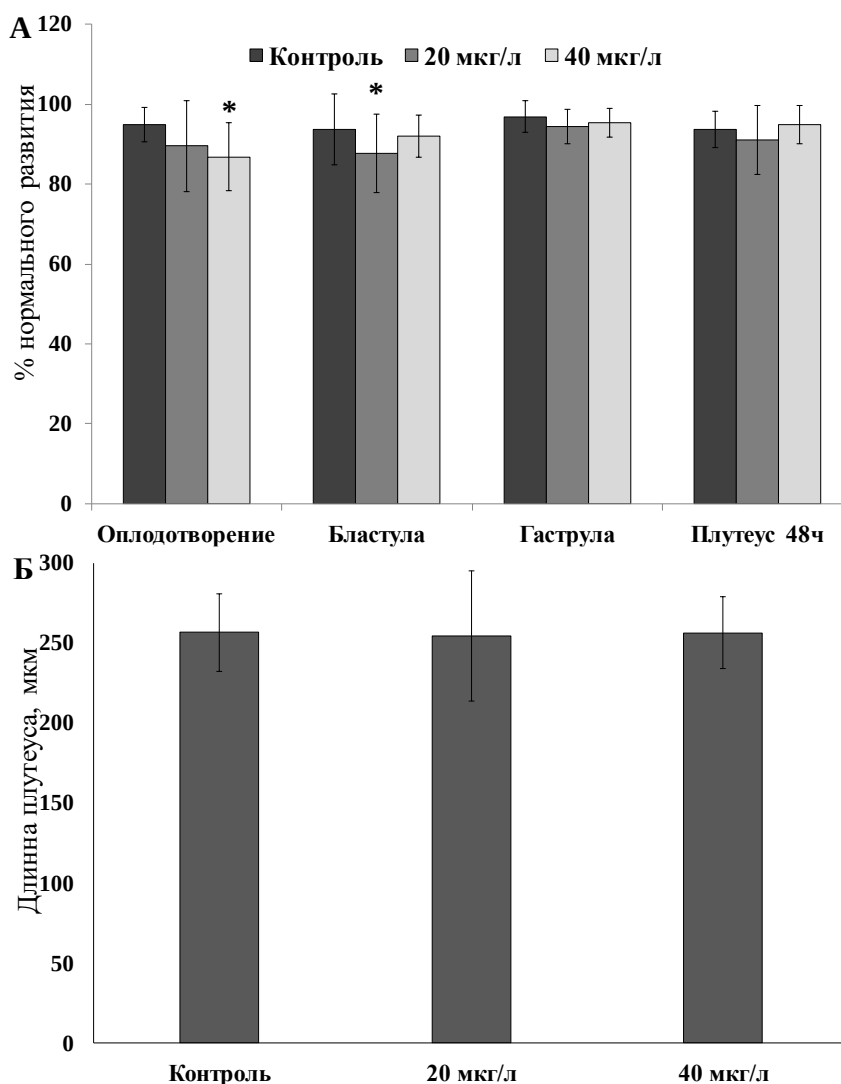


Рисунок 4 – Влияние НЧ оксида меди на раннее развитие плоского морского ежа *S. Mirabilis*: А – доля нормально развитых особей на разных стадиях развития; Б – длина 48ч плутеуса (среднее $\pm$ станд. откл $n=16$).
* – отличие от контроля достоверно при $p<0,05$.

ГЛАВА 5. ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЦИНКА

5.1. Сравнение воздействия наночастиц ZnO и Zn^{2+} на плоского морского ежа *S. mirabilis*

Взрослые плоские морские ежи подвергались воздействию НЧ и ионов цинка (100 и 200 мкг/л) в течение 10 суток. Воздействие, как НЧ, так и ионов цинка привело к увеличению его концентрации в мягких тканях *S. mirabilis*, по сравнению с контрольной группой (рис. 5). Стоит заметить, что при сравнении равных тестовых концентраций, накопление цинка при воздействии НЧ было достоверно выше, чем при воздействии ионной формы.

Степень повреждения ДНК сперматозоидов, полученных у ежей всех экспериментальных групп, превышала контрольные значения. Важно отметить, что самый высокий уровень повреждения наблюдался после воздействия НЧ в концентрации 200 мкг/л (табл. 3).

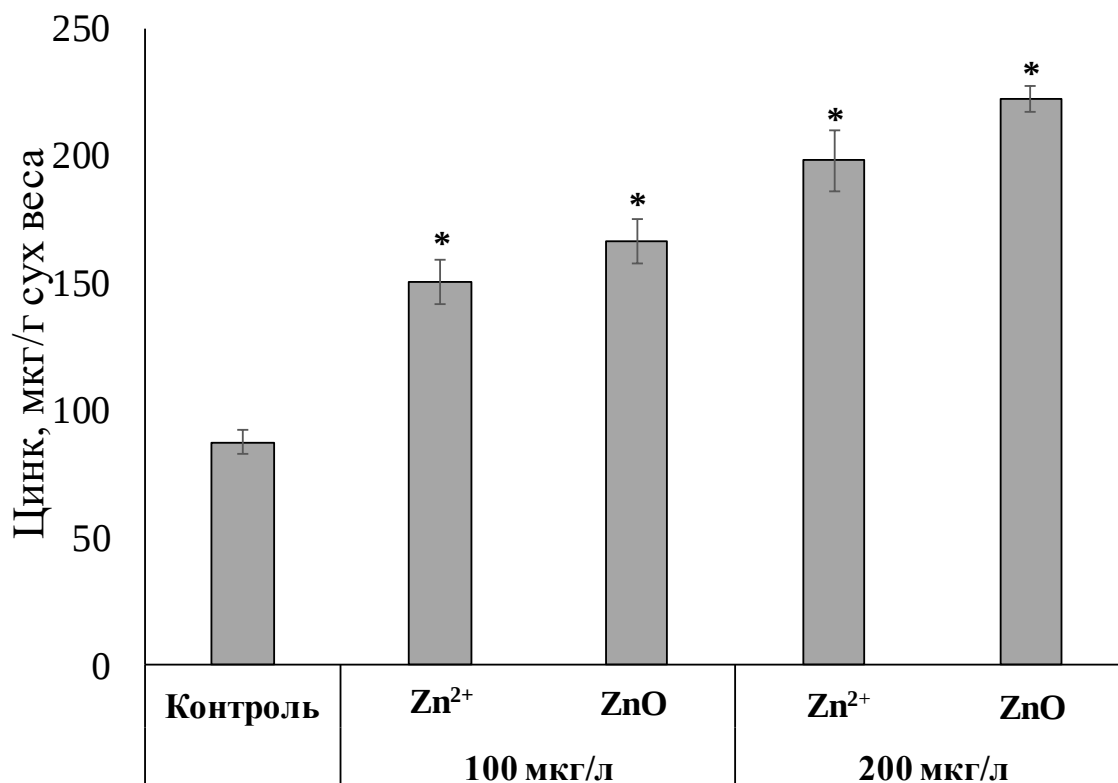


Рисунок 5 – Концентрация цинка в гонадах *S. mirabilis*, после воздействия НЧ и ионов цинка (среднее $\pm$ станд. откл $n=15$)
 * – отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$.

Таблица 3 – Повреждение ДНК в сперматозоидах *S. mirabilis* (среднее $\pm$ станд. откл $n=15$); * – отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$

Концентрация	Контроль	100 мкг/л Zn ²⁺	100 мкг/л ZnO	200 мкг/л Zn ²⁺	200 мкг/л ZnO
% ДНК в хвосте	5,71 $\pm$ 0,54	12,17 $\pm$ 0,81*	10,61 $\pm$ 0,9*	18,41 $\pm$ 0,83*	21,48 $\pm$ 1,01*

Экспериментальные воздействия вызывали отклонения в развитии эмбрионов плоского морского ежа на разных стадиях его развития. Наибольшее отклонение наблюдалось на стадии 48 ч. плутеуса – самой поздней стадии из исследуемых в данной работе. Стоит отметить, что только эффект НЧ в концентрации 200 мкг/л достоверно отличался от контроля на всех исследуемых стадиях эмбриогенеза (рис. 6А).

Кроме значительного роста числа отклонений на поздней стадии, в экспериментальной группе отмечалось достоверное уменьшение среднего размера нормально развитых личинок (рис. 6Б). Это говорит о том, что даже те личинки, у которых отсутствуют аномалии паталогического характера, находятся в угнетённом состоянии.

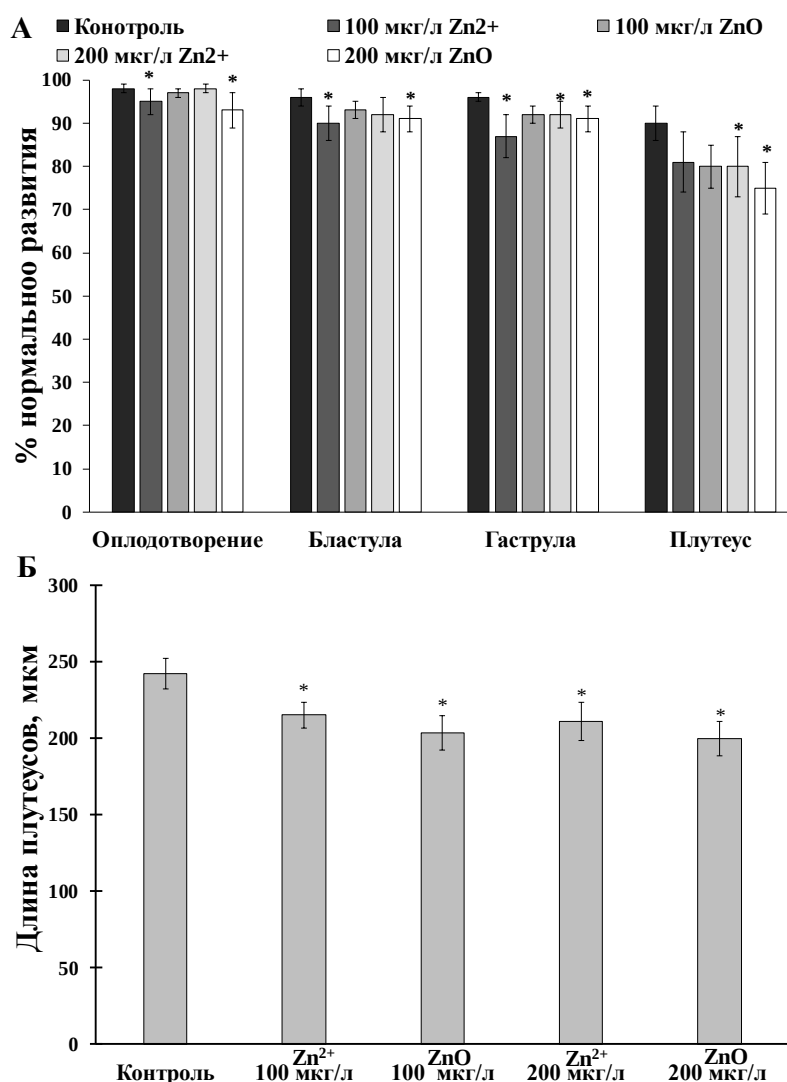


Рисунок 6 – Влияние НЧ оксида цинка и ионов цинка на раннее развитие плоского морского ежа *S. Mirabilis*:

А – доля нормально развитых особей на разных стадиях развития;

Б – длина 48ч плутеуса. (среднее $\pm$ станд. откл n=16)

* – отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$.

Результаты кометного анализа в клетках плутеусов показал, что воздействие на взрослого ежа привело к повреждению ДНК его личинок. Как в группе, подвергшейся воздействию ионов, так и в группе, подвергшейся воздействию НЧ, степень повреждения ДНК превышала контрольные значения (табл. 4)

Факт, что воздействие одинаковых концентраций НЧ и ионов цинка дают разные результаты, говорит о том, что воздействие НЧ оксида цинка, не сводится к воздействию растворённого цинка. В токсический эффект вероятно вовлечены собственные, характерные только для НЧ механизмы.

Таблица 4 – Повреждение ДНК в плутеусах *S. mirabilis*, после 10 дней эксперимента. (среднее $\pm$ станд. откл n=15); * – отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$

Концентрация	Контроль	100 мкг/л Zn ²⁺	100 мкг/л ZnO	200 мкг/л Zn ²⁺	200 мкг/л ZnO
% ДНК в хвосте	3,96 $\pm$ 0,21	8,85 $\pm$ 0,52*	8,69 $\pm$ 0,32*	12 $\pm$ 0,91*	14,42 $\pm$ 0,44*

5.2. Сравнение воздействия наночастиц ZnO и Zn^{2+} на сперму *S. mirabilis*

Острое воздействие НЧ и ионов цинка на сперму – в концентрациях 20, 50, 100 и 200 мкг/л – привело к повреждению в ДНК сперматозоидов. В случае воздействия ионов цинка, с ростом концентрации наблюдался постепенный рост уровня повреждения ДНК, в то время как экспозиция НЧ оксида цинка привела к одному уровню повреждения для всех используемых концентраций (рис. 7).

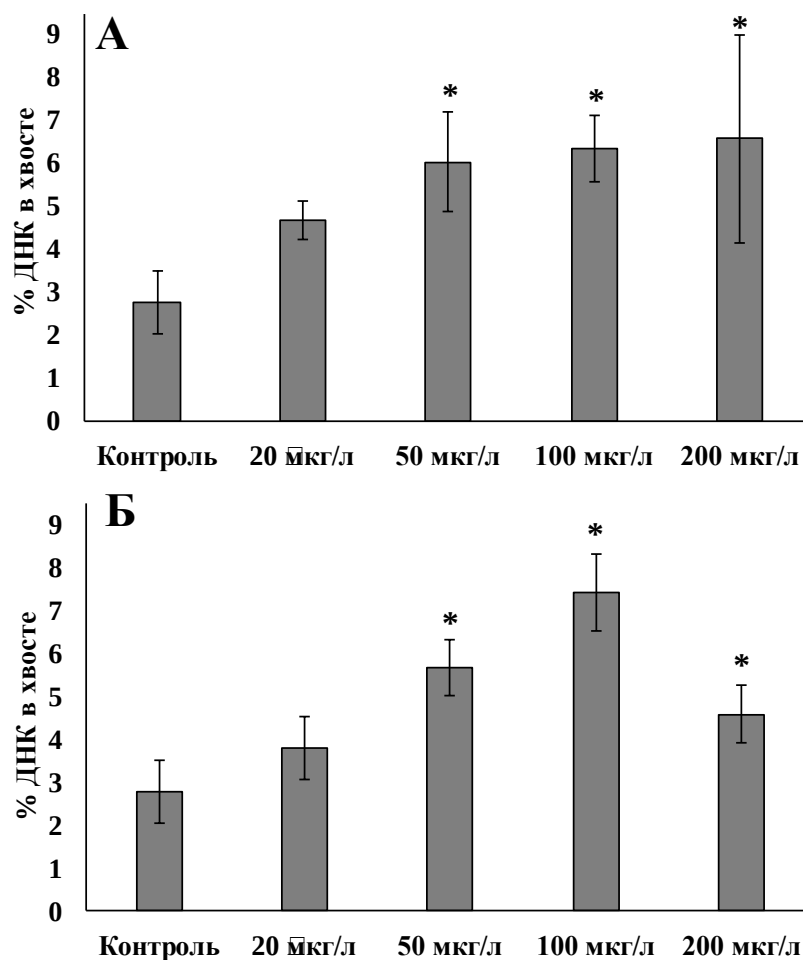


Рисунок 7 – Повреждение ДНК в сперматозоидах *S. mirabilis*, после 1 часа экспозиции:

А – воздействие ионов цинка;

Б – воздействие НЧ оксида цинка (среднее $\pm$ станд. откл $n=15$)

* – отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$

Нелинейную зависимость повреждения ДНК сперматозоидов от концентрации НЧ фиксировал в своей работе Oliviero с коллегами (2019). Они отмечали, что в независимости от размера НЧ ZnO, с ростом концентрации наблюдается постепенный рост числа сильно повреждённых «комет», доходя до максимального значения (3 мкМ – в их случае), но с дальнейшим ростом концентрации этот показатель начинает постепенно уменьшаться, в отличие от воздействия растворённого цинка. В экспериментах по растворимости разных концентраций НЧ ZnO и CuO было показано, что чем больше концентрация НЧ, тем меньше ионов данного металла присутствует в растворе (Mwaanha et. al. 2014). Таким образом, при воздействии высоких концентраций НЧ ZnO образовывали крупные агрегаты, являющиеся

менее биодоступными и с меньшей скоростью диссоциации, по сравнению с менее крупными агрегатами и первичными частицами, содержание которых должно быть больше при воздействии низких концентраций НЧ.

ГЛАВА 6. ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА НА *M. TROSSULUS*

В условиях эксперимента мидии *M. trossulus* аккумулировали НЧ TiO_2 за счет фильтрационной деятельности и, в основном, накапливали их в пищеварительной железе. На десятые сутки эксперимента содержание титана в этой ткани составляло $31,3 \pm 3,6$ и $129,6 \pm 6,5$ мкг/г сух. веса для концентраций 200 и 1000 мкг/л соответственно. В жабрах достоверное накопление титана ($5,5 \pm 0,3$ мкг/г сух. веса) было отмечено только при концентрации НЧ 1000 мкг/л, а ткани, обработанные 200 мкг/л, не содержали титана в определяемых концентрациях (рис. 8).

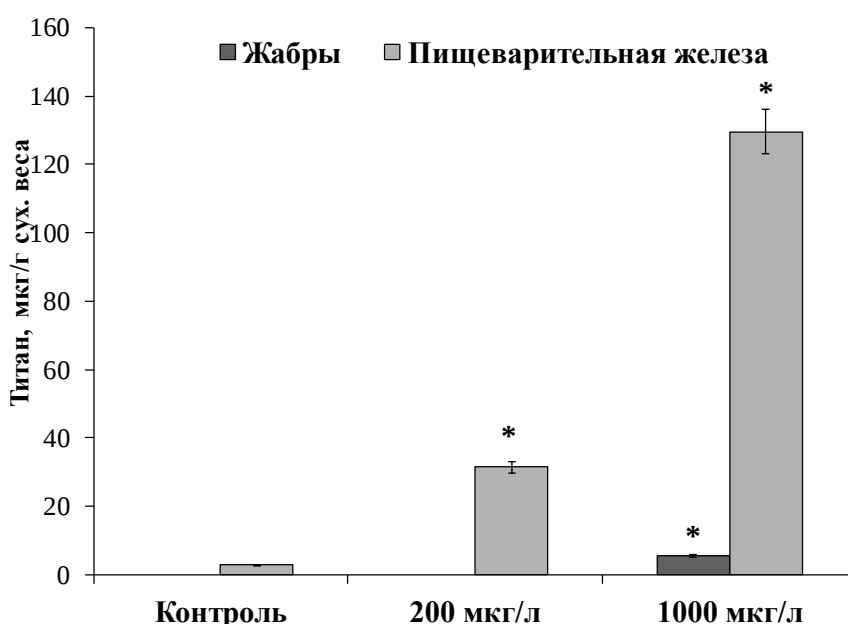


Рисунок 8 – Концентрация титана в тканях *M. trossulus*, после воздействия НЧ диоксида титана (среднее $\pm$ станд. откл n=15)

* – отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$

Уровень МДА измерялся в тканях контрольных и экспонированных моллюсков как индикатор ПОЛ, потенциально индуцируемого продукцией АФК. Результаты показали, что на десятые сутки содержание МДА в пищеварительной железе и жабрах, экспонированных 1000 мкг/л НЧ TiO_2 мидий, было примерно в 2,0 раза выше, чем у контрольных. Концентрации НЧ 200 мкг/л не оказали достоверного влияния на уровень МДА в жабрах (рис. 9).

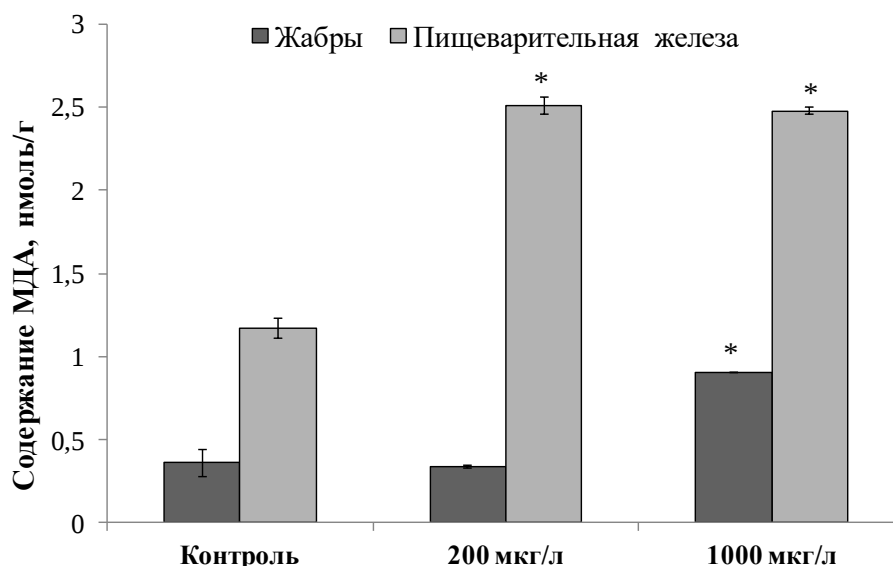


Рисунок 9 – Концентрация МДА в тканях *M. trossulus*, после воздействия НЧ диоксида титана (среднее $\pm$ станд. откл $n=15$)

* – отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$

Воздействие НЧ TiO_2 привело к достоверному увеличению повреждения ДНК жабр и пищеварительной железы в клетках всех исследуемых групп. На десятые сутки, при концентрации НЧ 1000 мкг/л наблюдалось превышение контрольных значений более чем в 2,5 раза для пищеварительной железы и более чем в 4 раза для жабр, что составило $4,7 \pm 0,2$ и $12,82 \pm 0,6$ % ДНК в хвосте соответственно (рис. 10).

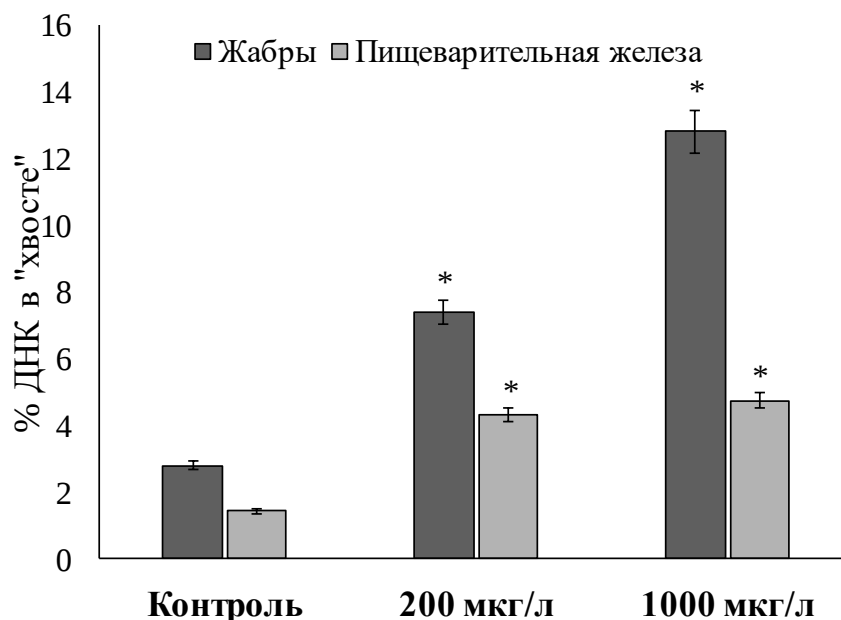


Рисунок 10 – Повреждение ДНК в тканях *M. trossulus*, после воздействия НЧ диоксида титана (среднее $\pm$ станд. откл $n=15$)

* – отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$

Чаще всего деструктивные изменения в живой клетке, вызванные воздействием НЧ, связывают с окислительным стрессом (Jugan et al., 2012, Manke et al., 2013, Chen et al., 2014). Показанный выше рост уровня МДА, соотносится с этими работами. Важно отметить, что, несмотря на слабую степень аккумуляции титана в жабрах, процент повреждения в их

клетках был выше, чем в пищеварительной железе, где была зафиксирована значительная аккумуляция титана. Ранее подобный эффект отмечался, например, у полихеты *Arenicola marina*, где повреждения ядерной ДНК увеличивалось после воздействия НЧ TiO_2 даже при отсутствии проникновения частиц внутрь клеток (Galloway et al., 2010). Исследования на микроводоросли *Dunaliella tertiolecta* так же показали генерацию АФК, без проникновения НЧ внутрь. Среди свойств НЧ TiO_2 , которые могут это объяснить, можно отметить их способность поглощать УФ-излучение и генерировать АФК на своей поверхности. В водной среде НЧ TiO_2 могут сорбироваться на поверхности жабр, где будет происходить УФ-активация комплекса между НЧ и жаберными клетками, что может привести к реакции переноса заряда лиганда на металл, в результате чего мембрана жаберных клеток подвергается окислению. Другие потенциальные взаимодействия между НЧ TiO_2 и жаберными клетками может возникать посредством диффузии TiO_2 -опосредованной АФК с поверхности НЧ на липидную мембрану или в окружающую среду (Miller et al., 2012).

ГЛАВА 7. ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ

7.1. Воздействие наночастиц SiO_2 на *M. trossulus*

Проведённые эксперименты показали, что в обоих исследованных органах контрольной группы не было выявлено кремния в определяемых количествах. Однако, после 6 дней воздействия НЧ на *M. trossulus* в пищеварительной железе был зафиксирован рост содержания кремния до значений $11,04 \pm 0,3$ мкг/г сух веса (табл. 5). Это ещё раз поддерживает предыдущие результаты экспериментов с другими НЧ на *M. trossulus*, указывая на то главный орган моллюска, накапливающий НЧ – это пищеварительная железа. Основным способ поступления НЧ в клетку – различные виды эндоцитоза, которые наиболее активны в этом органе (Eom, Choi 2019).

Таблица 5 – Концентрация кремния (мкг/г сырой массы) в органах *M. trossulus*, после воздействия НЧ диоксида кремния (среднее $\pm$ станд. откл $n=15$)

* – отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$

	Контроль	Эксперимент
Жабры	следы	следы
Пищеварительная железа	следы	$11,04 \pm 0,3^*$

Для оценки влияния накопления НЧ диоксида кремния на ДНК *M. trossulus* был проведён кометный анализ. По его результатам уровень повреждения ДНК, как для пищеварительной железы, так и для жабр увеличился более чем в два раза, по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы (рис. 11).

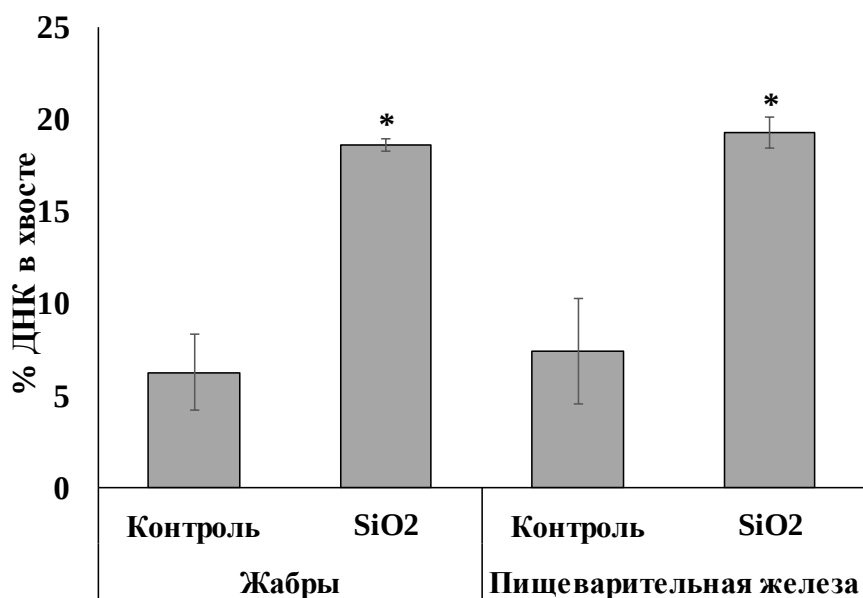


Рисунок 11 – Повреждение ДНК в тканях *M. trossulus*, после воздействия НЧ диоксида кремния (среднее $\pm$ станд. откл $n=15$)

* – отличие от контроля достоверно при $p<0,05$

Принимая во внимание разную степень аккумуляции кремния, можно предположить, что НЧ диоксида кремния могут вызывать повреждение ДНК несколькими путями. В случае с клетками пищеварительной железы имеет место быть повреждение, вызванное попаданием НЧ внутрь клетки. В ряде статей токсичность НЧ связывают с их диссоциацией в воде или внутренней среде клетки. Однако, в случае воздействия НЧ диоксида кремния, данная теория не применима ввиду высокой стабильности данного вещества, отмеченного исследователями (Ahamed et al., 2021, Ale et al., 2021). Можно предположить, что повреждение ДНК в клетках *M. trossulus* было вызвано образованием АФК на поверхности НЧ внутри клетки. С другой стороны, воздействие НЧ на целостность ДНК жабр, не может быть следствием попадания НЧ внутрь. Следовательно, повреждения ДНК жабр, являются следствием экзогенного взаимодействия НЧ диоксида кремния с мембраной клетки. Высокая площадь НЧ подразумевает нахождение большого числа атомов с высокоэнергетическими связями, легко реагирующими с окружающими молекулами (Nabeshi et al., 2011).

7.2. Острое воздействие наночастиц SiO₂ на сперму *S. mirabilis*

После острого воздействия НЧ SiO₂ на сперматозоиды контрольной группы, показатель повреждения ДНК составлял $5,20 \pm 1,18$ % ДНК в хвосте. При воздействии НЧ он вырос до значений $8,89 \pm 2,05$, $10,67 \pm 3,9$ и $11,99 \pm 1,74$ % ДНК в хвосте, для 5, 10 и 100 мг/л соответственно (рис. 12А).

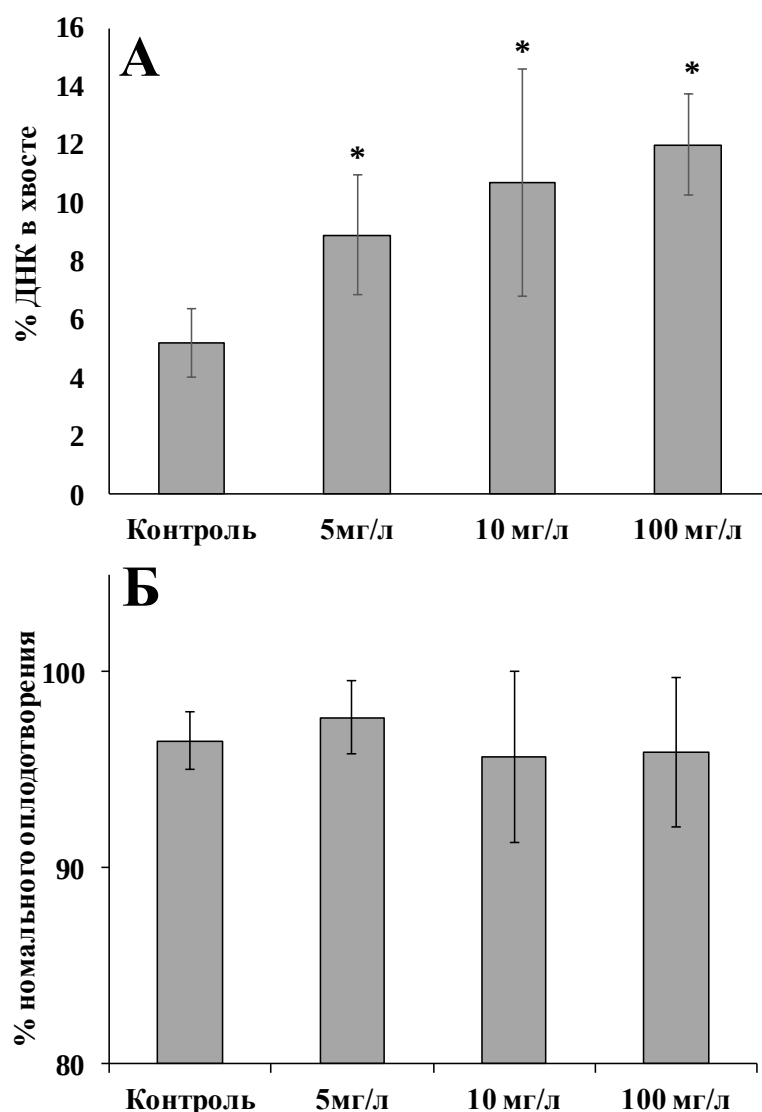


Рисунок 12 – Влияние НЧ диоксида кремния на сперму плоского морского ежа *S. mirabilis*: А – повреждение ДНК (n=15);
 Б – эффективность оплодотворения (n=16) (среднее ±станд. откл)
 * – отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$

Сперматозоиды не обладают развитыми механизмами эндоцитоза – главного пути поступления НЧ в живую клетку. В таком случае можно предположить, что НЧ диоксида кремния вступали во взаимодействие с мембраной сперматозоидов и индуцировали образование АФК, приводя к окислительному стрессу. Kazama, Hino (2012) доказали, что ряд АФК может генерироваться непосредственно на поверхности сперматозоидов.

Независимо от уровня выявленных в ходе экспериментов повреждений ДНК, диоксид кремния не оказывал выраженного воздействия на процесс оплодотворения. Результат теста на спермеотоксичность составлял $96,5 \pm 1,45$, $97,67 \pm 1,87$, $95,67 \pm 4,39$ и $95,92 \pm 3,8$ % оплодотворённых яйцеклеток, для контроля, 5 мг/л, 10 мг/л и 100 мг/л соответственно (рис. 12Б).

На основании полученных данных можно предположить, что концентрации НЧ, использованные в экспериментах, достаточны, чтобы вызвать биохимические сдвиги в спермиях, приведшие к повреждению ДНК, но недостаточны, чтобы повлиять на их

оплодотворяющую способность. Единичные статьи, посвящённые спермиотоксичности НЧ SiO₂, соотносятся с полученными результатами. Так в экспериментах по воздействию НЧ SiO₂ на сперму ежа *P. Lividus*, не наблюдалось значительных изменений в количестве оплодотворённых яйцеклеток (Gambardella et al., 2015), как и при экспозиции спермы *P. lividus* модифицированными аминами НЧ SiO₂ (Tasconi et al., 2022).

Следует отметить, что в этой работе одним из первых был показан генотоксический эффект воздействия НЧ SiO₂ на морские организмы.

ВЫВОДЫ

1. На примере *M. trossulus* и *S. mirabilis* показано, что исследуемые наночастицы оксидов микроэлементов (CuO, ZnO, TiO₂, SiO₂) преодолевают мембранные и тканевые барьеры и способны накапливаться в мягких тканях морских беспозвоночных.

2. В модельных экспериментах с наночастицами оксидов меди и цинка показаны количественные и качественные различия между сублетальными эффектами наночастиц оксидов микроэлементов и растворёнными формами соответствующих микроэлементов, выражающиеся в разных темпах аккумуляции и интенсивности токсического эффекта.

3. На примере мидии тихоокеанской *M. trossulus* установлено, что при воздействии наночастиц оксидов микроэлементов (CuO, TiO₂, SiO₂) основными местом их аккумуляции являются клетки пищеварительной железы.

4. Выявлено, что исследуемые наночастицы оксидов микроэлементов (CuO, TiO₂) вызывают деструктивные изменения в клетках исследуемых морских беспозвоночных, приводящие к окислительному стрессу, о чём свидетельствует рост содержания продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегида).

5. С помощью метода ДНК-комет установлено, что воздействие наночастиц оксидов микроэлементов (CuO, ZnO, TiO₂, SiO₂) вызывает усиление процессов деструкции генома (ДНК) в клетках жабр и пищеварительной железы *M. trossulus* и сперматозоидах *S. mirabilis*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота	CuO – оксид меди
МДА – малоновый диальдегид	ZnO – оксид цинка
НЧ – наночастицы	TiO ₂ – диоксид титана
ПОЛ – перекисное окисление липидов	SiO ₂ – диоксид кремния

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, входящих в базы данных международных индексов научного цитирования Scopus и/или Web of Science:

1. Kukla, S. P. The genotoxicity of copper oxide nanoparticles to marine organisms based on the example of the Pacific mussel *Mytilus trossulus* gould, 1850 (Bivalvia: Mytilidae) / S. P. Kukla, V. V. Slobodskova, V. P. Chelomin // Russian Journal of Marine Biology. – 2017. – Vol. 43, No. 2. – P. 171-175. – DOI 10.1134/S1063074017020067
2. Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in the bivalve mollusk *Mytilus trossulus* / V. P. Chelomin, V. V. Slobodskova, S. Kukla, M. Zakhartsev // Journal of Ocean University of China. – 2017. – Vol. 16, No. 2. – P. 339-345. – DOI 10.1007/s11802-017-3133-y
3. Кукла, С. П. Генотоксичное воздействие наночастиц диоксида титана на двустворчатого моллюска *Mytilus trossulus* (Gould, 1850) в морской среде / С. П. Кукла, В. В. Слободскова, В. П. Челомин // Морской биологический журнал. – 2018. – Т. 3, № 4. – С. 43-50. – DOI 10.21072/mbj.2018.03.4.05
4. Waterborne Exposure of Adult Sand Dollar, *Scaphechinus Mirabilis* (Agassiz, 1864), to Zinc Ions and Zinc Oxide Nanoparticles Affects Early Development of its Offspring / A. A. Mazur, V. V. Slobodskova, S. P. Kukla [et al.] // Water, Air, & Soil Pollution. – 2020. – Vol. 231, No. 3. – Art. No 115. – DOI 10.1007/s11270-020-04484-3
5. Genotoxic Testing of Titanium Dioxide Nanoparticles in Far Eastern Mussels, *Mytilus Trossulus* / Kukla, S., Slobodskova, V., Mazur, A., Chelomin, V., Kamenev, Y. // Pollution. – 2021. – Vol. 7, No 1. – P. 129-140. – DOI: 10.22059/poll.2020.308128.871
6. Exposure of adult sand dollars (*Scaphechinus mirabilis*) (Agassiz, 1864) to copper oxide nanoparticles induces gamete DNA damage / S. P. Kukla, V. V. Slobodskova, A. A. Mazur [et al.] // Environmental Science and Pollution Research. – 2022. – Vol. 29, No. 26. – P. 39451-39460. – DOI 10.1007/s11356-021-18318-0
7. Zinc Oxide Nanoparticles Induce DNA Damage in Sand Dollar *Scaphechinus mirabilis* Sperm / S. P. Kukla, V. P. Chelomin, A. A. Mazur, V. V. Slobodskova // Toxics. – 2022. – Vol. 10, No. 7. – Art. No 348. – DOI 10.3390/toxics10070348
8. SiO₂ Nanoparticles Suspension Exposures with Marine Invertebrates: Genotoxicity Response / Kukla, S. P., Chelomin, V. P.; Mazur, A. A.; Slobodskova, V. V., Mazur M. A. // Water. – 2023. – Vol. 15, No 1. – Art. No 162. – DOI 10.3390/w15010162.