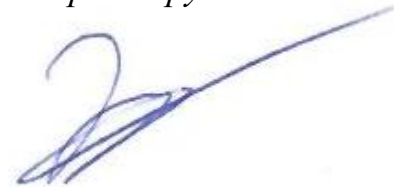


Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Тихоокеанский океанологический институт им. В. И. Ильичева»
Дальневосточного отделения Российской академии наук

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)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, с. н. с. Челомин Виктор Павлович

Ростов-на-Дону – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. Общая характеристика наночастиц	9
1.2. История изучения токсичности наночастиц	16
1.3. Современные представления взаимодействия наночастиц с живыми организмами	24
1. 4. Кометный анализ, как тест на генотоксичность	32
ГЛАВА 2. ОПИСАНИЕ ОБЪЕКТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	36
2.1. Мидия тихоокеанская	36
2.2. Необыкновенный плоский морской ёж	38
ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
3.1. Описание экспериментов.....	40
3.2. Используемые методы	43
3.2.1. Эмбриотест	43
3.2.2. Метод ДНК-комет	43
3.2.3. Определение малонового диальдегида	44
3.2.4. Определение микроэлементов	45
3.2.5. Статистическая обработка	45
ГЛАВА 4. ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА МЕДИ	46
4.1. Сравнение воздействия наночастиц CuO и Cu ²⁺ на <i>M. trossulus</i>	47
4.2. Воздействие наночастиц оксида меди на плоского морского ежа <i>S. mirabilis</i>	52
ГЛАВА 5. ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЦИНКА	60
5.1. Сравнение воздействия наночастиц ZnO и Zn ²⁺ на плоского морского ежа <i>S. mirabilis</i>	60
5.2. Сравнение острого воздействия наночастиц ZnO и Zn ²⁺ на сперму <i>S. mirabilis</i>	67
ГЛАВА 6. ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА НА <i>M. TROSSULUS</i>	73

ГЛАВА 7. ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ	79
7.1. Воздействие наночастиц SiO_2 на <i>M. trossulus</i>	79
7.2. Острое воздействие наночастиц SiO_2 на сперму <i>S. mirabilis</i>	82
ВЫВОДЫ.....	86
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	87
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	88

ВВЕДЕНИЕ

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 , TiO_2 , SiO_2).

Научная новизна. Впервые на основе биомаркеров представлена сравнительная оценка сублетальных эффектов наноразмерных частиц оксидов металлов (CuO , ZnO , TiO_2) и неметаллов (SiO_2) 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. Используемый 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 рисунок. Список литературы включает 190 источников, 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика наночастиц

Термин «наночастица» означает наноразмерную (менее 100 нм) часть макроскопической фазы вещества. Виду своего малого размера НЧ обладают двумя особенностями: эффектами поверхности и квантовыми эффектами. Эти эффекты возникают только с переходом вещества на нано уровень и влияют на химическую активность НЧ, а также на их кинетические, электрические, магнитные и механические свойства (табл. 1) (Ковтун, Веревкина, 2010).

Таблица 1 – Новые свойства наноматериалов

Свойства	Отклик материала на уменьшение размера структурного элемента
Кинетические	Аномально высокие значения коэффициентов диффузии, повышение теплоёмкости, снижение теплопроводности
Электрические	Повышение электросопротивления, возрастание диэлектрической проницаемости
Магнитные	Возрастание коэрцитивной силы, магнитосопротивления, проявление супермагнетизма
Механические	Повышение предела текучести, твёрдости, вязкости разрушения, износостойкости, проявление сверх пластичности при высоких температурах

Поверхностные эффекты – это эффекты, связанные с тем, что доля атомов, находящихся на поверхности НЧ, а значит вступающих в реакцию с окружающей её средой, во много раз превышает этот же показатель у крупноразмерных частиц (до 1000 раз, по сравнению с частицами микро-размера). Атомы находящиеся на поверхности частицы первыми вступают во взаимодействие с внешней средой, в отличие от атомов в глубине частицы, влияние соседних атомов вещества на них меньше. В связи с чем, такие физические характеристики, как температура фазового перехода (например, плавления), НЧ будут отличаться от крупноразмерных частиц того же материала (Roduner, 2006).

Квантовые эффекты – эффекты, связанные с тем, что ввиду малого размера НЧ, начинают проявляться эффекты, встречаемые только на атомарном и молекулярном уровнях. К таким эффектам можно отнести:

квантование света (у квантовых точек), появление магнитного момента у немагнитных частиц (таких как золото) за счёт наличия большого количества неспаренных электронов в отдельной частице и т.д. (Roduner, 2006, Buzea et al., 2007).

Существует два типа НЧ, различаемые по их происхождению – природные и антропогенные (Nowack, Bucheli, 2007). Антропогенные частицы в свою очередь можно разделить на полученные специально и не специально.

Природными источниками НЧ являются:

1. Пылевые бури – это, вероятно, самый главный природный источник НЧ. Атмосферная миграция как минеральной пыли, так и антропогенного загрязнения последнее время является предметом интенсивных исследований. Около 50% аэрозолей тропосферы – это минералы, источником которых являются пустыни. Размер частиц, из которых состоит пылевая буря, варьируется от 100 нм до нескольких микрон, причём частицы размером менее 2,5 микрон могут достигать трети общей массы частиц. Например, НЧ SiO_2 распространены в природе как значительная составляющая пыльных бурь в засушливых районах (Yuan et al., 2022).

2. Лесные пожары. Лесные пожары, так же, как и пылевые бури, существовали до появления человека. Крупные лесные пожары могут охватывать тысячи квадратных километров и переносить тонны твёрдых частиц (в том числе и разнообразные НЧ на основе углерода) на большое расстояние (Oberdorster et al., 2005).

3. Извержения вулканов. Когда вулкан извергается столб пепла и газов (до 30 миллионов тонн за всё время извержения), содержащий твёрдые частицы размером до нескольких микрон, высота его может достигать 18000 метров. В состав вулканических выбросов могут входить частицы тяжёлых металлов, что делает их очень опасными для окружающей среды и для человека.

4. Испарение с водной поверхности. Большое количество аэрозолей солей поступает в атмосферу с поверхности океана и водоёмов суши.

Основными причинами этого является испарение с поверхности и образование аэрозолей в результате гидродинамических процессов. Размер данных аэрозолей так же может варьироваться от 100 нм до нескольких микрон.

5. Живые организмы. В процессе жизнедеятельности некоторые бактерии, например, могут синтезировать НЧ (магнитосомы – у магнетотактических бактерий, или кремневый материал – у мелких диатомовых водорослей). Кроме того, многие бактерии и большинство вирусов ввиду своих размеров так же можно отнести к НЧ (Buzzea et al., 2007).

Антропогенные источники НЧ подразделяются на случайные выбросы и промышленно произведённые.

Бесконтрольное производство НЧ человек начал ещё до того, как появился этот термин. Работы с металлом (выплавка, шлифовка и проч.), сжигание органического топлива, снос зданий и другие взрывные работы, дорожные работы, авиаперелёты и даже готовка (Farre et al., 2009) – некоторые из этих видов человеческой деятельности поставляют наноразмерные частицы в атмосферу уже в течение несколько тысяч лет.

Однако основную тревогу вызывают промышленные НЧ – частицы, целенаправленно производимые человеком, с заданным им составом и размерными характеристиками. В результате появляются частицы, чьи уникальные физико-химические свойства делают их использование в потребительских продуктах коммерчески привлекательным, и благодаря чему темпы их производства последние нескольких десятилетий постоянно растут.

Более 125 лет назад, в 1889 году, уже получали коллоиды серебра цитратным методом (средний размер частиц, полученных этим методом, составляет 7-9 нм). К началу XX века уже выпускались антисептические препараты на основе ультратонких частиц серебра и схожие с ним по составу антисептики. Эти препараты продавались в аптеках и широко применялись не только в качестве антисептиков, но и для лечения некоторых инфекционных заболеваний (Nowack et al., 2011).

Сегодня, благодаря своим новым физико-химическим характеристикам, НЧ получили широкое применение практически во всех областях человеческой деятельности: сельском хозяйстве, аэрокосмической отрасли, катализаторах, лакокрасочной продукции, композитных материалах, косметике, электронике, оптике, энергетике, ремедиации окружающей среды, пищевой продукции, медицине, производстве упаковок, бумаги, текстильной промышленности (Keller et al., 2013). Количество новых НЧ и области их применения постоянно увеличиваются.

Микропроцессоры, мониторы, сенсоры, элементы питания, водные и воздушные фильтры, косметические средства, краски, антикоррозионные и противоядерные покрытия, одежда и смазочные вещества – во всех этих продуктах потребления, благодаря своим уникальным свойствам, могут использоваться НЧ. Есть данные, что на 2014 год в мире насчитывалось более 1800 продуктов, содержащих наноматериалы. При этом более чем треть из них наноматериалы, содержащие оксиды микроэлементов (Vance et al. 2015).

НЧ CuO обладают рядом потенциально полезных в различных областях промышленности свойств: высокотемпературной сверхпроводимостью и эффектами корреляции электронов. Эти свойства делают НЧ CuO полезными как полупроводниковое соединение. Они могут улучшать показатели вязкости жидкости и повышать её теплопроводность, а также обладают фотовольтическими и фотопроводящими свойствами, что делает CuO полезным энергосберегающим материалом. Они применяются в газовых датчиках, батареях, высокотемпературных сверхпроводниках, преобразователях солнечной энергии. Благодаря отличной теплопроводности, НЧ меди могут быть использованы в качестве теплоносителя в различных механизмах. Кроме того, они могут добавляться в смазочные материалы, полимеры, пластмассы и металлические покрытия, в целях снижения трения и уменьшения изнашивания. Высокая активная поверхность частиц CuO делает их эффективными антимикробными агентами (Chang et al., 2012).

Благодаря своей фотоактивности НЧ TiO_2 используют для очистки вод от микроорганизмов, бактерий, грибов, водорослей, вирусов, а также для удаления из воды органических загрязнителей (Amin et al., 2014). Они очень широко используются в производстве солнцезащитных кремов (Mueller, Nowak, 2008), а также лакокрасочной продукции (Kaegi et al., 2008).

НЧ ZnO имеют широкий спектр применения: используются при производстве резины, в качестве добавки в цемент, в качестве основного пигмента красок; используются в качестве катализатора в химической промышленности, а так же широко используются в фармацевтической и косметической промышленности (Scherzad et al. 2017). НЧ оксида цинка применяют в сенсорах, катализаторах и поглотителях ультрафиолетового излучения. Так же благодаря его способности эффективно отражать УФ-излучение нано- ZnO являются важным компонентом в солнцезащитных кремах (Chang et al., 2012, Scherzad et al. 2017).

НЧ TiO_2 , ZnO , CuO активно применяются в текстильной промышленности для придания текстилю солнцезащитных и антимикробиальных свойств. При этом, без дополнительной дорогостоящей обработки, подобные модификации не перманентны и вымываются путём обычной стирки (Dastjerdi, Montazer, 2010, Keller et al., 2013). Кроме того, НЧ серебра, оксида цинка и диоксида титана применяются в производстве упаковок для пищевых продуктов. Чаще всего для придания ей антимикробиальных свойств. Существует ряд исследований, говорящих о возможности миграции НЧ, в том числе диоксида титана, из этих упаковок непосредственно в продукты питания (Bumbudsanpharoke, Ko, 2014).

НЧ SiO_2 являются одними из наиболее массово производимых НЧ на сегодняшний день. Их используют как добавку в бетон, краску, пластик, как вспомогательный материал в резиновой и текстильной промышленности, в качестве противослеживающей добавки в различных лекарственных средствах (Ahamed et al., 2021, Ale et al., 2021). Объёмы производства SiO_2 оценивают более чем миллион тонн в год (Giese et al., 2017), а размер их

глобального рынка, по мнению специалистов, к 2025 году будет превышать 5 миллиардов долларов США (Ahamed et al., 2021).

Надо отметить, что около половины продуктов, содержащих НЧ, представляют собой жидкие суспензии (крема, смазки, масла), либо же нанесены на поверхность твердых материалов (текстиль), то есть находятся в легкодоступной для окружающей среды форме (Vance et al. 2015). По некоторым расчётам, в процессе производства от 0,1 до 2% НЧ попадает в окружающую среду, 20-80% процентов из которых попадают в воздух и сточные воды. В процессе использования косметологических средств около 75% первоначальных НЧ могут попадать в окружающую среду. Кроме того, в процессе использования красок и текстильной продукции в окружающую среду может попадать до 10% НЧ, содержащихся в них (табл. 2) (Keller et al., 2013).

Сочетание высоких темпов производства НЧ, входящих в широкий спектр товаров и их нестабильность, в конечном итоге приводит к росту концентрации НЧ в окружающей среде. При этом конечным местом их дислокации будет морская среда.

По прогнозам, основанным на математических моделях поступление НЧ в окружающую среду, концентрации отдельных НЧ достигают нескольких десятком мкг/л в 2020 году (Sun et al. 2016). А содержание в донных осадках НЧ TiO_2 и ZnO , по данным исследователей, может достигать значений 4000-40000 мкг/кг и 400-6000 мкг/кг соответственно (Sun et al., 2016, Sun et al., 2014, Gottschalk et al., 2013).

Объёмы содержания в окружающей среде отдельных НЧ составляют от десятков тысяч (Piccinno et al., 2012), до сотен тысяч тонн (Robichaud et al., 2009). Благодаря современным аналитическим приборам стало возможно количественно и качественно определять присутствие НЧ в естественных средах (Praetorius et al. 2017, Bundschuh et al. 2018). Есть данные о вымывании НЧ из фасадных красок и попадание их в сточные (Kaegi et al., 2008) и в морские (Adeley et al 2016) воды. Было зафиксировано попадании НЧ в

водоёмы при их использовании в рекреационных целях, в связи с использованием отдыхающими солнцезащитных кремов (Gondikas et al. 2014). Как первичные НЧ, так и их агрегаты были обнаружены в речных водах (Marcus et al. 2018). НЧ присутствуют в воздухе, в воде и в населяющих её организмах крупных промышленных портов (Souza et al. 2019). Учитывая стабильность этих частиц, со временем их концентрация в окружающей среде будет только увеличиваться.

Таблица 2 – Оценки объёмов поступления НЧ из потребительских товаров при их использовании.

	% поступления в окружающую среду, минимальное	% поступления в окружающую среду, максимальное
Аэрокосмическая отрасль	0	1
Катализаторы	1	5
Лакокрасочная продукция	10	90
Композитные материалы	1	10
Электроника	1	5
Оптика	1	5
Медицина	5	25
Косметика	75	95
Бумага	5	25
Пластик	5	25
Текстильная продукция	10	95
Фильтры	10	90

НЧ уже сегодня непосредственно контактируют с человеком и биотой, что делает необходимым проведение обширных токсикологических и экотоксикологических исследований для более точного прогнозирования последствий такого рода загрязнений для будущего человечества и всего органического мира.

Попав в морскую среду, НЧ будут воздействовать на представителей фито- и зоопланктона, а также другие пелагические организмы, интенсивность этого взаимодействия будет во многом зависеть от условий среды (Ates et al., 2014). Параллельно с этим такие физические процессы, как броуновское

движение частиц, движение жидкости и гравитационное взаимодействие приведут к агрегации НЧ (Farre et al., 2009). Так же НЧ агрегируют на поверхности взвешенных в морской среде частицах органического вещества, что ускоряет процесс их осаждения. Тем самым бентосные организмы будут подвергнуты большим концентрациям НЧ, чем пелагические. Апвеллинг, приливно-отливные движения воды и другие процессы в придонном слое воды, вероятно, будут ресуспендировать осаждённые НЧ, подвергая бентосное сообщество повторным воздействиям НЧ (Doyle et al., 2016a). Есть научные работы, говорящие о возможности трофического переноса НЧ от микроводорослей к моллюскам фильтраторам (Wang et al., 2017). Параллельно будут проходить процессы растворения НЧ, зависящие от химического состава частиц и условий водной среды. Общая картина взаимодействия представлена на рисунке 1.

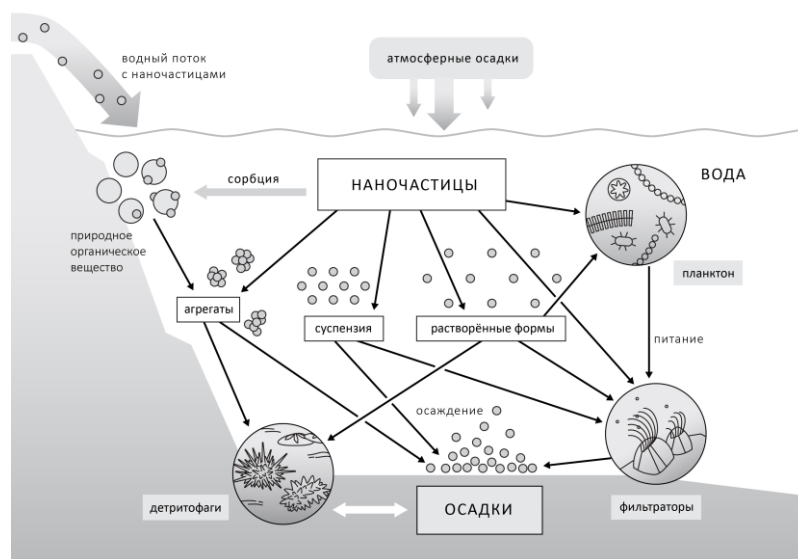


Рисунок 1 – Взаимодействие НЧ с водной средой.

1.2. История изучения токсичности наночастиц

Считается что первым термин «нанометр», как обозначения размерных характеристик мелкоразмерных частиц, применил немецкий физик Нобелевский лауреат Рихард Зигмонди (Santamaria, 2012). Первыми же косвенными упоминаниями о влиянии мелкодисперсных частиц на человеческий организм можно считать обнаружение специфических заболеваний лёгких у шахтёров и обработчиков камня, отмеченных ещё

Гиппократом. В конце XVII века учёный Лохнейс писал, что попадание пыли в лёгкие человека приводит к затруднению дыхания. В конце XIX века Висконти ввёл специальный термин «силикоз» для обозначения заболевания, вызванного ингаляционным воздействием каменной пыли (Greenberg et al., 2007).

В некоторой степени вирусы схожи с НЧ – не только размерами (18-500 нм), но и характером взаимодействия с клеткой. Знания, полученные за более чем 100-летнее исследование вирусов, дали ценную информацию о взаимодействии НЧ с клетками организма. Исследования вируса табачной мозаики велось ещё в конце XIX века, в то время, как только в 30-е годы XX века, с изобретением электронного микроскопа, стало возможно увидеть то, что вирусы обладают нано размерами.

В начале 40-х годов XX века был рассмотрен нейронный перенос полиовирусов из обонятельного нерва шимпанзе. С развитием электронной микроскопии стало поступать вся больше работ о механизмах проникновения вируса в клетку и его взаимодействии с клеточными структурами. И сейчас изучение структуры вирусных каспидов может дать очень ценную информацию для области наномедицины (Oberdorster et al., 2007).

Середина XX века ознаменовалась появлением термина «нанотехнология». Считается, что его ввёл Нобелевский лауреат Ричард Фейнман в своем докладе «Внизу много места: приглашение войти в новую область физики» в 1959 году (Baig et al. 2021).

Тем не менее, осознание того, что размер частиц может быть связан со специфическими биологическими эффектами, не появлялось вплоть до конца XX века. Однако к началу XX века уже существовали работы, показывающие возникновение острого респираторного заболевания (металлической (цинковой) лихорадки) у работников цеха по выплавки цинка. В это время не было известно, что пары металла состоят из сверхтонких частиц, которые могут быстро агломерироваться с образованием более крупных частиц. О высоком воспалительном потенциале при респираторном воздействии других

ультратонких частиц, а именно диоксида кремния, сообщалось в работах первой половины прошлого века. В этих работах размер дисперсных частиц не рассматривался в качестве важного признака, с которым может быть связан их токсический эффект, даже Международная комиссия по радиологической защите в 1966 году рассматривала механизм диффузного осаждения только для частиц размером больше 0,1 мкм. Наличие ультратонких частиц в выбросах двигателей внутреннего сгорания было описано и охарактеризовано в 1975 году, тем самым повысив интерес к этому классу частиц у ученых, изучающих атмосферные аэрозоли. Только в 1994 году модель, предложенная комиссией, стала включать в себя информацию об осаждении ультратонких частиц во всех областях дыхательных путей. Она была основана по большей части на экспериментальных работах по осаждению вдыхаемых ультратонких дисперсных частиц в нижних дыхательных путях человека, проводимых несколькими группами ученых (Oberdorster et al., 2007). Эти исследования совпали с осознанием того, что ультрадисперсные/наноразмерные частицы обладают уникальными токсикологическими свойствами.

Для токсикологии органов дыхания эти исследования имеют большое значение. Они показывают, что осаждение вдыхаемых НЧ происходит, в зависимости от размера, на всём протяжении дыхательных путей: в верхних дыхательных путях оседает большое количество частиц менее 10 нм, так же высоко осаждение частиц размером 5-10 нм в бронхиальной области, а для частиц размером 20 нм – в области альвеол.

Более конкретное расположение частиц в дыхательных путях было представлено в 80х годах, когда обратили внимание на осаждение асбестовых волокон малого аэродинамического диаметра в терминальных бронхиолах. Они сконцентрировали внимание на этой части лёгких. Высокая концентрация мелкодисперсных частиц в этих областях позже была хорошо задокументирована при исследовании накопления чёрной угольной пыли в лёгких работников угледобывающей промышленности (Donaldson, Seaton 2012).

Хотя ещё в середине 40х годов были исследования, сосредоточенные на нейрональных путях распространения полиовирусов (как, в последствии выяснилось, имеющего размер 30 нм) и был обнаружен перенос вируса от носа к мозгу шимпанзе, применение этого исследование к области твёрдых НЧ произошло только около 60-ти лет спустя. Даже вышедшая через 30 лет статья ДеЛоренцо (1970) о передвижении 50 нм частиц золота с серебрянным покрытием от обонятельного нерва к обонятельной луковице у беличьих обезьян, не нашла широкого применения в токсикологии. Катс (1984) и Адамс с Бреем (1983) так же продемонстрировали нейронный перенос, используя частицы латекса и полистирола (50-200 нм). В работе Чернявка (1970) также использовалось нанозолото, чтобы показать нейронную транслокацию от инъекции в подслизистую область обонятельной слизистой оболочки кролика в спинномозговую жидкость, окружающую мозг (Oberdorster et al., 2007).

Однако в 1971 году Берри с коллегами предположили, что 30 нм частицы золота, пересекающие альвеолярно-капиллярный барьер и накапливающиеся в тромбоцитах крыс, могут переносить различные мельчайшие загрязняющие вещества к отдалённым органам. Они пришли к выводу, что данные частицы могут так же привести к агрегации тромбоцитов и образованию микротромбовых атеросклеротических бляшек. В дальнейшем эта гипотеза была экспериментально проверена. Рядом исследователей на экспериментальных животных было показано, что пересечение альвеолярно-капиллярного барьера, в зависимости от размера и химического состава частиц, может происходить в обе стороны, хотя интенсивность подобного переноса, по всей видимости, будет низкой. Недавние попытки исследовать это явление с использованием НЧ радиоактивных изотопов и с последующим обнаружением их специальной камерой, дали противоречивые результаты.

Хотя термин «нанотехнология» и появился в конце 50х годов XX века, реальные целенаправленные манипуляции с веществом столь малого размера оказались доступны человечеству только с начала 80-х годов (Baig et al. 2021). В 80-е годы группой Мэри Эмдур были проведены исследования

ингаляционного воздействия ультратонких частиц оксида цинка на грызунов. Первичный размер частиц, определённый методом электронной микроскопии, составлял 40-50 нм, а агломераты частиц вызывали значительную воспалительную реакцию в лёгких начиная с концентраций порядка мг/м³. Несмотря на то, что это были первые токсикологические исследования, использующие ингаляцию частиц нано-размера, отсутствие сравнения с воздействием более крупных частиц не позволяло сделать вывод о влиянии размера частиц на величины ответной реакции у тестируемого организма. Эти эффекты, вызываемые ингаляцией оксида цинка, могут указывать на то, что маленькие частицы приводят к системному воздействию на организм, потому что они могут попадать через альвеоларно-капиллярные барьеры в другие части организма. Однако учитывая, что частицы оксида цинка находятся в лёгких сравнительно непродолжительный период (6-10 часов) вследствие поглощения их макрофагами альвеол и растворения в их лизосомах, системное воздействие непосредственно частиц маловероятно. Существуют другие способы воздействия, такие как появление ионов вещества (в представленном случае – воздействие ионов цинка), появившихся при растворении частиц, которые переносятся кровью и влияют на удалённые органы. Таким образом, условия непосредственно в месте воздействия ультратонких частиц должны быть тщательно оценены с точки зрения их влияния на биостойкость и способность к дальнейшим метаморфозам отдельных частиц или их растворимых компонентов. К примеру, низкая биостойкость нано-оксида цинка в альвеоларной области легко может быть противопоставлена области верхних дыхательных путей с её нейтральной pH.

Несмотря на то, что первые исследования твёрдых наноразмерных веществ показывали их транслокацию за пределы лёгочных путей, а также их способность вызывать воспалительные реакции в лёгких, ученые не акцентировали внимания на том, что этот эффект был наиболее силён для наиболее мелких частиц. Первое непосредственное сравнение воспалительного эффекта, вызываемого нано и не-нано частицами, на примере

диоксида титана и триоксида алюминия, было в 90-х годах. В нем описывалась значительно бóльшая степень воспалительного процесса у крыс под воздействием НЧ, по сравнению с микрочастицами, при внутритрахеальном закапывании. На основе этих данных авторы сделали вывод о том, что частицы диаметром 20-30 нм гораздо более токсичны, чем частицы диаметром 200-500 нм, и что НЧ могут быть весьма токсичными для тканей лёгких (Oberdorster et al., 1990).

Та же группа учёных в 1992 году, проводя ряд экспериментов с частицами диоксида титана, пришла к выводу, что токсический ответ этих частиц в большей степени коррелирует не с их массой, объёмом или количеством, а с их площадью поверхности. Большая площадь означает пропорционально большее содержание атомов/молекул на поверхности частицы. Таким образом, они пришли к выводу, что токсичность новых наноразмерных металлов и композиционных материалов не может описываться известной токсикологией.

В конце 80-х – начале 90-х наблюдался всплеск исследований направленных, главным образом, на изучение токсичности асбеста и синтетического стекловидного волокна. Ещё в середине 70-х в качестве одного из факторов токсичности, вызывающего нарушение работы клеток фактора, был предложен окислительный стресс. Однако Моссманом и Ландесманом в середине 80-х годов усовершенствовали эту гипотезу для асбеста и возвели её в ранг парадигмы, до сих пор преобладающей в научном сообществе, а также продемонстрировали роль антиоксидантов в смягчении последствий воздействия асбеста, что позже было подтверждено рядом других исследований. В это же время «окислительный стресс» был предложен в качестве общего фактора неблагоприятного воздействия мелкоразмерных частиц, в том числе кристаллического кремнезёма и угольной пыли.

Дальнейшее обобщение гипотезы окислительного стресса произошло в середине 90-х годов, когда группа под руководством Эдинбурга описала образование окислительного стресса при воздействии частиц с

аэродинамическим диаметром менее 10 мкм и предположила, что именно ультратонкая составляющая имеет ключевое значение в этом процессе. Группа Эдинбурга получила данные об интенсификации окислительного стресса при воздействии таких ультратонких/наночастиц как технический углерод, гранулы полистирола, а также различных металлов.

Такие параметры частиц, как размер, площадь поверхности и, особенно, способность вызывать окислительный стресс, были выдвинуты в качестве основных параметров токсикологии НЧ ещё в 90-е годы. И сегодня эти параметры, дополненные новыми (заряд частицы, кристаллизация, биостойкость, наличие покрытий и др.) принимаются как определяющие степень токсичности НЧ.

В конце 90-х группа Колумбийского университета сообщила о важном открытии в изучении иммуномодулирующих эффектов, искусственно произведённых НЧ. Было показано, что C₆₀ фуллерены имеют антигенные свойства, когда они функционализированы сывороточным альбумином или производными лизина, действуя, таким образом, как гаптены, при внутрибрюшном воздействии на крыс. Ими было показано, что иммунный ответ был направлен на фуллерены. Позже Эрланегр, используя атомно-силовой микроскоп, показал, что некоторые антитела так же могут связываться и с углеродными нанотрубками. Эти работы подняли важный вопрос о возможных иммунных реакциях, вызываемых попаданием НЧ в организм.

В начале нового тысячелетия начало резко возрастать количество продуктов, содержащих НЧ. Это привело к увеличению внимания надзорных органов к данной проблеме. И, начиная с середины первой декады XXI века, начинают открываться различные комиссии, регулирующие выпуск подобных товаров (Santamaria, 2012). Параллельно с этим резко возросло число *in vivo* и *in vitro* исследований, направленных на изучение вопросов кинетики, эффектов и основ клеточного и молекулярного воздействия, сконструированных человеком НЧ (дендримеры, квантовые точки,

углеродные нанотрубки и т.д.). Этот скачок был вызван ростом производства НЧ с новыми свойствами, дающими возможность применять их в самых различных областях, начиная от продуктов широкого потребления и заканчивая наномедициной. На фоне этого сформировалось два противоположных взгляда на НЧ: как на источник многочисленных преимуществ для человека, и как на непредсказуемую опасность для человека и окружающей среды.

Действительно, ряд исследований, опубликованных за последние двадцать лет, демонстрируют значительную токсичность различных наноматериалов, будь то углеродные нанотрубки или НЧ металлов, фуллерены, квантовые точки и т.д.

С другой стороны, многие экспериментальные исследования, оценивавшие наноматериалы, предполагают дальнейшее использование для терапевтических или диагностических целей. Некоторые свойства НЧ, к примеру, способность преодолевать различные барьеры в организме, могут сделать их полезными в медицине.

С середины прошлого века немецкие и американские учёные начали изучение НЧ как средства доставки медикаментов. Упор исследований был сосредоточен на заключении лекарственного средства в устойчивую оболочку для точечной доставки активных веществ и увеличения продолжительности их воздействия (Kreuter, 2008, Zhang et al., 2010). В конце 60-х годов были получены первые нанокапсулы из полимера акриламида, позднее в качестве средства доставки получилось использовать липидные нанокапсулы – липосомы. А начиная с 80-х, были разработаны средства доставки активных веществ, основанные на использовании твёрдых липидов и дендримеров, а также тестировались нанокапсулы, которые можно направлять при помощи магнитного поля. В эти же годы велось интенсивное изучение использования нанокапсул для борьбы с раковыми опухолями (Zhang et al., 2010).

Таким образом, на начало XXI в. были сформированы основные концепции взаимодействия НЧ с живой клеткой. Однако большинство этих

исследований проводились в рамках изучения воздействия НЧ на человека. Экоотоксикологические исследования воздействия НЧ, как таковые, начались только в середине первого десятилетия этого века.

1.3. Современные представления взаимодействия наночастиц с живыми организмами

Подобно вирусам, НЧ способны проникать внутрь клетки и взаимодействовать с субклеточными структурами. Клетки макрофаги могут поглощать частицы гораздо большего размера, чем размер НЧ или даже их агрегатов. Путём пиноцитоза клетки могут захватывать частицы диаметром до 300 нм в диаметре. Так же возможен рецепторно-опосредованный механизм, при котором частицы вступают во взаимодействие с активными центрами некоторых рецепторов на поверхности клеток, отвечающих за эндоцитоз. Например, описаны несколько механизмов попадания НЧ в клетки лёгких, связанные с взаимодействием НЧ и рецептора-лиганда на клеточной мембране: эндоцитоз связанный с кластрином, эндоцитоз связанный кавеолами (Geiser et al., 2005).

Так же были найдены уникальные механизмы поглощения гидрофобных частиц диаметром менее 500 нм клеткой, при котором частицы оказываются непосредственно в цитоплазме клеток. В большинстве своём в результате всех перечисленных механизмов НЧ оказывается в лизосомах клетки, где подвергаются воздействию гидролитических ферментов (Garnett, Kallinteri, 2006).

Темпы и объёмы поступления НЧ внутрь клетки, а также их внутриклеточная локализация зависит от особенностей клетки и физико-химических характеристик НЧ. Так же механизмы, при помощи которых НЧ могут проникать через клеточные мембраны, могут быть основаны на пассивном проникновении или же за счёт эффектов адгезии. Последние, из указанных возможных механизмов, не подразумевают образование везикул. Таким образом, НЧ, попавшие в клетку через этот механизм, не будут

локализованы в лизосомах клетки. В связи с этим данный механизм представляет собой наибольшую опасность – происходит непосредственное взаимодействие НЧ с мембранными белками и органеллами. В результате подобного не-фагоцитозного поступления НЧ могут находиться в любой части живой клетки (Buzea et al., 2007).

Проникновение НЧ в область клеточного ядра зафиксировано рядом работ. В частности, было показано зависящее от размера НЧ проникновение оксида цинка в клеточное ядро. Существуют работы показывающие, что НЧ могут проникать даже внутрь митохондрий и нарушать их работу. Считается, что НЧ могут проникать в ядро клетки и вызывать первичную токсичность, однако не ясно является ли эта особенность общей для всех НЧ.

Генотоксические механизмы НЧ можно разделить на первичные и вторичные. Первичные генотоксические эффекты также подразделяют на прямые и непрямые.

Первичная генотоксичность НЧ представляет собой повреждение генетического аппарата без предшествующего этому воспалительного процесса. Основная картина первичной токсичности показана на рисунке 2. Прямая первичная генотоксичность включает все механизмы: непосредственное взаимодействие НЧ с генетическим аппаратом или компонентами, обеспечивающими его целостность. Она может проявляться во время клеточного деления через физическое или механическое воздействие на механизм клеточного деления, например, на сегрегацию хромосом при митозе. НЧ могут взаимодействовать с ДНК, непосредственно на стадии интерфазы клеточного цикла. Вступая во взаимодействие с основаниями, нарушая процесс репликации. Так же НЧ могут вступать во взаимодействие не только с ДНК, но и с белками, вовлечёнными в репликацию, транскрипцию или репарацию ДНК, абсорбирав белок на своей поверхности или, взаимодействуя с его активным центром, НЧ нарушают перечисленные процессы (Magdolenova et al., 2014).

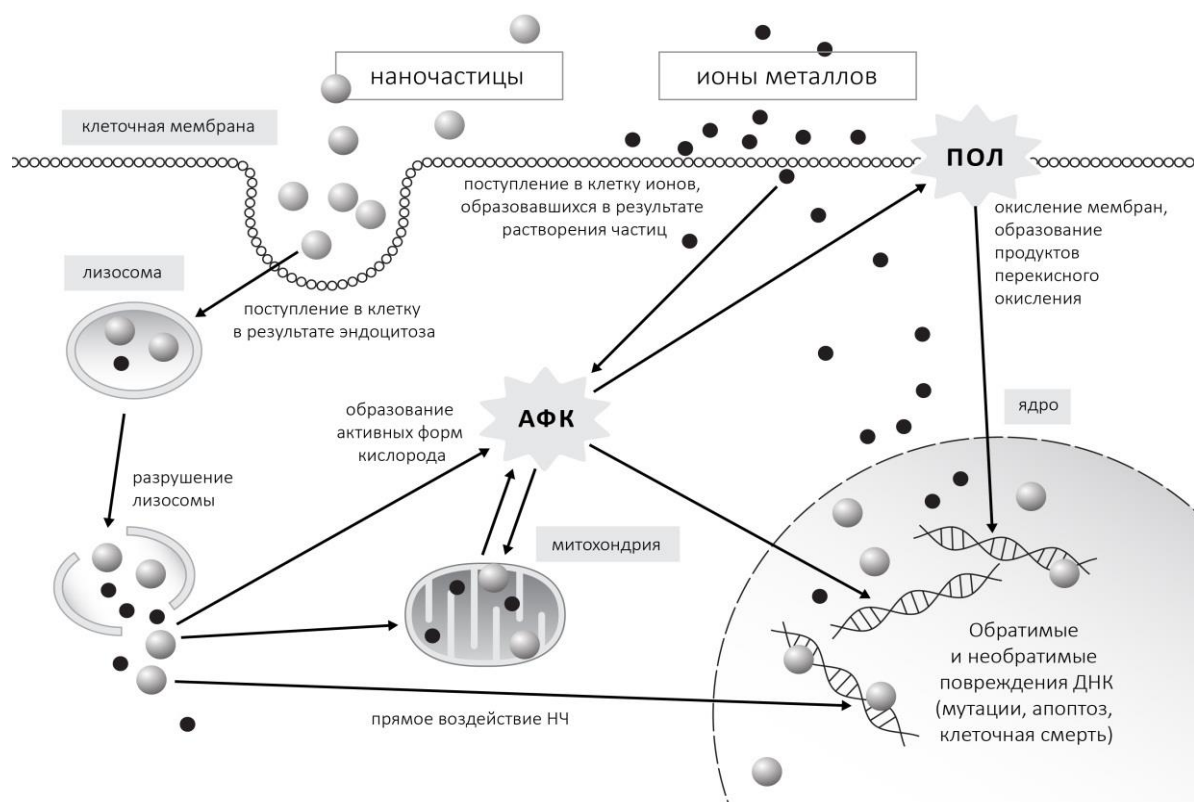


Рисунок 2 – Предполагаемые механизмы первичной генотоксичности наночастиц

За пределами ядра НЧ так же могут влиять на образовавшиеся веретена деления, центриоли или белки, отвечающие за их позиционирование в клетке. Вступая во взаимодействие с этими белками, НЧ могут вызывать серьёзные структурные изменения; нарушают функции, поддерживающие нормальные физиологические процессы внутри клетки (Chang et al., 2012). Существуют свидетельства, что НЧ нарушают процесс митоза, взаимодействуя напрямую с хромосомами, нарушая процесс митоза механическим или химическим путём (Magdolenova et al., 2014).

Данные о повреждении генетического аппарата клеток, без свидетельства проникновения НЧ внутрь ядра, говорят о том, что НЧ не обязательно присутствовать в ядре клетки для того, чтобы быть причиной повреждения ДНК. Это может происходить при образовании частиц более мелких веществ, например, ионов металлов, которые могут диффундировать внутрь ядра и вызывать там повреждения ДНК. Кроме того, НЧ может

продуцировать на своей поверхности активные формы кислорода (АФК), которые будут свободно перемещаться в область ядра.

Непрямые механизмы первичной генотоксичности могут быть последствием неконтролируемого процесса выработки АФК клеточными структурами, такими как митохондрии и мембраны, либо же угнетением работы антиоксидантной системы. Увеличение темпов эндогенного образования свободных радикалов либо угнетение защиты от них, приводит к окислительному стрессу и окислительному повреждению ДНК.

В нормальном состоянии эндогенное образование АФК являются естественным продуктом жизнедеятельности живой клетки. Молекулярный кислород посредством одноэлектронного восстановления, катализируемого НАДФ, переходит в супероксид-анион. Он в свою очередь может превратиться в перекись водорода или гидроксильный радикал. Образование АФК является естественной физиологической реакцией на воздействие внешних стимулов. Свободные радикалы – естественный продукт митохондриального дыхания (Donaldson et al., 2010, Manke et al., 2013).

НЧ переходных металлов, например, CuO, способны индуцировать образование за счёт реакций Фентона и Хабера-Вайса. Так же эти реакции могут быть вызваны металлами, сорбированными на поверхности НЧ и перешедшими вместе с ними через клеточную мембрану, минуя её регуляторные системы. НЧ могут индуцировать образование АФК активируя НАДФ-подобные ферментативные системы. Адсорбция органических веществ и ионов металлов поверхностью НЧ может привести к дополнительному образованию АФК (Nel et al., 2006). Так, например, было показано, что НЧ TiO₂ могут абсорбировать ионы свинца на своей поверхности, увеличивая его биодоступность для веслоногого рачка *Eucyclops* sp (Matouke, Mustapha, 2018). Так же был показан перенос при помощи НЧ циклического углеводорода фенантрена в двустворчатого моллюска *Scapharca subcrenata* (Tian et al., 2014) Кроме того в процесс образования свободных

радикалов может быть вовлечён процесс фотокатализа на поверхности частиц (рисунок 3).

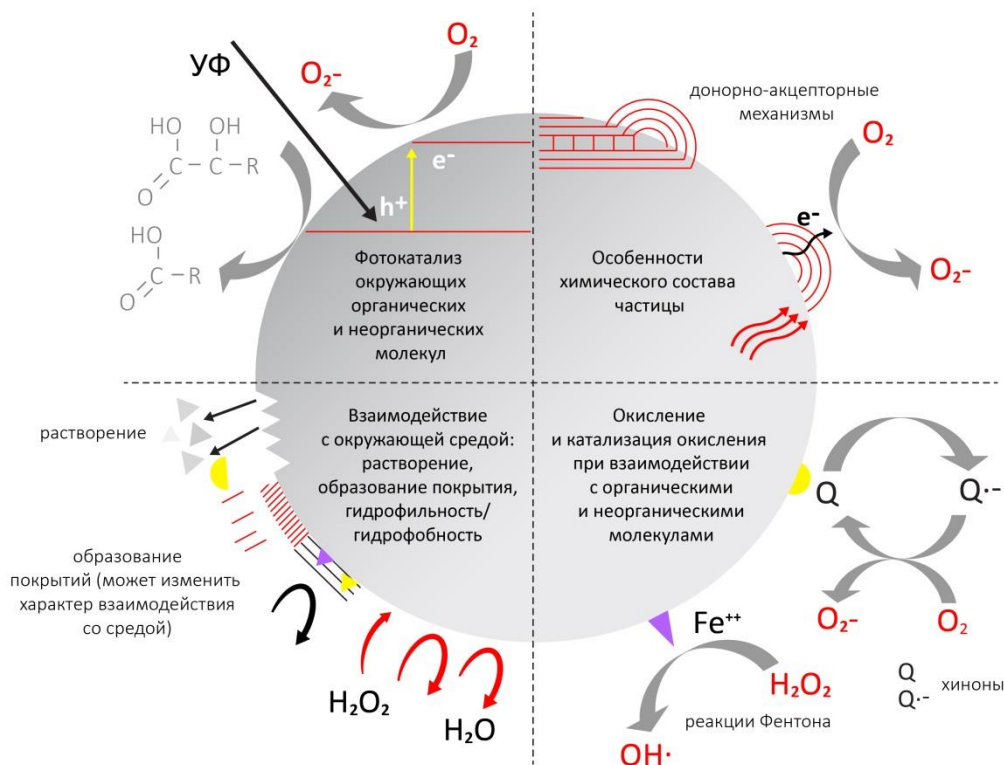


Рисунок 3 – Возможные механизмы взаимодействия НЧ с биологическими объектами (Nel et. al. 2006)

Диоксид титана и оксид цинка – полупроводники, это значит, что он обладает двумя важными особенностями. Во-первых, волновая функция составляющих его атомов взаимодействует друг с другом на очень большом расстоянии, то есть атомные орбитали всего кристалла НЧ объединяются в единую полосу. Во-вторых, эта высокоэнергетическая полоска заполнена электронами, в то время как низкоэнергетическая полоска заполнена лишь небольшим количеством электронов. Энергия фотона возбуждает электрон из валентной зоны заставляя его перейти на следующий уровень, образуя там сильный восстановительный потенциал; в валентной зоне появляется «дырка», образуя там сильный окислительный потенциал (Shah et al., 2017). Образовавшаяся в результате фотовозбуждения пара электрон-«дырка» в дальнейшем может развиваться двумя путями. Первый – один или оба заряда адсорбируются на поверхности частицы. Второй – рекомбинация: электрон

вернётся в «дырку», а переданная фотоном энергия рассеется в виде тепла. В 90% всё заканчивается рекомбинацией, без каких-либо химических эффектов. Распределённый заряд так же может быть рекомбинирован, из-за чего только 1-2% всех фото-генерируемых зарядов приводят к образованию химической реакции с другими молекулами. Проходящие реакции можно разделить на прямые и непрямые. Прямые реакции заключаются в непосредственном взаимодействии органических молекул с поверхностью частицы, в результате чего они либо окисляются, либо восстанавливаются находящимися на поверхности частицы зарядами. К непрямым реакциям относятся реакции с молекулами воды, кислорода или их интермедиатами. Важно заметить, в результате как прямых, так и не прямых реакций образуются радикалы, так как в реакцию всегда вовлечён только один электрон. В результате прямых реакций образуются нестабильные органические радикалы, которые будут подвергнуты в растворе ряду превращений. Более важными, в биохимическом смысле, будут являться радикалы, образованные в результате непрямых реакций, так как они могут атаковать окружающие их органические и неорганические молекулы, образуя целый спектр новых радикальных видов (Haynes et al., 2017).

Именно таким образом воздействие ультрафиолетового излучения на частицы ZnO и TiO₂, находящиеся в водной среде или в внутри живой клетки, приводит к образованию сложного радикального комплекса. Здесь важнейшими, с точки зрения токсического воздействия, являются две реакции. Образовавшаяся «дырка» может окислять воду (и гидроксиды) с образованием гидроксильного радикала, очень сильного и избирательного радикала, быстро реагирующего почти с любой, встречной им молекулой (Saliani et al., 2016). Свободный гидроксильный радикал может диффундировать от частицы, повреждая окружающие молекулы, однако из-за высокой его реакционной способности радиус его действия ограничен. Вторая важная реакция – поглощение свободного электрона кислородом, в результате чего образуется супероксид-радикал кислорода. Этот радикал так же может

вступать в реакции с окружающими его молекулами воды и кислорода. Которые так же могут перемещаться в растворе и повреждать окружающие органические и неорганические молекулы (Haynes et al., 2017).

Избыток АФК может привести к окислительному стрессу. Это переход обусловлен дисбалансом между объёмом образующихся АФК и способности биологических систем деактивировать опасные промежуточные продукты окисления и восстанавливать наносимый ими ущерб. Изменения нормального окислительно-восстановительного баланса в клетке оказывает неблагоприятное воздействие на клеточные компоненты, включая белки, клеточные мембраны и ДНК. Во время окислительного стресса происходят повреждение ДНК, мембранных липидов, активация сигнальных цепей, потеря клеточного роста, а также фиброз, канцерогенез и апоптоз. Апоптоз является одной из главных и самых серьёзных последствий индуцируемого НЧ окислительного стресса. Среди множества апоптических путей ведущую роль при воздействии металлсодержащих НЧ играет митохондриальный сигнальный путь. АФК могут повреждать мембранные фосфолипиды митохондрий, что приводит к деполяризации митохондриальных мембран и нарушению электронно-транспортной цепи. Различные НЧ оксидов металлов, в том числе Zn, TiO_2 и CuO могут вызывать клеточную гибель через дисфункцию митохондрий (Nel et al., 2006, Manke et al., 2013). Ингибирование митохондриальной дыхательной цепи – причина образования АФК в эпителиальных клетках человека, после воздействия частиц кварца. Аналогичный механизм был найден для асбестовых нановолокон (Donaldson et al., 2010).

Образованные в результате воздействия НЧ на клетку АФК могут повреждать все компоненты ДНК, вызывая хромосомные aberrации, разрывы нитей ДНК, окислительные модификации ДНК и мутации.

Так же НЧ взаимодействуют с липидами и белками, составляющими мембраны, в результате чего образуются продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ). Главными промежуточными продуктами ПОЛ является

малоновый диальдегид (МДА) и 4-гидроксинафеналь, так же являющимися прооксидантами и повреждающими ДНК агентами.

Вторичная генотоксичность отличается от первичной, т.к. она связана с работой клеток макрофагов. Эти клетки контактируют с НЧ, приводя к воспалительному ответу организма. Это нормальная реакция организма на попадание в организм патогенов различной природы. Сильный воспалительный процесс может привести к образованию окислительного стресса в окружающих соматических клетках посредством активации их «сигнальных систем». Этот механизм токсичности не требует непосредственного присутствия НЧ в клетке для образования АФК, повреждающего клеточные структуры. В этом случае частица может даже не проявлять первичную генотоксичность, т.е. не участвовать в повреждении генетического аппарата напрямую. Однако эта частица может вызывать воспалительный процесс, который запустит производство АФК и повреждение ДНК (Donaldson et al., 2010).

Воздействие НЧ CuO является отличной моделью для характеристики влияния НЧ на водные бентосные организмы. Обладая низкой растворимостью в природных условиях (Buffet et al. 2011, Adeley et al. 2014, Torres-Duarte et al. 2016), они способны воздействовать на свою цель продолжительное время. НЧ CuO показали токсический эффект на ряде морских организмов, включая членистоногих (Madhav et al. 2017), актиний (Siddiqui et al. 2015), полихет (Buffet et al. 2011), двустворчатых моллюсков (Buffet et al. 2011). Так же токсичность этих НЧ достоверно отличалась как от токсичности растворимых солей меди, так и от макроразмерных частиц CuO (Midander et al. 2009).

Во многих исследованиях была выявлена более высокая токсичность НЧ ZnO по сравнению с идентичными по размеру частицами оксидов других микроэлементов (Minetto et al., 2016). Так, например, при тестировании токсичности НЧ оксидов титана, алюминия, циркония и церия на зелёных водорослях *Pseudokirchneriella subcapitata* не было выявлено их влияние на

эффективность фотосинтеза, в то время как при концентрации в воде 60 мкг л^{-1} НЧ ZnO выявлено достоверное ингибирование роста этих водорослей и снижение активности фотосинтеза (Franklin et al., 2007). Исследования эмбриотоксичности оксидов цинка, алюминия и титана на эмбрионах и мальках рыбы-зебры *Danio rerio* выявили, что токсичен только оксид цинка (Zhu et al., 2008). Кроме того, в отличие от ионных и наноформ меди, неоднократно отмечалась более высокая токсичность НЧ оксида цинка по сравнению с ионами цинка (Farre et al., 2009; Manzo et al., 2013).

При большом количестве статей, посвящённых получению и применению кремнийсодержащих НЧ, только малая доля затрагивает вопросы их токсичности (Ale et al., 2021). Но даже эти немногочисленные данные фрагментарны и противоречивы (Ahamed et al., 2021). При этом подавляющее большинство работ сосредоточено на изучении взаимодействия пресноводных классических модельных организмов с НЧ (Ale et al., 2021).

1. 4. Кометный анализ, как тест на генотоксичность

Среди предполагаемых негативных последствий воздействия НЧ, на живые системы, наибольшую опасность может представлять их способность к повреждению молекулы ДНК. Повреждения ДНК могут вызывать патологические процессы, относящиеся к синдрому генотоксических заболеваний, включающих снижение продуктивности и репродуктивной способности. Потенциальные экологические последствия таких патологий в индивидуумах могут реализоваться через нарушение динамики на популяционном уровне и уровне сообществ.

Существует множество различных методов оценки генотоксичности, то есть степени воздействия того или иного агента окружающей среды на структуру ДНК. Некоторые из них имеют широкое применение, такие как Тест Эймса, разработанный Брюсом Эймсом в 1973 году. Метод основан на том, что в присутствии того или иного генотоксиканта у специально выведенных штаммов бактерии *Salmonella typhimurium*, не способных синтезировать

гистидин, происходит реверсивная мутация, в результате которой штамм приобретают способность к синтезу данной аминокислоты (Lah et. al., 2005).

Метод изучения хромосомных aberrаций основан на том, что накопленные в результате токсического воздействия среды повреждения ДНК приводят к видимым во время клеточного деления хромосомным aberrациям (мутациям в строении хромосом). Изучив количество и характер aberrаций можно судить о степени токсичности исследуемого агента. Это широко используемый метод оценки генотоксичности, но он имеет свои минусы: его можно использовать только на культивируемых клетках либо на клетках зародышевых организмов (так как для получения достоверного результата требуется большое количество одновременно делящихся клеток), а также для получения точного результата необходимо знание кариотипа и характера клеточного деления объекта исследования (Dixon, 2002).

Анализ содержания микроядер был предложен в 70х годах сразу несколькими группами исследователей. Он основывается на том, что в результате накопленных повреждений ДНК во время деления клетки может образовываться микроядро – неполный фрагмент клеточного ДНК. По количеству клеток с данным нарушением можно судить о степени токсичности среды. Этот метод обладает большей чувствительностью, чем метод хромосомных aberrаций, он более прост в обращении, но также имеет ограниченную область применения.

Таким образом, самые распространенные методы исследований токсического воздействия среды на ДНК имеют ряд ограничений и в основном заточены под исследования *in vitro*.

Тем не менее, в 70-х годах Питер Кук открыл метод исследования клеточных структур, основанный на лизисе клетки неионными детергентами в присутствии хлорида натрия в высокой концентрации. Это воздействие приводило к удалению клеточной и ядерных мембран, цитоплазмы и кариоплазмы. Оставался только нуклеоид, состоящий из суперспирализованной ДНК и некоторых белков, поддерживающих её

структуру. Суперспирализованность ДНК подразумевает то, что нахождение ДНК в свободном состоянии невозможно. Однако после окраски нуклеоида этидиум-бромидом было обнаружено, что вокруг него образовалось «гало» из свободных петель и линейных молекул. Подобное явление наблюдалось, к примеру, при воздействии на клетку ионизирующей радиации, вызывающей разрывы и тем самым расслабляющей петли ДНК (Collins, 2002). Позже это открытие послужила образованию «гало»-анализа или неэлектрофоретического анализа, также использующегося в настоящее время.

Первая демонстрация непосредственно «кометного метода» была произведена в 1984 году. Для повышения чувствительности при установлении повреждений ДНК в клетке техника Кука была модернизирована, подвергнув лизированную клетку электрофорузу в нейтральных условиях, в результате чего куски линейных молекул и свободных петель стали перемещаться к аноду, формируя собой «хвост». После ДНК окрашивалась флуоресцентным красителем (этидиум бромид); эта техника позволяла установить двуцепочечные повреждения ДНК. Название «кометного» анализ подучил из-за визуального соответствия получившегося в результате анализа изображения небесному телу (Vandghanooni et. al., 2011). Метод позднее был развит Singh с коллегами в 1988 (Singh et., 1988). Данная модификации метода используются и по сей день.

Ими была разработана щелочная ($\text{pH} > 13$) версия гель электрофореза. Эта версия позволяет установить одноцепочечные повреждения и щелочелабильные участки. Это метод гораздо более чувствителен ввиду того, что большинство генотоксических агентов вызывают в первую очередь именно эти виды повреждений (Tice et. al. 2000).

Кометный анализ включает в себя следующие последовательные этапы:

- создание гель слайдов (заклучение клеток в агарозный гель);
- лизис (разрушение мембран и клеточных структур);
- электрофорез (движение поврежденных участков ДНК под действием электрического поля);

- визуализацию (окрашивание полученной «кометы» флуоресцентным красителем);
- анализ полученной «кометы» (визуальный либо с использованием специального программного обеспечения).

Метод основан на различной подвижности в постоянном электрическом поле поврежденной ДНК и/или фрагментов ДНК индивидуальных лизированных клеток, заключенных в агарозный гель. При этом ДНК мигрирует к аноду, формируя электрофоретический след, параметры которого зависят от степени поврежденности ДНК.

Общая скорость метода на этапах создания гель слайдов и анализа данных зависит от технических навыков исследователя, продолжительности стадий лизиса, щелочного расплетения (в случае щелочного варианта метода) и электрофореза. Чёткого регламента нет (что считается минусом метода по мнению некоторых исследователей), но в среднем длится 60 минут, 20-40 минут и 15-20 минут соответственно.

Кометный анализ может быть применен к любой ткани, *in vivo* при условии, что могут быть получены одиночная клетка и ядро. Таким образом, кометный анализ имеет потенциальное преимущество перед другими методами *in vivo* генотоксических тестов, которые надежно применимы только к быстро размножающимся клеткам или утверждены только к одному конкретному типу ткани (Hartmann et. al., 2003). Преимуществом является и возможность изучить генотоксическое влияние на различные типы клеток, что очень важно ввиду того, что разные типы тканей и клеток по-разному подвержены генотоксическому воздействию и имеют разную интенсивность процессов репарации (Collins et. al., 2009).

Основной особенностью кометного анализа является то, что при некоторых модификациях, таких как изменение состава лизисного буфера для организмов с клеточной стенкой (Dikilitas et. al., 2009), с его помощью возможна оценка генотоксичности фактически любой эукариотной (включая растения и грибы) и даже некоторых прокариотных клеток.

ГЛАВА 2. ОПИСАНИЕ ОБЪЕКТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Мидия тихоокеанская

Тип *Mollusca*

Класс *Bivalvia*

Отряд *Mytilida*

Семейство *Mytilidae*

Род *Mytilus*

Вид *Mytilus trossulus* (Gould, 1850)

Мидия тихоокеанская долгое время считалась тихоокеанской популяцией мидии съедобной *Mytilus edulis*, однако позже она была выделена в отдельный таксон (Скорлато, 1981).

Билатерально симметричный двустворчатый моллюск с двумя створками, соединёнными дорзально и закрывающими мантию и внутренние органы. Раковина имеет овально-треугольную форму. Стенки раковины тонки, отпечаток заднего педально-биссусного ретрактора хорошо выражен. Длина раковины наибольшего экземпляра составляет 9 см (Евсеев, Яковлев 2006), а нормальным промысловым размером считается 35-50 мм. У популяции Японского моря максимальная длина – 60 мм (Скорлато, 1981). Цвет раковины – синий, фиолетовый с белым, задняя часть раковины имеет иссиня-черный цвет. Раковина покрыта блестящими коричнево-черный периостракумом. К субстрату крепится при помощи биссусных нитей, выделяемых биссусной железой, находящейся рядом основанием ноги. Внутренности имеют оранжево-коричневый цвет. Нога сильно редуцирована. Сифон отсутствует (Niebert et. al 2017).

Мидии раздельнополые, во взрослом состоянии гермафродитные особи встречаются очень редко. Соотношение полов обычно 1:1, но в некоторых популяциях может смещаться в сторону увеличения доли самцов. Половые протоки, соединяющие ацинусы, вливаются на каждой стороне тела в пять половых каналов, открывающихся в мантийную полость спереди от задней аддукторной мышцы. Половая зрелость наступает в первый год жизни. Форма

гонад может меняться. В течении зимних месяце происходит постепенный рос гонад, накопление и созревание половых клеток. Это процесс связан с уменьшением резервов питательных веществ, вплоть до исчезновения гранул из соединительной ткани. В весенние месяцы половые железы увеличиваются, и их окраска становится ярче. Особи переходят в преднерестовое состояние, гонады самцов и самок достигают максимального размера. Нерестовый сезон растянут с мая по сентябрь, конкретные сроки пиков нереста различны в разные годы. Плодовитость крупных особей может достигать 25 млн яиц (Касьянов и др. 1980).

Вид распространён в Балтийском, Японском, Охотском, Берингово морях и вдоль тихоокеанского побережья Канады и США (Евсеев, Яковлев 2006). Мидии распространены на глубине от 1 до 10 м, но иногда встречаются и на глубине 40 м. Обитая на литорали, мидия тихоокеанская способна выдержать значительное перепады температуры и солености. Они являются обрастателями; образуют колонии на портовых сооружениях, объектах марикультуры, буях и корпусах судов. В природе *M. trossulus* обитает на скальных выходах, валунах, где могут быть доминирующим видом сообщества беспозвоночных, включающего усоногих раков, нематод, полихет, немертин, плоских червей, мшанок, актиний и асцидий. В организме *M. trossulus* могут присутствовать паразитические простейшие и копеподы. Непосредственно самой мидией тихоокеанской питаются представители брюхоногих моллюсков, крабов, морских звёзд и некоторые морские птицы. Мидия тихоокеанская питается, фильтруя из воды органическое вещество (до 4-5 мкм), а также фито-и зоопланктон. Питание осуществляется за счёт постоянного тока воды, создаваемого работой реснитчатого эпителия. Скорость подобной фильтрации может превышать литр в час (Niebert et. al 2017).

Высокие темпы роста наблюдаются в первые три года жизни. Продолжительность жизни в Японском море – 6 лет, в Охотском море отмечались отдельные особи возрастом до 15 лет (Явнов, Поздняков 2000).

Важный промысловый вид и объект марикультуры (Евсеев, Яковлев 2006). Мягкие ткани составляют до 86% массы тела. Промышленно культивируется в КНДР, Японии, России и других странах. Оптимальная температура для роста и развития мидий – 9-18 °С, соленость – 26-34‰.

2.2. Необыкновенный плоский морской ёж

Тип *Echinodermata*

Класс *Echinoidea*

Отряд *Clypeasteroidea*

Семейство *Scutellidae*

Род *Scaphechinus*

Вид *Scaphechinus mirabilis* (Agassiz, 1864)

Типичный представитель иглокожих. Распространен в Японском море, у Японских, Командорских островов и восточного побережья полуострова Камчатка. Продолжительность жизни может достигать 13 лет (Брыков, 1974). Ежа можно встретить на глубинах до 150 м, но обычно он обитает на глубинах от 1 до 60 м. Необыкновенный морской ёж избегает илистых грунтов и селится преимущественно на поверхности песчаных грунтов, иногда закапываясь на глубину 1-4 см (Ageenko et. al. 2022).

Панцирь ежа пурпурный или фиолетовый, сплюснутый дисковидный или пятиугольной формы., который на брюшной стороне плоский, а на спинной – немного выпуклый. Наиболее интенсивный рост наблюдается в первые годы. Средний размер панциря – 60 мм, отдельные особи могут достигать размеров 100 мм. Толщина может достигать 10 мм (Ageenko et. al. 2022). Край панциря ровный, без вырезок. Весь панцирь густо покрыт мелкими иглами, которые придают ему бархатистый вид. На спинной стороне панциря можно наблюдать своеобразную фигуру в виде цветка с пятью лепестками, образованную рядами амбулакральных каналов. Рот размещён в центре брюшной стороны. Имеется жевательный аппарат.

S. mirabilis – раздельнополый морской ёж. Четыре гонады соединяются друг с другом целомической выстилкой. Многочисленные ацинусы соединяются в четыре протока, выходящие наружу через отдельные поры. Гонады имеют тёмно-вишнёвую окраску. В зимний период гонады имеют незначительные размеры, в яичниках встречаются редкие ооциты, в семенниках зрелых спермиев не встречается. Весной происходит рост числа ооцитов и спермиев, за счёт чего гонады начинают увеличиваться в размерах. В начале лета в яичниках все ещё отсутствуют крупные ооциты и яйцеклетки. Синхронности роста ооцитов нет. В июле появляются яйцеклетки с пронуклеусом и яйцевой оболочкой, на которой видны тёмные пигментные гранулы. В период нереста эти ежи образуют сплошные скопления и не зарываются в песок. Нерест происходит в период с середины июля по начало сентября (Касьянов и др. 1980).

После оплодотворения образуется симметричная личинка – плутеус. Эти личинки переносятся течением, хотя могут передвигаться благодаря ресничек. Через несколько недель перенесённая течением личинка опускается на дно и превращается в маленькую взрослую особь (Ageenko et. al. 2022).

Плоский морской ёж является детритофагом, то есть он питается мертвыми организмами и органическими отходами, которые находятся в придонных слоях воды. Он также может питаться одноклеточными водорослями, мелкими веслоногих рачками и корненожками. Анализ фекальных масс показал, что основную долю рациона составляют диатомовые водоросли, которых ёж может избирательно поглощать вместе с грунтом (Бегун и др. 2014). В некоторых районах *S. mirabilis* может образовывать довольно плотные поселения с биомассой до 20 кг/м (Репина и др., 2012). Среди плоских морских ежей Японского моря России, только он образует многолетние устойчивые поселения (Бегун и др. 2014). Является источником ряда биологически активных веществ (Ковалев и др., 2016).

ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Описание экспериментов

Всего в рамках работы было проведено 7 серий экспериментов по воздействию НЧ оксидов микроэлементов. Среди них 3 – эксперименты по хроническому воздействию НЧ на *M. trossulus*, 2 – эксперименты по хроническому воздействию НЧ на взрослых ежей *S. mirabilis* и 2 – по острому воздействию НЧ на сперму *S. mirabilis*. В исследовании использовались сублетальные концентрации НЧ, широко используемые в токсикологических исследованиях (см. таблицу 3).

Таблица 3 – 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 (1 ч)
TiO ₂	200, 1000 мкг/л (10 дней)	—	—
SiO ₂	5 мг/д (6 дней)	—	5, 10, 100 мг/л (1 ч)

Во всех экспериментах использовались НЧ произведённые фирмой SIGMA-ALDRICH, их заявленные размеры составляли: 50 нм для CuO, 50 нм для ZnO, 21 нм для TiO₂ и 20 нм для SiO₂. Размерные данные производителя были подтверждены трансмиссионной электронной микроскопией (ТЭМ), используя микроскоп Carl Zeiss Libra 200. Более детальная характеристика каждой отдельной частицы, основанная на ранее опубликованных работах приведена в таблице 4 (Tang et al., 2018, Breznán et al., 2017, Hu et al., 2014, Ali et al., 2015).

Таблица 4 – Физические характеристики используемых НЧ

НЧ	Чистота, %	Размер частиц, нм	Гидродинамический радиус, нм	Удельная площадь поверхности, м ² /г	Дзетта потенциал, мВ
CuO	100	50	100	29	-57
ZnO	≥99,5	40-50	200	58	-39,4
TiO ₂	95,5	21-34	190,5	35-65	-13,9
SiO ₂	95,5	20±4,6	576±104	613±47	-11,5±0,7

Взрослые особи *M. trossulus* и *S. mirabilis* были собраны в акваториях залива Петра Великого Японского моря. Отбор осуществлялся водолазами с глубины 3-4 м. Выловленных из естественной среды животных доставляли в лабораторию в течении 1-2 ч. Перед каждой серией опытов экспериментальные животные были акклимированы в проточных аквариумах в течении недели.

Во всех экспериментах непосредственно перед внесением в аквариум стоковый раствор НЧ перемешивали в ультразвуковой ванне (40 Вт) в течение 20 минут. Все условия содержания контрольной группы, соответствовали условиям экспериментальных, но без добавления исследуемого токсиканта. Вода в аквариумах полностью менялась раз в день.

В эксперименте по сравнению воздействия НЧ CuO и ионов меди на *M. trossulus* особи размером от 4,75±0,25 см в течение 7 дней содержались в аэрируемых аквариумах с добавленной в воду ионов и НЧ (SIGMA- ALDRICH, размер частиц менее 50 нм) в концентрации 20 мкг/л.

Через неделю воздействия моллюски из каждой группы были отпрепарированы, из них были извлечены жабры и пищеварительная железа. Часть материала была заморожена для дальнейшего определения содержания меди, а часть была использована в кометном анализе.

В эксперименте по изучению воздействия НЧ TiO₂ на *M. trossulus* особи размером от 4,75±0,25 см в течение 10 дней содержались в аэрируемых

аквариумах с добавленной в воду НЧ TiO_2 (SIGMA-ALDRICH, размер частиц менее 20 нм) в концентрациях 200 и 1000 мкг/л.

На 10 сутки экспозиции моллюски из каждой группы были отпрепарированы, из них были извлечены жабры и пищеварительная железа. Часть материала была заморожена для дальнейшего определения содержания титана и продуктов ПОЛ, часть была использована в кометном анализе.

В эксперименте по изучению воздействия НЧ SiO_2 на *M. trossulus* особи размером от $4,75 \pm 0,25$ см в течение 6 суток содержались в аэрируемых аквариумах с добавленной в воду ионов и НЧ (SIGMA-ALDRICH, размер частиц менее 20 нм) в концентрации 5 мг/л.

На 6 сутки воздействия моллюски из каждой группы были отпрепарированы, из них были извлечены жабры и пищеварительная железа. Часть материала была также заморожена для дальнейшего определения содержания кремния, а часть была использована в кометном анализе.

Эксперименты по изучению хронического воздействия *S. mirabilis* проводились по одному сценарию. Ежи содержались в трёх аквариумах. Смену воды и тестируемых растворов проводили один раз в сутки. В первом аквариуме содержалась контрольная группа ежей. В два других аквариума добавляли 100 мкг/л и 200 мкг/л раствора НЧ ZnO , либо 20 и 40 мкг/л НЧ CuO , соответственно.

По окончании 10 дней экспозиции гонады ежей брались для определения содержания металлов и продуктов ПОЛ. Сперматозоиды использовались для определения степени повреждения ДНК и для эмбриотеста.

Для изучения острой эмбриотоксичности сперматозоиды подвергались воздействию НЧ (20, 50, 100 и 200 мкг/л ZnO или 5, 10 и 100 мг/л SiO_2 , в зависимости от эксперимента) в течении 1 ч. Воду для этого фильтровали через трехфракционный гравийный фильтр и стерилизовали ультрафиолетом.

3.2. Используемые методы

3.2.1. Эмбриотест

Нерест плоского морского ежа стимулировали инъекцией 0,2 мл 0,5 М раствора KCl в перивисцеральную полость. Подготовка суспензии яйцеклеток проводилась по классической методике (Бузников, Подмарев, 1975). Мужские половые продукты собирались непосредственно перед экспериментами и разбавлялись фильтрованной морской водой.

В экспериментах использовались только половые продукты с уровнем оплодотворения выше 95%. Для определения этого, перед сериями экспериментов проводилось предварительная проверка оплодотворения.

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 наличию 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.

3.2.2. Метод ДНК-комет

Для оценки повреждения ДНК использовался щелочной вариант геля электрофореза одиночной клетки (кометного анализа) (Singh et al., 1988), с модификациями для использования его на морских организмах (Mitchelmore et al., 1998).

Исследуемые ткани моллюсков извлекали из них на льду. После чего ткани подготавливали, трижды промыв холодным буфером, не содержащим Ca^{2+} и Mg^{2+} (500 мМ NaCl, 12,5 мМ KCl, 5 мМ ЭДТА- Na_2 и 20 мМ Трис – HCl, pH 7,4). Подготовленную ткань измельчали хирургическими ножницами и снова помещали в тот же буфер. Через 15-20 мин. инкубации выделившиеся одиночные клетки были готовы к использованию в анализе. Так как

сперматозоиды изначально представляют собой суспензии одиночных клеток, для работы с ними вышеописанная пробоподготовка не применялась.

Суспензии одиночных клеток добавляли к 1% агарозы с низкой температурой плавления в 0,04 М фосфатном буфере (pH 7,4) при 37°C, в соотношении 1 к 2 и тщательно перемешивали. Полученную суспензию клеток в легкоплавкой агарозе наносили на предметное стекло, предварительно покрытое 1% раствором стандартной агарозы, и накрывали покровным стеклом. Стекло помещалось в холодильную камеру до затвердевания легкоплавкой агарозы. Покровное стекло снималось, и стекло погружалось в лизисную камеру (состав буфера – 2,5М NaCl; 0,1М ЭДТА-Na₂, 1% Тритон X – 100; 10% ДМСО; 0,02 М Трис, pH 10) на 1 час в холодильник. По завершению процесса лизиса стёкла промывались дистиллированной водой и выкладывались в электрофорезную камеру (состав электрофорезного буфера – 300 мМ NaOH, 1 мМ ЭДТА-Na₂) на 40 мин. Электрофорез проводили при напряжении 2 В/см в течение 15 минут. После нейтрализации (0,4 М Трис-HCl, pH 7,4) слайды окрашивали флуоресцентными красителями (этидиум бромид и SYBR Green).

Окрашенные «кометы» просматривались и фотографировались при помощи флуоресцентного микроскопа (Zeiss, Axio Imager A1), оснащенного цифровой фотокамерой AxioCam MRc. Непосредственный анализ полученных фотографий осуществлялся используя программу CaspLab. Для каждой кометы определяли долю ДНК в хвосте кометы (% ДНК в хвосте кометы). Для анализа использовались ткани/гаметы 5 животных, в 3 параллелях (n = 15), содержащих не менее 100 комет.

3.2.3. Определение малонового диальдегида

Жабры и пищеварительную железу гомогенизировали в 10 мл лизисного буфера содержащего раствор 5 мМ бутилгидрокситолуола в 1% ацетонитриле, в качестве антиоксиданта. После этого по 200 мкл гомогената разливали в несколько и добавляли 650 мкл раствора 10,3 мМ N-метил-2-пирролидона с метанолом и тщательно перемешивали. Для определения содержания

малонового диальдегида в пробирку добавлялось 150 мкл 12 Н – соляной кислоты, а для определения общего содержания конечных продуктов перекисного окисления во вторую пробирку добавляли 150 мкл 15,4 М метансульфоновой кислоты. Полученные растворы выдерживались на водяной бане (45 °С) в течение 60 минут, после чего охлаждались на льду. Исходя из анализа образцов на спектрофотометре (длина волны 586 нм) вычислялось содержание малонового диальдегида и 4 – гидроксиноненала (Buege, Aust, 1978). Подсчет проводили на 5 животных, в 3 параллелях (n = 15).

3.2.4. Определение микроэлементов

Исследуемые ткани *S. mirabilis* и *M. trossulus* обезвоживались при 85°С до постоянного веса, используя термостат. Тщательно измельченную навеску высушенной ткани (100,0-200,0 мг) озоляли в смеси концентрированных кислот (HNO₃:HClO₄, 2:1 об/об).

Минерализации протекала 10 часов при температуре 180°С до обесцвечивания образцов. Остаток перерастворялся в 0,1 н HCl для использования в непосредственном анализе. Количество микроэлементов в исследуемых образцах определяли методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии (ААС) на спектрофотометре «Shimadzu AA-610S». Контроль качества анализа проводился, используя сертифицированные образцы моллюсков. Подсчет проводили на 5 животных, 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 ненормальный 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

Результаты ТЭМ показали, что НЧ CuO образуют крупные агломераты в морской воде. Средний размер агломератов составлял 400 нм (рисунок 4). При этом агломераты состояли из отдельных частиц размером 20-40 нм, что соответствует размерам, заявленным производителем.

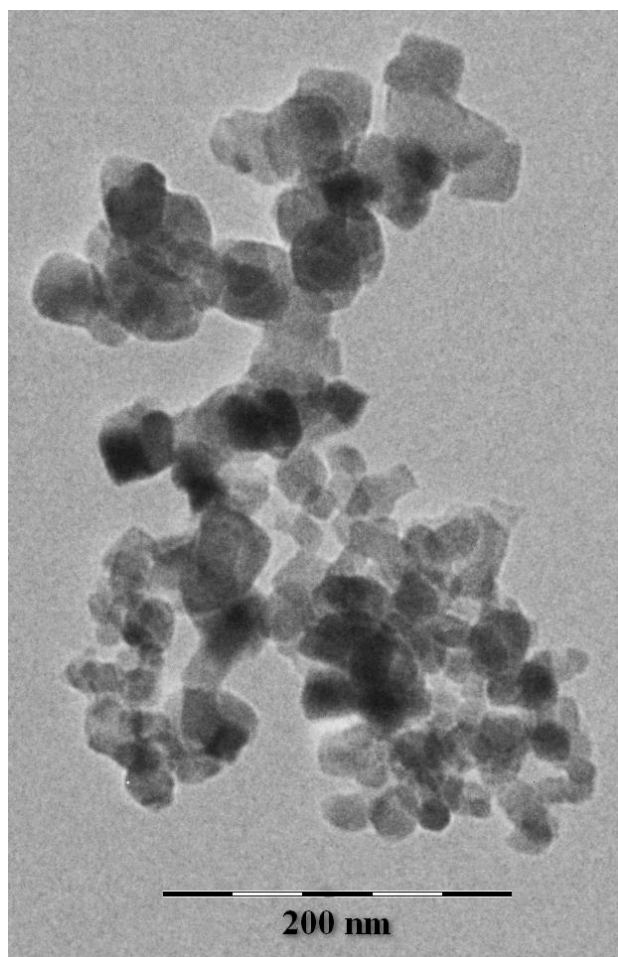


Рисунок 4 – Электронная фотография НЧ CuO.

Агрегация НЧ различной природы в водной, а особенно в морской среде, широко описанный факт. Наличие в природных морских водах растворённого вещества, органических макромолекул, а также неорганических частиц только усиливают эти процессы (Maurer-Jones et al. 2013, Adeley et al. 2014, Bundschuh et al. 2018, Ameh and Saues, 2019). Тем не менее, на электронных фотографиях видно, что агрегаты состоят из отдельных не связанных частиц, размерность которых соответствует заявленной производителем.

4.1. Сравнение воздействия наночастиц CuO и Cu²⁺ на *M. trossulus*

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

По истечению опыта у мидий, подвергшихся воздействию ионов меди, отмечено увеличение содержания меди более чем в 8 раз в сравнении с контролем в пищеварительной железе, и более чем 16 раз в жабрах. При этом после воздействия НЧ медь накапливалась активнее в пищеварительной железе (в 10,5 раз, по сравнению с контролем), чем в жабрах, где концентрации меди увеличилась в 3,5 раза (рисунок 5).

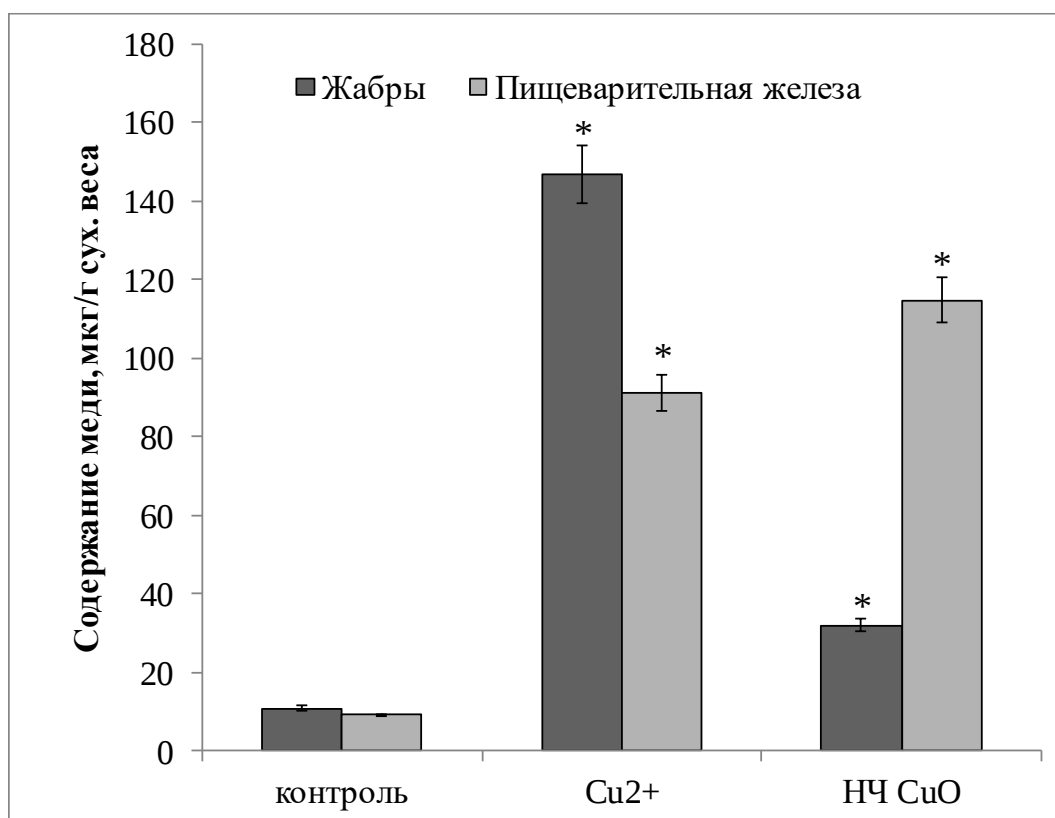


Рисунок 5 – Концентрация меди (мкг/г сырой массы) в органах *M. trossulus*, после воздействия НЧ и ионов меди (среднее ±станд. откл n=15)

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

Полученные данные показали, что мидии могут накапливать взвешенные НЧ CuO из окружающей воды. Кроме того, клетки

пищеварительной железы были более склонны к накоплению CuO НЧ по сравнению с клетками жабр. Интересно отметить, что НЧ CuO больше накапливались в пищеварительной железе, а ионная медь – в жабрах. Вероятно, это было связано с тем, что НЧ CuO присутствуют в морской воде в основном в виде агломератов, которые поглощались пищеварительной системой. Возможные причины этому включают нерастворимость НЧ CuO и работу ионных транспортных каналов, служащих для поддержания гомеостаза меди, в организме. У представителей рода *Mytilidae* интенсивность накопления НЧ CuO через жабры значительно ниже, чем через пищеварительную железу, поскольку НЧ обычно слишком велики, чтобы их можно было транспортировать через трансмембранные каналы для ионов металлов (Shaw and Handy 2011).

При кратковременном воздействии большая часть взвешенных в морской воде НЧ оксидов микроэлементов находится в виде агрегатов, как и в настоящих экспериментальных условиях, причем агрегаты НЧ поглощаются в основном пищеварительной системой, при этом жабры более чувствительны к растворенным ионам (Gomes et al., 2013). НЧ, вероятно, поглощались также как и взвешенные пищевые частицы, являющиеся основным рационом мидии, которые задерживаются жабрах и транспортируются в ротовую полость под действием ресничек, после чего попадают в пищеварительную железу (Beninger et al., 1991).

Ранее было показано, что мидии более эффективно захватывают и поглощают агрегированные НЧ, чем отдельные взвешенные частицы (Ward and Kach, 2009).

McCarthy с коллегами (2013) и Al-Sid-Cheikh с коллегами (2013) наблюдали аналогичное накопление НЧ серебра в пищеварительной железе двусторчатых моллюсков. Сообщалось также о высоком накоплении НЧ цитрата золота в пищеварительной железе мидии съедобной *Mytilus edulis* (Tedesco et al., 2010). Сравнивая воздействие НЧ CuO и ионов меди другими исследователями (Gomes et al., 2012; Garcia-Negrete et al., 2013) так же было

отмечено, что концентрация меди в пищеварительной железе была выше после воздействия НЧ CuO.

Воздействие разных форм меди вызывало разные реакции в отношении отдельных органов. В целом растворённая медь более токсична, чем НЧ CuO. Однако стоит отметить, что, несмотря на уровень аккумуляции НЧ, воздействие НЧ CuO вызвало гораздо более значительные повреждения в геноме жабр, чем в пищеварительной железе (рисунок 6).

Полученные данные о повреждении ДНК, согласуются с более ранними работами на других тест объектах, таких как: клеточные линии человека и млекопитающих (Ahamed et al., 2010; Song et al., 2012; Semisch. et al., 2014), радужную форель *Oncorhynchus mykiss* (Isani et al., 2013), двустворчатого моллюска мидии средиземноморской *Mytilus galloprovincialis* (Gomes et al., 2013) и кишечную палочку *Escherichia coli* (Бондаренко и др., 2012).

При интерпретации этих результатов следует отметить, что ткани пищеварительных желез были более склонны к накоплению НЧ по сравнению с тканями жабр, в то время как жаберные клетки были более чувствительны к токсичности НЧ. Очевидно, что разные ткани имеют разную чувствительность к генотоксикантам, вероятно, из-за различных механизмов защиты и репарации ДНК. Кроме того, различия в генотоксическом действии НЧ на жабы и пищеварительную железу могут быть связаны с клеточными различиями (мембранный состав, количество лизосом и митохондрий) связанными с их происхождением и выполняемыми функциями.

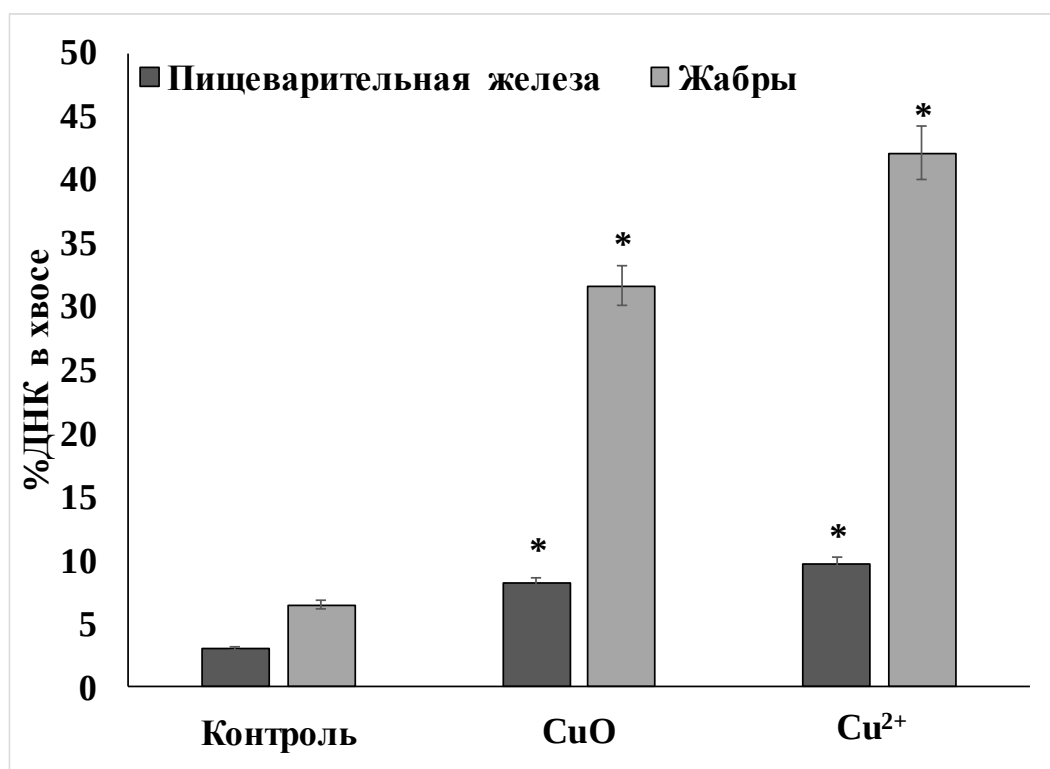


Рисунок 6 – Степень повреждения ДНК жабр и пищеварительной железы *M. trossulus* после воздействия НЧ CuO и ионов меди (среднее $\pm$ станд. откл n=15)

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

Полученные данные свидетельствуют о том, что ДНК жабр мидии *M. trossulus*, а также система её репарации могут представлять собой важную мишень для воздействия обеих форм меди *in vivo*.

Исходя из полученных результатов и исследований, проведенных другими научными группами, можно сформулировать гипотезу о механизмах, участвующих в повреждении ДНК наночастицами.

Механизмы, которые, вероятно, ответственны за генотоксичность, вызванную НЧ, делятся на две основные категории: прямые и косвенные. Прямые механизмы – это те, которые задаются самими НЧ на уровне отдельной клетки и могут быть либо результатом взаимодействия НЧ с ДНК, либо с системой репарации ДНК, т. е. представляют собой непосредственный контакт НЧ с генетическим материалом, приводящий к его физическому или химическому повреждению.

Увеличение количества повреждений ДНК может происходить либо за счет увеличения количества событий, повреждающих ДНК, либо за счет уменьшения репарации ДНК. Индукция разрывов цепей ДНК была показана в нескольких клеточных линиях, подвергшихся воздействию металлов, таких как медь (Hayashi et al., 2000). Так же показано, что НЧ CuO могут напрямую связываться с ДНК или ферментами репарации ДНК, что приводит к образованию разрывов цепей ДНК (Garnett and Kallinteri, 2006). Возможность взаимодействия НЧ с ядерным аппаратом была показана в экспериментах по взаимодействию НЧ CuO с культурой человеческих клеток A549 (Semisch et al. 2014). В результате воздействия, было обнаружено накопление меди в цитоплазматической и ядерной фракциях клеток, при этом самые высокие концентрации были обнаружены в ядре. А изменение экспрессии белков репарационной системы в культуре клеток лёгких человека, говорит о том, что НЧ влияют на работу репарационной системы клетки (Ahamed et al., 2010). Кроме того, известно, что металлы приводят к образованиям сшивок ДНК с белком (Merk, Speit, 1999).

Косвенные механизмы включают в себя образование токсичных промежуточных продуктов взаимодействия НЧ с структурами клетки. Например, часто воздействие НЧ приводит к избыточному образованию АФК, которые ответственны за повреждение биомолекул, включая липиды, белки и ДНК. Атака АФК на ДНК порождает огромное количество продуктов модификации оснований и сахаров. Ряд изменений в ДНК (например, расщепление ДНК, перекрестные связи ДНК-белок, окисление пуриновых и пиримидиновых оснований, дезоксирибозный основания т. д.) обусловлен реакциями с АФК (Marnett, 2000). Вызванный АФК окислительный стресс часто считается основным механизмом, участвующим в генотоксичности НЧ (Singh et al., 2009; Song et al., 2012; Baker et al., 2014). Были предложены различные способы генерации АФК наночастицами. НЧ могут приводить к спонтанной генерации АФК на своей поверхности благодаря своим химическим и поверхностным характеристикам. Было показано, что НЧ CuO

вызывают окислительный стресс (Buffet et al., 2011) и генотоксический ответ у различных животных (Gomes et al., 2012; Mwaanga et al., 2014) и клеточных линий человека (Ahamed et al., 2010).

По данным Бондаренко и соавторами (2012), НЧ подвергаются эндоцитозу, после чего их диссоциация не может контролироваться механизмами, используемыми для регуляции концентрации ионов меди в клетке. Растворение НЧ CuO является ключевым фактором, запускающим реакцию АФК и повреждения ДНК у *E. coli*. В присутствии доступных клеточных восстановителей (например, аскорбиновой кислоты, глутатиона) медь может играть каталитическую роль в инициировании свободнорадикальных реакций в аэробных условиях.

Для *M. trossulus* не было зарегистрировано смертности даже тогда, когда биомаркеры окислительного стресса выявляли определенный уровень окислительного повреждения ДНК, что можно интерпретировать как ранний сигнал предупреждения о повреждении на более высоких уровнях биологической организации. Длительное воздействие НЧ CuO сопровождалось усилением повреждения ДНК, что может привести к инициации мутаций и злокачественной трансформации клеток.

Результаты исследования подчеркнули важный риск генотоксических эффектов НЧ CuO и показали, что анализы генотоксичности являются чувствительным подходом к оценке риска токсичности НЧ CuO. Это исследование показало экологические последствия выброса НЧ в морские экосистемы.

4.2. Воздействие наночастиц оксида меди на плоского морского ежа *S. mirabilis*

Атомно абсорбционный анализ гонад *S. mirabilis* показал, что после 10 дней воздействия CuO-НЧ содержание меди в этой ткани возросло до 3 раза, рисунок 7А. Результаты ААС подтверждают биодоступность НЧ CuO для плоского морского ежа. Частицы могли попасть в тело ежа через

пищеварительную или амбулокральную системы, после чего попасть в целом, где быть захваченными целомоцитами, а далее разнестись по другим системам организма. В экспериментах по воздействию модифицированных НЧ серебра на молодь зелёного морского ежа *Strongylocentrotus droebachiensis*, агломераты НЧ были обнаружены в участках амбулакральной системы, при этом мандрепоровая пластина уже была сформирована (Magesky et al. 2016). Это подтверждает, что амбулакральная система так же может являться потенциальным путём поступления НЧ. Falugi с коллегами (2012) показал, что при кормлении, агломераты НЧ оксидов металлов размером до нескольких мкм могут попадать в целомоциты морского ежа. НЧ CuO были замечены в большом количестве клеток млекопитающих в экспериментах по воздействию НЧ *in vitro* (Ameh and Saues, 2019). При длительном воздействии НЧ CuO на пресноводного брюхоногого *Bellamya aeruginosa* в гонадах так же было замечено существенное увеличение концентрации меди по сравнению с контролем (Ma et al. 2017).

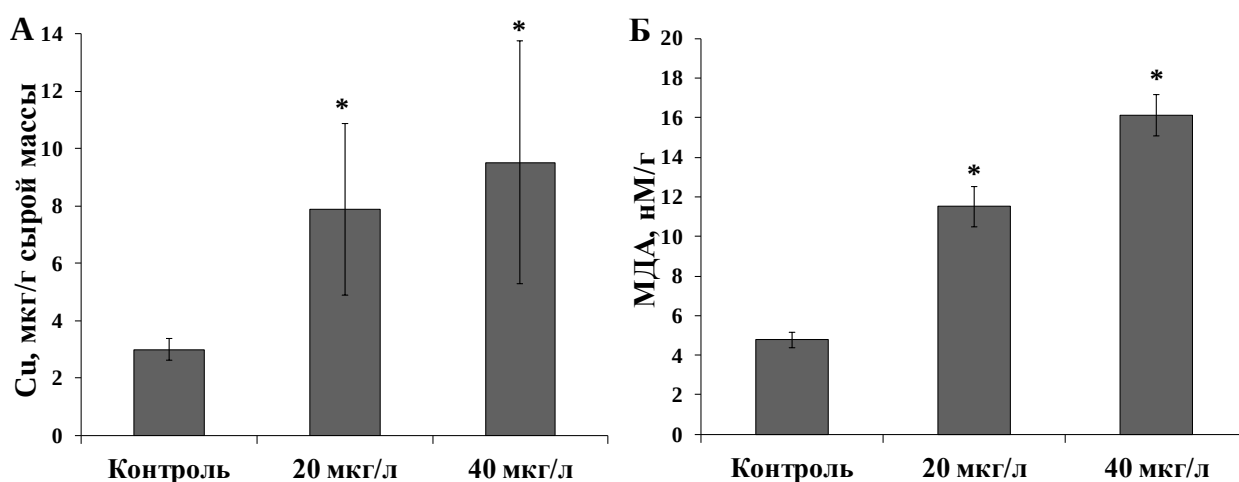


Рисунок 7 – Влияние НЧ оксида меди на гонады ежа *S. Mirabilis*:

А – содержания меди; Б – концентрация МДА (среднее $\pm$ станд. откл $n=15$)

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

Аккумуляцию металлов, при воздействии НЧ, часто связывают с диссоциацией НЧ в природной среде. Однако предыдущие работы,

использующие те же самые НЧ, показали, что за 96 ч в морской воде растворяется менее 1 % всех частиц (Torres-Duarte et al. 2015). Учитывая, что время между добавлениями новых порций НЧ было всего 24ч, можно сделать вывод, что в нашем эксперименте медь попадала в организм ежа в виде НЧ. Так же следует отметить, что достоверного различия в содержании меди между концентрациями 20 мкг/л и 40 мкг/л не было. Что подтверждает факт усваивания организмом именно НЧ, а не ионов меди, у которых зависимость аккумуляции в тканях от концентрации в среде имеет более линейный характер.

Одним из первых показателей стрессового состояния живой клетки, является образование в ней АФК. Вызванный АФК окислительный стресс считается одним из основных токсических эффектов, оказываемых НЧ на клетку (Hou et al. 2017). НЧ CuO могут генерировать АФК, в результате взаимодействия с органическими макромолекулами, Фентоно-подобных реакций, фото-окисления и спонтанной генерации АФК на своей активной поверхности (Amei and Saues, 2019), при этом большинство этих реакций может происходить как внутри, так и на поверхности живой клетки. Одним из результатов образования АФК является перекисное окисление мембранных липидов, показателем которого можно считать изменение уровня МДА в ткани. Измерение содержания МДА в гонадах плоского морского ежа показало, что в организмах, подвергавшихся воздействию НЧ CuO в концентрации 20 мкг/л, он вырос более чем в два раза, при концентрации в воде 40 мкг/л – более чем в три раза (см. рис. 7Б).

Изменение уровня МДА, как одного из главных продуктов перекисного окисления, подтверждает, что организм плоского морского ежа (а именно – гонады), находится в состоянии окислительного стресса. Это может быть как следствием активной выработки АФК, так и следствием угнетения работы компонентов антиоксидантной системы. *In vitro* исследования Giannetto с соавторами (2018) показали рост экспрессии генов каталазы и супероксиддисмутазы, в эмбрионах чёрного морского ежа *Arbacia lixula* после

воздействия на него НЧ CuO, что так же показывает их способности вызывать окислительный стресс. По данным спектрофлуориметрического анализа, воздействие CuO-НЧ на сперму скального морского ежа *Paracentrotus lividus* в концентрациях 5 мг/л приводило к росту АФК и продуктов ПОЛ в ней (Gallo et al. 2018).

Сперматозоиды выполняют уникальную и важнейшую биологическую функцию формирования генома для развития следующего поколения. Поэтому изменения целостности генома гамет под воздействием поллютантов представляет собой необходимое для оценки их токсичности знание.

Процент ДНК в хвосте, являющийся общепринятым показателем генотоксичности при использовании метода ДНК комет, вырос после воздействия НЧ CuO почти в 4 раза, по сравнению с соответствующим показателем у контрольных организмов, рисунок 8.

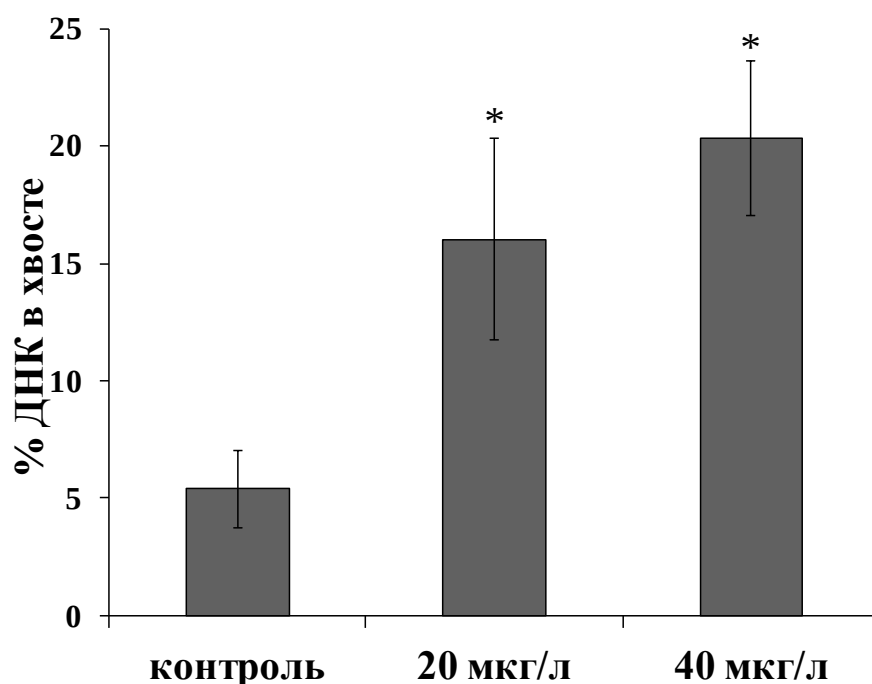


Рисунок 8 – Повреждение ДНК в сперматозоидах *S. mirabilis* после воздействия НЧ оксида меди (среднее ±станд. откл n=15)

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

Повышения показателя «% ДНК в хвосте кометы» говорит о том, что воздействие НЧ CuO на плоского морского ежа привело к повреждению ДНК

в его сперматозоидах. Так как повреждение ДНК оценивалось при помощи кометного анализа, можно с уверенностью говорить о наличии одно и двунитьевых разрывов, а также щелочно-лабильных участков в ДНК сперматозоидов, принадлежащих ежам, подвергавшихся воздействию НЧ.

Предыдущие исследования показали, что генотоксический эффект НЧ оксидов металлов хоть и, видимо, связан с растворением частиц и высвобождением ионов, имеет свои отличия при сравнении с прямым воздействием этих ионов. При прямом воздействии НЧ оксида цинка и ионов цинка на сперму *P. lividus*, результаты кометного анализа показали различную зависимость генотоксичности от их концентрации (Oliviero et al. 2019). Нельзя исключать возможность непосредственного взаимодействия НЧ с генетическим аппаратом в ядре зигот. Тем не менее наличие явно выраженного окислительного стресса, говорит о том, наиболее вероятной причиной повреждения ДНК, является воздействие на него АФК. Однако это не исключает сценарий, при котором НЧ попадают в клетку, так как активное образование АФК могло происходить непосредственно при взаимодействии НЧ с внутренней средой клетки, за счёт огромной площади НЧ, либо повреждая нормальную работу клеточных органелл. Так Falugi с коллегами (2012), показали, что оральное воздействие НЧ оксидов металлов приводит к модификациям эндоплазматической сети и аппарата Гольджи у клеток целомацитов морских ежей. Кроме этого изменения в работе аппарата Гольджи у личинок наблюдались у *P. lividus* при воздействии НЧ Ag, Co и TiO₂ на его сперму (Gambardella et al. 2015a). *In vitro* воздействие НЧ CuO на эмбрионы ежа *A. lixula* привело к биохимическим изменениям – уменьшению уровня холина и Н-серотонина, а так же увеличению уровня глицина (Carrello et al. 2017).

У личинок, выросших из зигот, оплодотворённых спермой, подвергавшейся воздействию НЧ Co, Ag и TiO₂ была изменена активность ацетилхолинэстеразы и пропионилхолинэстеразы (Gambardella et al. 2013). Воздействие НЧ CuO на зиготы *Lytechinus pictus* приводило к изменению

активности АВС транспортёров, что свидетельствует о том, что воздействие этих НЧ в целом снижает эффективность защитных механизмов клетки (Wu et al. 2015). Так же возможно, что НЧ контактировала с мембранной клеток, образовывая внутренне производство АФК, не входя внутрь клетки (Manzo et al. 2017).

Стандартный эмбриотест не показал достоверно значимых отличий в показателях оплодотворения между контролем и экспериментальными группами. Отклонений развития на стадиях бластулы, гастролы и раннего плутеуса так же не наблюдалось (см. рис. 9А).

Средний размер личинки так же не отличался от группы к группе (см. рис 9Б). При воздействии высоких концентраций более токсичных НЧ ZnO Manzo с коллегами (2017) так же не обнаружили влияния на процесс оплодотворения. После воздействия НЧ Co, Ag, TiO₂ и SiO₂ так же не было обнаружено изменений эффективности оплодотворения (Gambardella et al. 2013, Gambardella et al. 2015a). В экспериментах по изучению спермиотоксичности НЧ ZnO разного размера, только одна используемая концентрация показала достоверное отличие качества оплодотворения от контроля (Oliviero et al. 2019). Это говорит о том, что какое бы влияние НЧ не оказывают на половые клетки, оно не затрагивает его подвижность, не блокирует его акросомную реакцию и не нарушает работу сигнальных систем сперматозоида и яйцеклетки (Gambardella et al. 2015b). Тем не менее Gallo с коллегами (2018) показали, что воздействие на сперму высоких концентраций НЧ CuO приводит к целому ряду морфологических изменений структуры отдельных сперматозоидов.

В экспериментах по воздействию оксидов Ce и Ti на ранее развитие морского ежа *L. pictus in vitro*, так же отсутствовали отклонения от контрольной группы на всех стадиях развития (Fairbairn et al. 2011). Однако в большинстве работ, посвящённых эмбриотоксичности НЧ оксидов металлов исследователи отмечали рост отклонений на более поздних стадиях развития личинки. Так Gambardella с коллегами (2015a) показали, что воздействие НЧ

Ag, Co и TiO_2 на сперму ежа *P. lividus*, приводило к серьёзным отклонениям в скелетной структуре плутеусов (48ч). Manzo с коллегами (2013) описал резкий рост аномально развитых личинок, как при воздействии НЧ ZnO на сперму, так и на оплодотворённое яйцо, при этом существенного влияния на качества оплодотворения они не оказали. Не спермиотоксичное воздействие НЧ SiO_2 так же приводило к аномальному развитию гаструл и плутеусов у *P. lividus* (Gambardella et al. 2015в). Воздействие на эмбрионы *P. lividus* НЧ никеля привело к уменьшению длины плутеуса (48ч) до 13% (Kanold et al. 2016).

Отличие представленных в диссертации результатов от вышеперечисленных может быть:

- следствием того что в значительной части этих работ изучалось непосредственное *in vitro* воздействие НЧ на половые продукты или эмбрионы морских ежей;
- другой химической природой НЧ, так как сравнивая эмбриотоксичность НЧ ZnO, CeO_2 и TiO_2 на *L. pictus* в одинаковых концентрациях, были получены разные результаты (Fairbairn et al. 2011);
- видоспицифичностью чувствительности морских ежей к воздействию НЧ (Buric et al. 2015).

Сравнивая результаты эмбриотеста с данными кометного анализа и анализа уровня МДА, надо понимать, что ответ организма на субклеточном и биохимическом уровне наступает значительно раньше по времени и при меньших концентрациях загрязняющих веществ. В других работах отсутствие влияния на оплодотворение морских ежей, так же сопровождалось повреждением ДНК (Manzo et al. 2017).

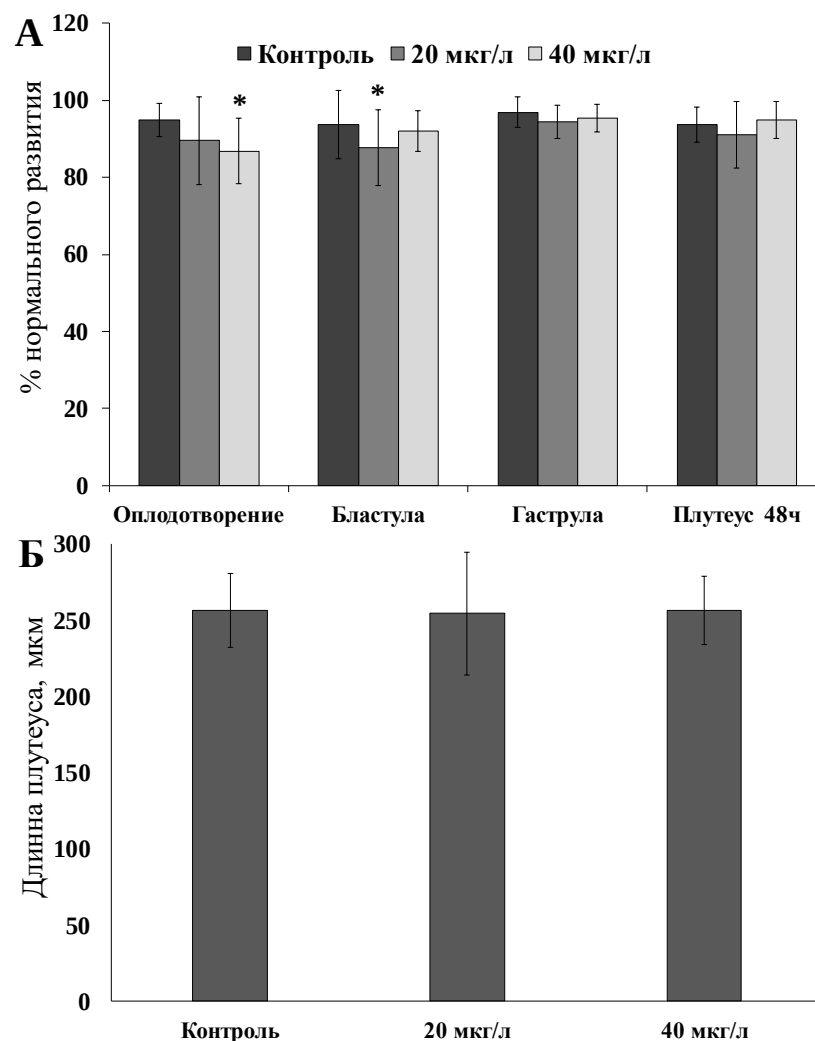


Рисунок 9 – Влияние НЧ оксида меди на раннее развитие плоского морского ежа *S. mirabilis* : А – доля нормально развитых особей на разных стадиях развития; Б – длина 48ч плутеуса (среднее $\pm$ станд. откл, n=16)

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

Повреждения ДНК, могут иметь более длительные последствия и привести к нарушениям у взрослых особей, либо в будущих генерациях морских ежей. Изменение чувствительности к воздействию НЧ через нескольких поколений у дафний, в то время как первое поколение показало высокую к нему резистентность – может быть примером таких длительных по времени последствий (Bundschuh et al. 2012).

ГЛАВА 5. ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЦИНКА

Проведённая ТЭМ показывает, что НЧ ZnO так же агрегирует в морской воде. Средний размер агрегатов составлял примерно 300 нм, показано на рисунке 10. При этом агрегаты состояли из отдельных частиц размером 50 нм, что соответствует размерам, заявленным производителем НЧ.

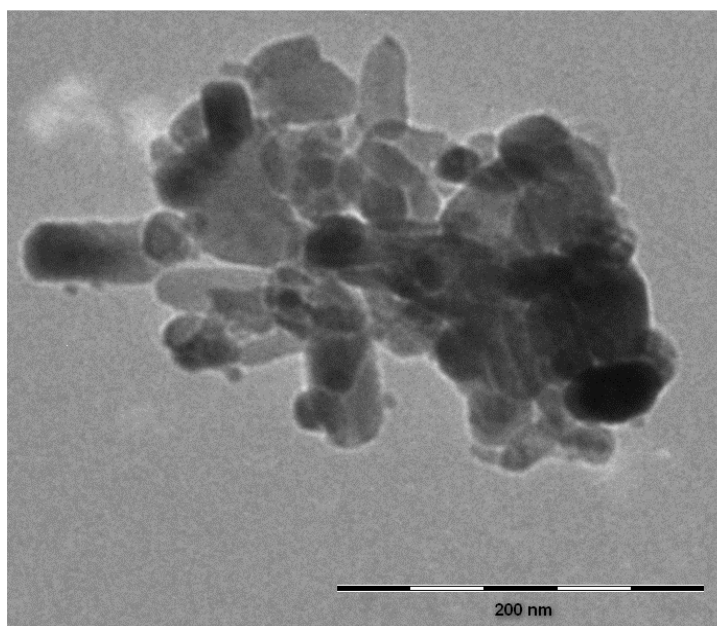


Рисунок 10 – Электронная фотография НЧ ZnO

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

При анализе данных, полученных в ходе эксперимента, обнаружено, что в мягких тканях ежей концентрация цинка за 10 суток пребывания в воде с добавлением 100 мкг/л как ионов цинка, так и НЧ ZnO достоверно увеличилась примерно в полтора раза по сравнению с исходной. При увеличении концентрации ионов и НЧ ZnO в воде до 200 мкг/л наблюдалась тенденция повышения содержания цинка в мягких тканях плоского морского ежа *S. mirabilis* (рисунок 11).

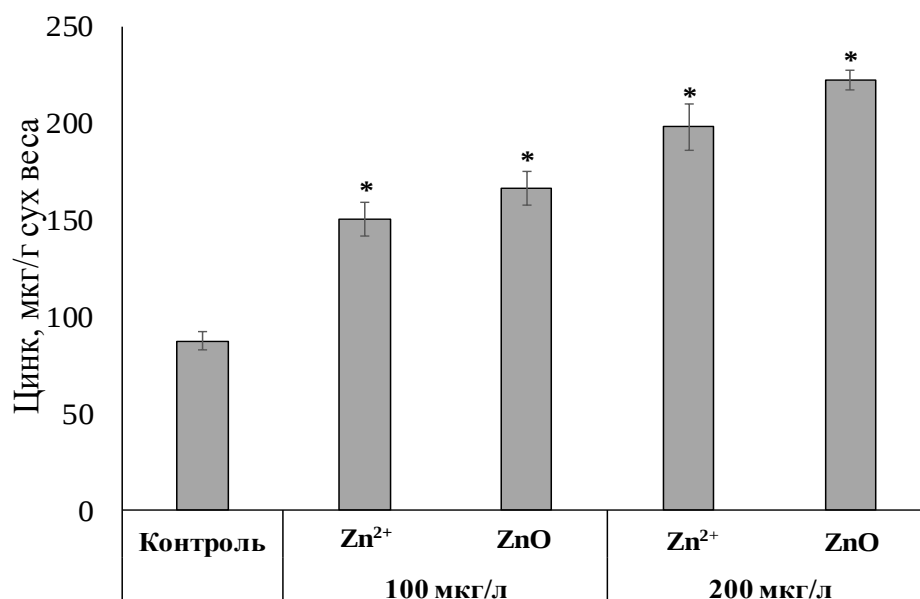


Рисунок 11 – Концентрация цинка в гонадах *S. mirabilis*, после воздействия НЧ и ионов цинка (среднее $\pm$ станд. откл $n=15$)

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

Исходя из полученных данных, можно говорить о том, что плоские морские ежи способны накапливать в мягких тканях цинк, внесенный в среду как в ионной форме, так и в форме НЧ.

Обнаруженная способность НЧ ZnO проникать внутрь организмов и накапливаться в мягких тканях плоских морских ежей подтверждается данными других исследователей. Предполагается, что НЧ ZnO, диаметр которых составляет около 10 нм, способны проникать через клеточные мембраны и приближаться к ядру, затем путем диффузии через ядерную мембрану или транспортировке через ядерные поры проникать в ядро и воздействовать на ДНК. Более крупные НЧ (порядка 60 нм) могут воздействовать на делящиеся клетки во время митоза, когда ядерная оболочка растворяется (Brun et al., 2014).

Ранее уже отмечалось достоверное накопление НЧ ZnO другими гидробионтами. Например, имеются данные о том, что при содержании амфипод *Leptocheirus plumulosus* в воде с добавлением 200 мкг/л НЧ ZnO за 48 часов, концентрация цинка в тканях увеличилась в 6 раз по сравнению с исходными данными (Hanna et al., 2013). При содержании мидии *M.*

galloprovincialis в воде с добавлением в воду 10 мг/л НЧ ZnO за 72 часа концентрация этого элемента в тканях моллюсков увеличилась более чем в пять раз (Montes et al., 2012).

В ходе эмбриотеста было рассмотрено 4 стадии развития личинки ежа: образование оболочки оплодотворения, формирование бластулы, гаструлы и среднего плутеуса. Данные о зависимости токсического эффекта на раннее развитие плоского морского ежа *S. mirabilis* от воздействия ионной и наноформы цинка на родительские особи в преднерестовом состоянии представлены на рисунке 12А.

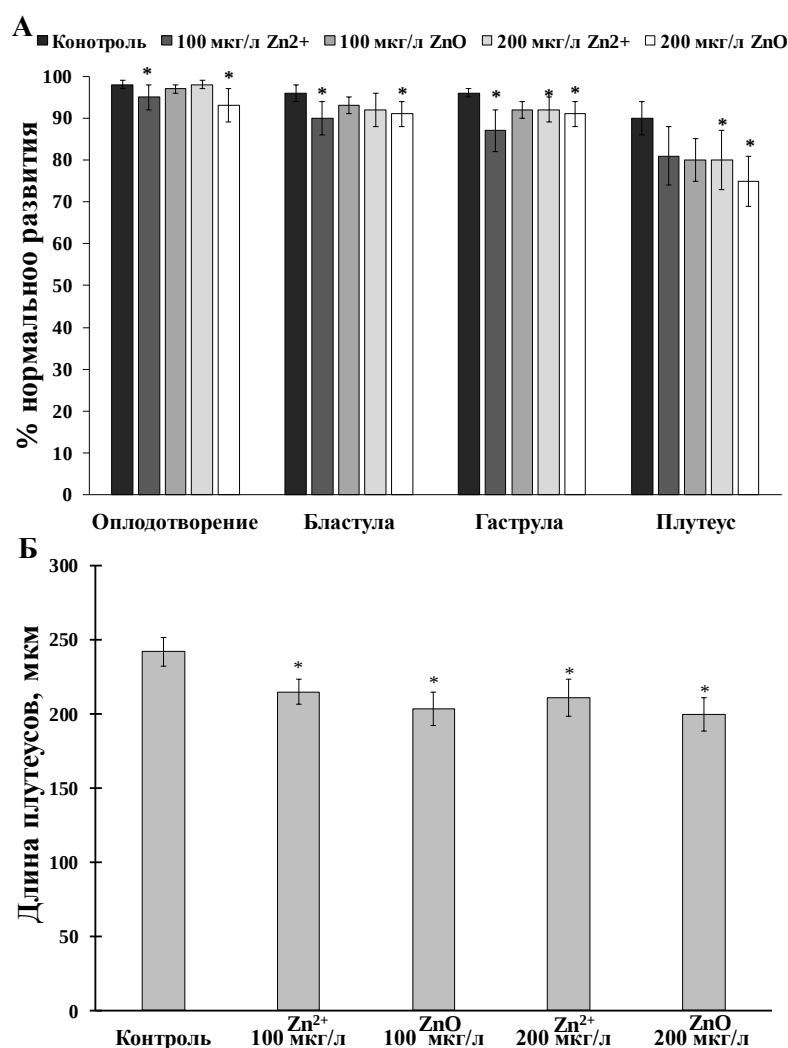


Рисунок 12 – Влияние НЧ оксида цинка и ионов цинка на раннее развитие плоского морского ежа *S. Mirabilis*: А – доля нормально развитых особей на разных стадиях развития; Б – длина 48ч плутеуса. (среднее ±станд. откл n=16)

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

В результате выявлено, что при воздействии на родительские особи достоверное увеличение доли аномально развивающихся эмбрионов и личинок наблюдается на всех стадиях развития при экспозиции в воде с содержанием 100 и 200 мкг/л ионной и наноформы цинка. Следовательно, как ионы цинка, так и НЧ оксида этого микроэлемента в разных концентрациях способны, проникая в организм половозрелых особей плоского морского ежа *S. mirabilis*, снижать качество их гамет, что затем проявляется в нарушении развития их эмбрионов и личинок. На стадии гастролы морфологические аномалии проявлялись в изменении формы личинок, а также образованием экзогастрол. На стадии среднего плутеуса характерными нарушениями являлись укорочение личиночных рук и отсутствие сформированного скелета личинки.

Также наблюдалось достоверное отличие длины плутеусов от контрольных значений при всех исследуемых в эксперименте концентрациях (см. рис. 12Б). Таким образом, еще одним результатом негативного действия НЧ ZnO на гонады взрослых особей ежа *S. mirabilis*, является отставание в развитии их потомства от контроля, что выражается в уменьшении размеров личинок.

Токсическое действие ионов цинка на раннее развитие морских ежей хорошо изучено, показано, что это один из наиболее токсичных металлов, влияющих на раннее развитие иглокожих. Например, Кобаяси Н., проводя изучение влияние ионов цинка на эмбрионы и личинки различных видов морских ежей, подробно описывал аномалии их развития (Кобаяси и др., 1994; Kobayashi, Okamura, 2004). Эмбриотоксический эффект ионов цинка связан с их способностью нарушать кальциевый обмен и ингибировать активность АТФазы (Ca^{2+} ATPase) (Tellis et al., 2013).

В литературе есть отдельные данные о том, что НЧ ZnO также являются токсичными для гидробионтов. Например, эксперименты с морским ежом *P. lividus* показали, что в растворе с содержанием 0,06 мг/л НЧ ZnO происходило

нарушение личиночного развития и количество аномально развивающихся личинок на стадии среднего плутеуса составило 100% (Manzo et al., 2013).

На биохимическом уровне воздействие ионов цинка и НЧ ZnO выразалось в повреждении ядерной ДНК сперматозоидов и плутеусов. Обнаружены статистически значимые отличия от контрольных показателей доли поврежденной ДНК при 10-дневной экспозиции взрослых особей плоского морского ежа в воде, содержащей ионы и НЧ цинка в концентрации 200 мкг/л. Наибольший процент поврежденных ДНК (более 20%) выявлен в сперматозоидах, полученных от взрослых особей, содержавшихся в воде с концентрацией 200 мкг/л НЧ (рисунок 13).

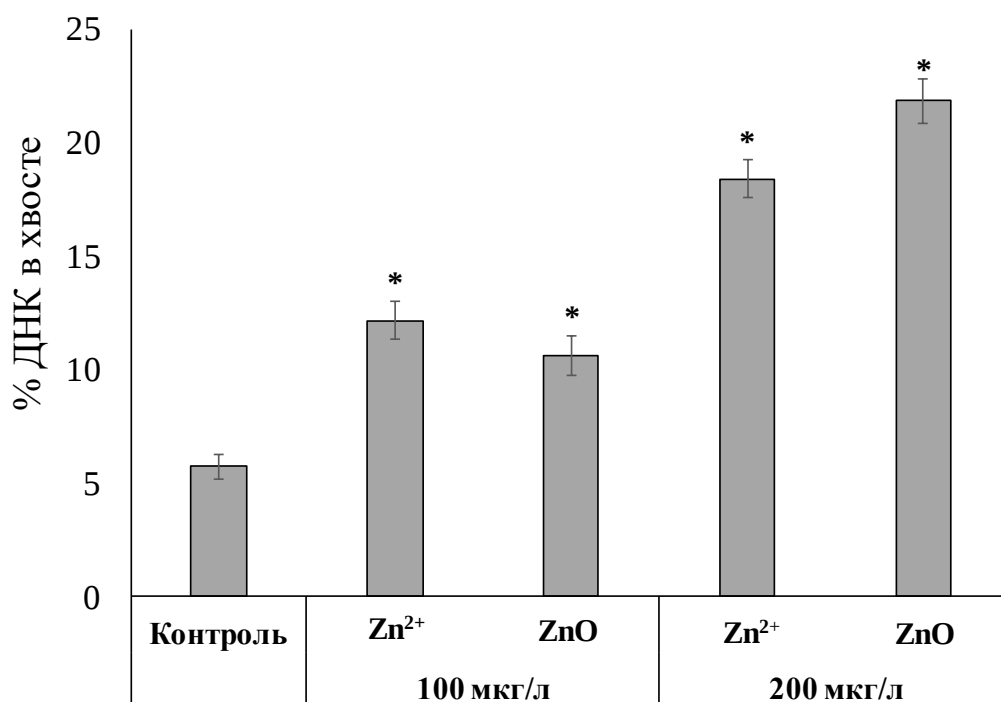


Рисунок 13 – Повреждение ДНК в сперматозоидах *S. mirabilis* (среднее ±станд. откл n=15)

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

Результаты кометного анализа в клетках 48 ч. плутеусов показали, что воздействие на взрослого ежа привело к урону ДНК его личинок. Как в группе подвергшейся воздействию ионов, так и в группе подвергшейся воздействию

НЧ, степень повреждения ДНК превышала контрольные значения. Как и в случае со спермой, наибольшие повреждения наблюдались в группе, подвергшийся воздействию 200 мкг/л НЧ ZnO (рисунок 14).

Ранее были опубликованы данные о генотоксическом воздействии соединений цинка на половые клетки водных организмов. Так, эксперименты с аквариумной рыбкой *D. rerio* показали, что при 24-часовой экспозиции сперматозоидов в растворах с микро- и НЧ цинка происходит дозозависимое увеличение повреждения ДНК, было отмечено появление кометного хвоста, что указывает на необратимое повреждение ДНК в клетках (Xiong et al., 2011). Также было показано, что в результате воздействия НЧ ZnO на эмбрионы *D. rerio* появляются деформированные личинки, возрастает активность ферментов, свидетельствующих об окислительном стрессе, и доля поврежденных ДНК (Zhao et al., 2013).

Однако в большинстве экспериментов описываются последствия кратковременного воздействия токсичных веществ на гидробионтов, работы, описывающие результаты воздействия токсикантов на взрослых морских ежей, крайне немногочисленны. Например, в работе Дуркиной В.Б. (1994) показано, что содержание взрослых невооружённых морских ежей *Strongylocentrotus nudus* в течение 42 суток в растворе с концентрацией ионов цинка 100 мкг/л, а промежуточных морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* – в течение 16-19 суток в растворе с концентрацией ионов цинка 250 мкг/л, вызывало у них появление нежизнеспособного потомства.

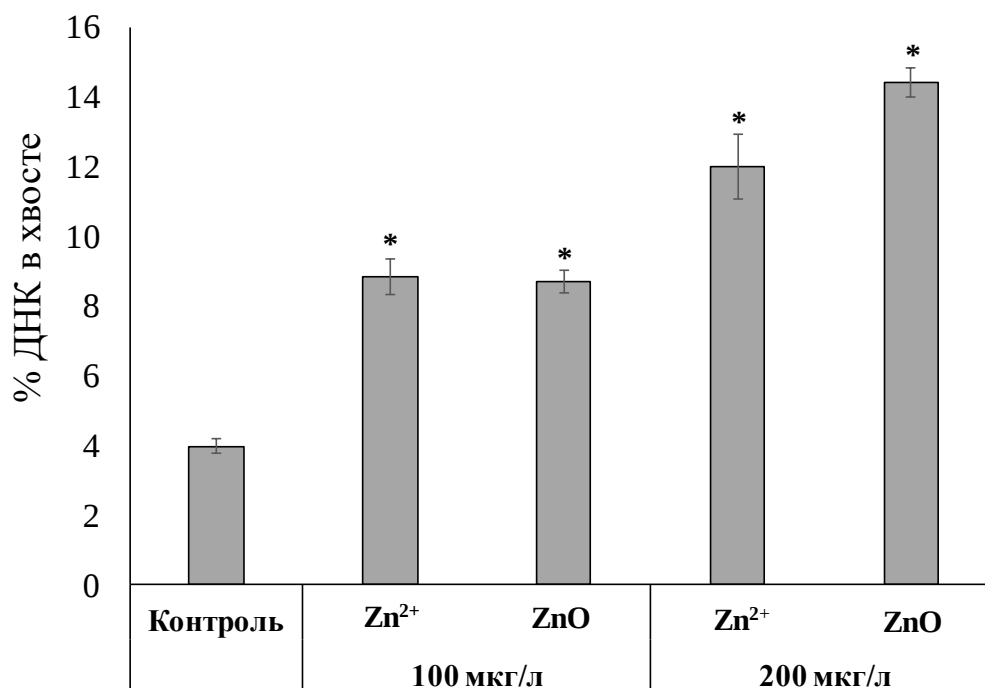


Рисунок 14 – Повреждение ДНК в плутеусах *S. mirabilis*, после 10 дней эксперимента. (среднее ±станд. откл n=15)

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

Эти данные согласуются с результатами, полученными автором в своих исследованиях. Обнаружены значимые статистические различия от контрольных показателей доли поврежденной ДНК сперматозоидов и клеток плутеусов при 10-дневной экспозиции взрослых особей плоского морского ежа в воде, содержащей ионы и НЧ цинка в концентрациях 100 и 200 мкг/л. Наибольший процент поврежденных ДНК (более 20%) выявлен в сперматозоидах, полученных от взрослых особей, экспонирующихся в воде с содержанием 200 мкг/л НЧ ZnO. Широкое распространение имеет гипотеза, что негативный эффект, оказываемый НЧ оксидов металлов, является следствием частичного или полного растворения конкретных НЧ. А в результате их диссоциации образуются ионы, являющиеся причиной токсичности, тех или иных НЧ (Fairbairn et al., 2011; Miller et al., 2010). Тем не менее существует целый ряд работ, сравнивающих интенсивность токсического ответа НЧ и соответствующих ионов, результаты которых

говорят о том, что токсичность НЧ превышает токсичность ионов в тех же концентрациях (Navarro et al., 2008; Manzo et al., 2013). Разница в интенсивности оказываемого на *S. mirabilis* воздействия говорит в пользу наличия у НЧ собственных, связанных с их физическим состоянием, эффектов.

Хроническое загрязнение соединениями цинка водной среды и длительное воздействие на гидробионтов более низких его концентраций будут иметь негативные последствия, так как накопление исследуемых соединений цинка в клетках гонад вызывает серьезные нарушения в ДНК гамет, которые проявляются в процессе развития как на ранних, так и на поздних стадиях эмбриогенеза плоского морского ежа *S. mirabilis*.

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

Оценка повреждений ДНК после воздействия исследуемых растворов дала следующие результаты.

После экспериментального воздействия растворённого цинка, уже при концентрации 20 мкг/л наблюдался рост повреждения ДНК примерно в 1,6 раз и составил $4,68 \pm 0,44\%$ ДНК в хвосте, по сравнению с контрольной группой, процент повреждения в которой был равен $2,77 \pm 0,73\%$ ДНК в хвосте. При концентрации 50 мкг/л и более высоких концентрациях наблюдалось статистически достоверное увеличение повреждения ДНК в 2,1 раза, что соответствует $6,04 \pm 1,17\%$ ДНК в хвосте. При этом дальнейшее повышение содержания ионов цинка в воде до значений 100 мкг/л и 200 мкг/л не привело к последующему резкому росту повреждения ДНК и превышение контрольного значения составлял 2,2 и 2,3 раза соответственно (рисунок 15А).

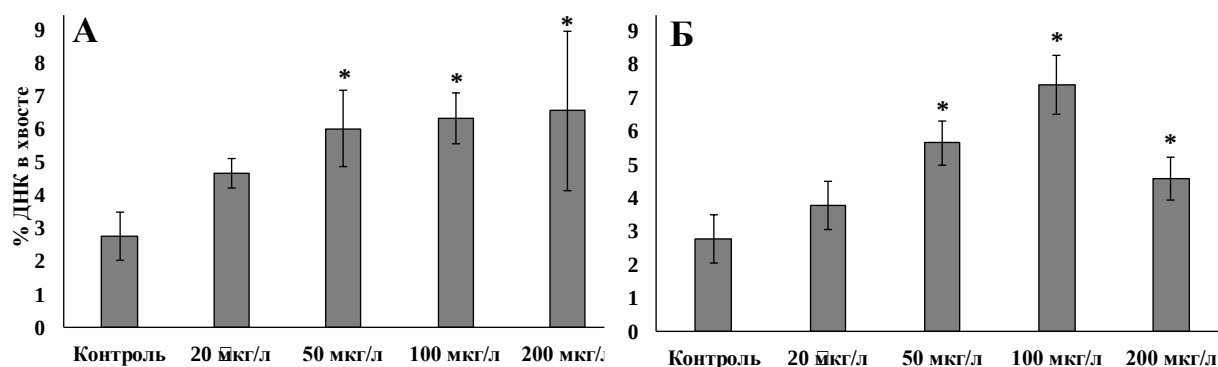


Рисунок 15 – Повреждение ДНК в сперматозоидах *S. mirabilis*, после 1 часа экспозиции: А – воздействие ионов цинка; Б – воздействие НЧ оксида цинка. (среднее ±станд. откл n=15)
* – отличие от контроля достоверно при $p < 0,05$

При воздействии низких концентраций НЧ ZnO наблюдалась схожая с воздействием ионов цинка картина. При воздействии 20 мкг/л произошло незначительное увеличение повреждения ДНК приблизительно в 1,3 раза и составило $3,77 \pm 0,74\%$ ДНК в хвосте. При 50 мкг/л – отличие было более чем в 2 раза и составляло $5,65 \pm 0,66\%$ ДНК в хвосте. При 100 мкг/л произошло дальнейшее увеличение повреждения ДНК в 2,6 раза до значений $7,42 \pm 0,88\%$ ДНК в хвосте. Тем не менее, при концентрации НЧ 200 мкг/л произошло уменьшение степени повреждения ДНК. Оно превышало контроль только в 1,6 раза и составило $4,59 \pm 0,66\%$ ДНК в хвосте (рисунок 15Б).

Для того, чтобы оценить размеры выявленных деструктивных изменений в спермиях, подвергшихся воздействию НЧ ZnO, обратимся к результатам исследований Лаказе с коллегами (2011). На примере здоровых представителей амфипод *Gammarus fossarum* они определили контрольные и пороговые значения повреждения генома спермиев с учетом сезонных колебаний. Установлено, что эталонное (среднее) значение повреждения ДНК в спермиях составляет 3,1%, а минимальные и максимальные пороговые значения равнялись 2,6% и 3,5%, соответственно (Lacaze et al., 2011).

Сопоставление этих данных с нашими результатами, полученными на спермиях морского ежа, дают основание утверждать, что воздействие НЧ ZnO

приводит к серьезным повреждениям в молекуле ДНК сперматозоидов при всех исследованных концентрациях.

Литературные сведения о генотоксических свойствах НЧ пока немногочисленны. Подобного рода исследования, проведенные с использованием спермиев морского ежа *P. lividus*, также выявили генотоксические свойства НЧ ZnO и CuO (Gallo et al., 2018; Oliveira et al., 2019). Чувствительность генома мужских гамет к воздействию различных НЧ показана и у других представителей морских беспозвоночных, включая двустворчатого моллюска *Tegillarca granosa* (Han et al. 2019), полихету *Hydroides elegans* (Devakumar et al. 2017) и асцидию *Ciona intestinalis* (Gallo et al., 2016).

При объяснении механизмов токсичности сформировалась и стала популярной точка зрения, что токсичность НЧ непосредственно связана с Zn^{2+} , которые образуются вследствие нестабильности НЧ в водной среде (Hanna et al, 2013). Однако, учитывая кратковременный характер наших экспериментов, при которых большая часть НЧ ZnO сохраняют структуру, а концентрация Zn^{2+} очень низкая (Hanna et al, 2013), логично предположить, что основной вклад в деструкцию ДНК вносят непосредственно НЧ. Кроме этого, ряд предыдущих исследований выявили различия в экотоксикологических эффектах, инициированные НЧ и ионами цинка (Manzo et al., 2013, Mazur et al., 2020). Оливейро с коллегами (Oliviero et al., 2019) обратили внимание на отсутствие прямой зависимости уровней повреждения ДНК сперматозоидов от концентрации НЧ. Они отмечали, что в определенном диапазоне изменений концентраций НЧ ZnO наблюдается постепенный рост числа повреждённых «комет», доходя до максимального значения (3 мкМ, в их случае), но при дальнейшем росте концентрации этот показатель начинает постепенно снижаться, в отличие от воздействия растворённого цинка. Схожая зависимость наблюдалась при анализе количества аномалий скелетного развития у личинок морского ежа *P. lividus* после воздействия различных концентраций НЧ TiO_2 (Gambardella et al., 2015a). Подобную

картину в собственно автора и приведённых в научной литературе результатах можно объяснить тем, что скорость агрегации НЧ зависит от их концентрации в водной среде (Mwaanga et al. 2014). При повышенных концентрациях НЧ, в частности НЧ ZnO, частицы стремятся образовывать крупные агрегаты, которые становятся менее биодоступными и, соответственно, вызывают меньший эффект.

Механизмы, лежащие в основе генотоксического действия НЧ ZnO на мужские гаметы, не ясны. Большинство исследователей, при объяснении причин генотоксичности обращают внимание на способность НЧ индуцировать повышенную генерацию АФК, вызывая окислительный стресс. Считается, что именно высокореакционные оксирадикалы являются главной причиной окислительного повреждения и разрывов цепей молекулы ДНК (Arora et al., 2012). Нельзя исключать и возможность прямого влияния НЧ на генные структуры и механизмы их регуляции (Rim et al., 2013).

Установлено, что основными способами попадания НЧ в живую клетку являются разновидности эндоцитоза, в частности, через рецепторно опосредованный пиноцитоз (Huerta-Garcia et al. 2015). В настоящее время, сведения о проникновении НЧ в спермии отсутствуют. Учитывая адсорбционные характеристики НЧ и их способность взаимодействовать с клеточными рецепторами, ответственными за передачу стрессовых сигналов (Sruthi et al. 2018), можно высказать следующее предположение: в рамках окислительного стресса НЧ ZnO, располагаясь на различных участках внешней мембраны спермиев, могут в некоторой степени дезорганизовать рецепторно-сигнальную систему и индуцировать образование АФК. Как показано ранее, сперматозоиды морского ежа способны генерировать, по крайней мере, два вида АФК – H_2O_2 и O_2^- (Kazama, Hino, 2012). Вполне вероятно, что подобный механизм образования АФК был инициирован воздействием НЧ CuO на спермии морского ежа *P. lividus*, вызвавший значительную фрагментацию ДНК (Gallo et al., 2018).

В рамках рассматриваемой проблемы надо принять во внимание, что сперматозоиды и яйцеклетки выполняют уникальную и важнейшую биологическую функцию формирования генома для развития следующего поколения. Поэтому целостность геномов гамет имеет первостепенное значение для развития жизнеспособного потомства. Так Мазур с коллегами (2020), исследуя сходные концентрации ZnO, показал, что воздействие как НЧ, так и ионов цинка снижало оплодотворяющую способность сперматозоидов *S. mirabilis*. Доля успешно оплодотворенных яйцеклеток достоверно уменьшилась после воздействия 50 мкг/л НЧ и 100 мкг/л ионов этого микроэлемента. Это подтверждает, что при остром воздействии на сперму НЧ ZnO являются более спермиотоксичными, чем соответствующие ионы.

Биохимический ответ организма, такой как повреждение ДНК, чаще всего опережает цитологический. Например, кратковременное воздействие бенз[а]пирена и диурона на сперматозоиды двустворчатых моллюсков привело к значительному и дозозависимому повреждению ДНК, но при этом спермии сохраняли оплодотворяющую способность (Lewis, Galloway, 2008; Akcha et al., 2012). В других исследованиях также подтверждено что, несмотря на высокий уровень повреждений в ДНК спермиев рыб, индуцированных воздействием генотоксикантов, успешность оплодотворения сохранялась на высоком уровне (Devaux et al., 2011, 2015; Santos et al., 2013).

Считается, что после оплодотворения поврежденная отцовская ДНК может быть частично восстановлена репарационной системой эмбриона (Perez-Cerezales et al., 2010, Devaux 15) или послужить сигналом для запуска различных аномалий развития и гибели эмбрионов.

Косвенным подтверждением этому предположению служат многочисленные лабораторные исследования последних лет, которые продемонстрировали взаимосвязь между целостностью ДНК спермы и качеством потомства у водных организмов (Lewis, Galloway, 2009; Perez-Cerezales et al, 2010; Devaux et al., 2011; Lacaze et al., 2011; Santos et al., 2013). Например, яйцеклетки радужной форели, оплодотворенные спермой с

различной степенью фрагментированной ДНК, образовали эмбрионы с более низкими шансами на выживание (Perez-Cerezales et al., 2010). У вылупившихся личинок трехиглой колюшки, выращенных из яйцеклеток, оплодотворенных метилметансульфонат обработанными сперматозоидами, наблюдались многочисленные пороки развития, главным образом в развитии скелета (Santos et al., 2013).

В соответствии с изложенным можно считать, что деструкция молекулы ДНК в сперматозоидах, выявленная в наших экспериментах, может стать причиной запуска деструктивных процессов и проявления отдаленных нежелательных последствий на организменном или популяционном уровне.

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

В исследовании так же наблюдалась агрегация НЧ TiO_2 в природной морской воде. Изучения физико-химического поведения НЧ TiO_2 в естественной среде, выявили образование агломератов. ТЭМ показала, что средний размер первичных частиц составил 25 нм, при общем размере агломератов 300 нм, что и представлено на рисунке 16.

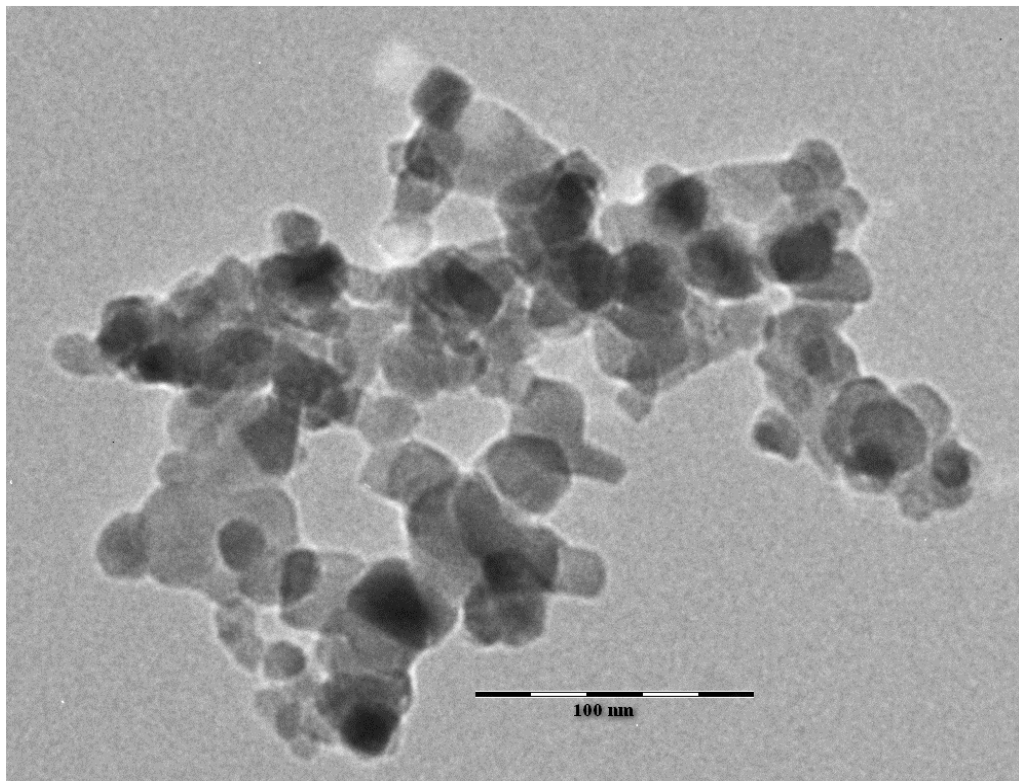


Рисунок 16 – Электронная фотография НЧ TiO_2

В условиях эксперимента мидии *M. trossulus*, не смотря на агломерацию, 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 (рисунок 17).

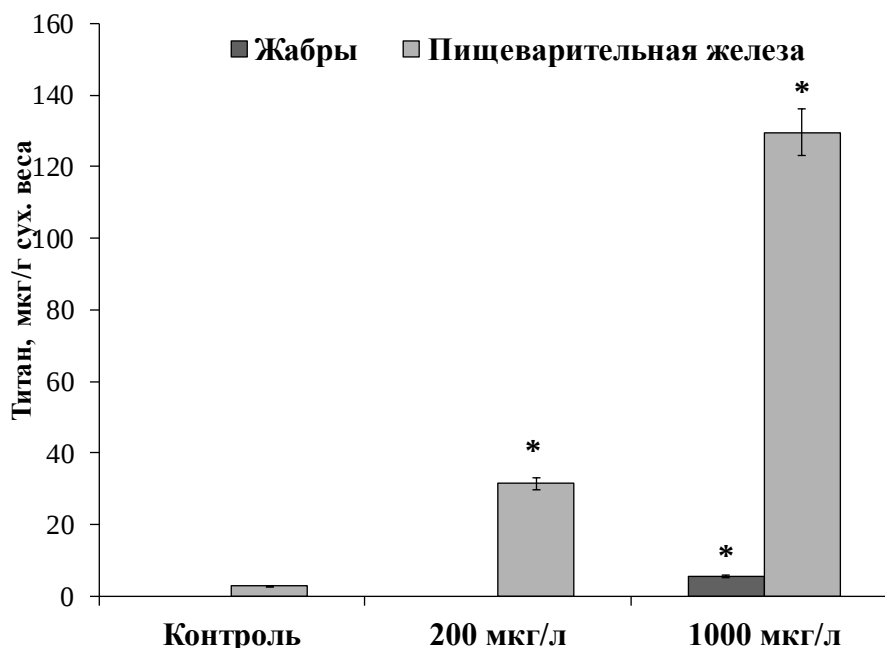


Рисунок 17 – Концентрация титана в тканях *M. trossulus*, после воздействия НЧ диоксида титана (среднее $\pm$ станд. откл n=15)

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

Полученный результат соотносится как с результатами экспериментов автора с CuO , так и работами других исследователей, отмечавших дифференцированное накопление НЧ в тканях мидий (Canesi et al., 2010; Doyle et al., 2015, Chelomin et al., 2017, Kukla et al., 2017). Так ряде статей говорится о способности НЧ TiO_2 попадать внутрь клетки в неизменном виде (Canesi et al., 2010; D'Agata et al., 2014). Несмотря на то, что основной функцией пищеварительной железы является пищеварение, она также является основным местом накопления и детоксикации различных ксенобиотиков органической и неорганической природы, в том числе НЧ оксидов микроэлементов. Специфика этих функций заключается в том, что в ней идут активные процессы эндоцитоза, интенсивность которого напрямую связана с усвоением НЧ живыми системами (Torres-Duarte et al., 2017). В то же время

другие ткани, такие как жабры, могут быть менее восприимчивы к эффекту агрегатов НЧ и более чувствительны к растворенным компонентам НЧ.

Воздействие токсических веществ может привести к целому ряду неблагоприятных последствий для здоровья. Одним из токсических эффектов оксида НЧ металлов является ПОЛ. 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 (рисунок 18).

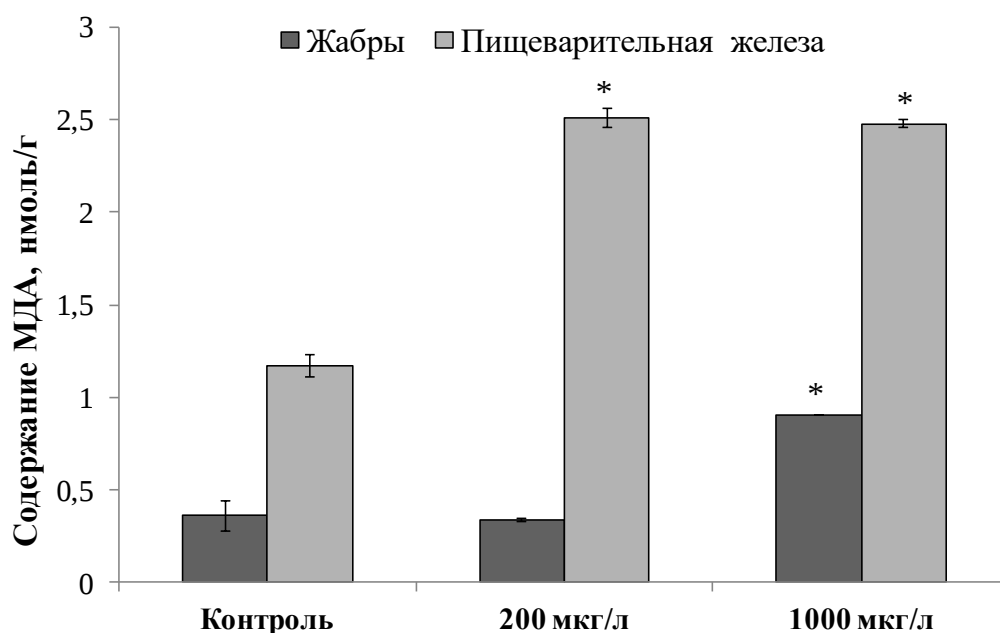


Рисунок 18 – Концентрация МДА в тканях *M. trochus*, после воздействия НЧ диоксида титана (среднее $\pm$ станд. откл $n=15$)

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

Увеличение продукции АФК и перекисное окисление ими ненасыщенных жирных кислот – одна из наиболее частых реакций окислительного стресса под влиянием различных ксенобиотиков. Поэтому повышение уровня МДА рассматривается как маркер окислительного стресса

у моллюсков после воздействия НЧ TiO_2 (Zhu et al., 2011; Girardello et al., 2016). Повышенный уровень МДА наблюдавшийся в эксперименте, может свидетельствовать о том, что антиоксидантная способность была подавлена усиленным производством АФК, вызванным воздействием НЧ TiO_2 . Xia с коллегами также сообщали о значительном увеличении содержания МДА в морском гребешке *Chlamys farreri* после воздействия соответствующей концентрации НЧ TiO_2 (Xia et al. 2017).

Воздействие НЧ TiO_2 привело к достоверному увеличению повреждения ДНК жабр и пищеварительной железы 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 (рисунок 19).

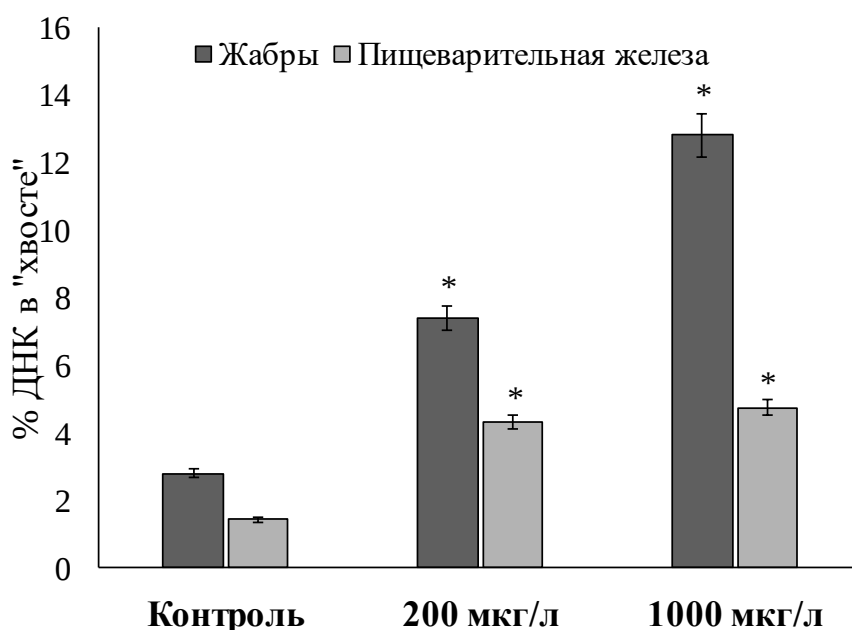


Рисунок 19– Повреждение ДНК в тканях *M. trossulus*, после воздействия НЧ диоксида титана (среднее $\pm$ станд. откл n=15)

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

В литературе существует ограниченная информация о влиянии НЧ TiO_2 на генетический материал водных организмов. Показано, что присутствие НЧ

TiO₂ в донных отложениях увеличивает повреждения ДНК в клетках морского пескожила *Arenicola marina* (Galloway et al., 2010), а воздействие на мидии *M. galloprovincialis* вызывало значительное увеличение частоты образования микроядр в тканях жабр (Россо et al., 2015) и повреждение ДНК в гемоцитах (D'Agata et al., 2014). У мидии съедобной *M. edulis*, подвергнутой воздействию НЧ TiO₂ в течение 96 ч, частота микроядр увеличивалась с увеличением концентрации НЧ (Farkas et al., 2015).

Результаты как кометного анализа, так и анализа образования микроядер показали высокий уровень повреждения ДНК в гемоцитах тихоокеанского петушка *Ruditapes philippinarum*, подвергшихся воздействию НЧ TiO₂ (Marisa et al., 2018). Кроме этого, ряд *In Vivo* и *In Vitro* работ показали генотоксический потенциал НЧ TiO₂ на рыбах (Vever and Jha, 2008, Reeves et al., 2008, Della Torre et al., 2015, Vignardi et al., 2015).

Как отмечалось, 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). Например, быстрое увеличение продукции АФК и оксида азота наблюдалось в гемоцитах *M. galloprovincialis* после кратковременного воздействия НЧ, включая TiO₂ (Canesi et al., 2010). Выявлены изменения активности антиоксидантных ферментов и повышенный уровень МДА в различных тканях, что свидетельствует об окислительном стрессе, вызванном НЧ TiO₂ (Barmo et al., 2013; Xia et al., 2017; Huang et al., 2018; Sureda et al., 2018). 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 увеличивались после воздействия НЧ TiO₂ 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, отметим их способность поглощать УФ-излучение и генерировать АФК на своей поверхности. В водной среде НЧ TiO_2 способны сорбироваться на поверхности жабр, где и будет происходить УФ-активация комплекса между НЧ и жаберными клетками. Это 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 способны 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 SiO₂ на M. trossulus

Донные организмы-фильтраторы представляют собой уникальную группу для изучения экотоксикологического воздействия НЧ (Canesi et al., 2010a). Специфический способ питания приводит к накоплению целого ряда поллютантов в их организме. Проведённые эксперименты показали, что в пищеварительной железе контрольной группы не было выявлено кремния в определяемых количествах. Однако, после 6 дней воздействия НЧ на *M. trossulus* был зафиксирован рост содержания кремния до значений $11,04 \pm 0,3$ мкг/г сух веса, что отражено в таблице 5.

Таблица 5 – Концентрация кремния (мкг/г сырой массы) в органах
M. trossulus, после воздействия НЧ диоксида кремния (n=15)

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

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

Вероятнее всего находящиеся в экспериментальном резервуаре НЧ SiO₂ были захвачены пищеварительной системой в процессе фильтрации и были усвоены пищеварительной железой. Основной способ поступления НЧ в клетку – различные виды эндоцитоза (Eom, Choi 2019). Именно в пищеварительной железе эти процессы наиболее активны. По этой причине в опытах по воздействию различных НЧ именно пищеварительную железу рассматривают как важнейший объект изучения экотоксикологов. Данные экспериментов по воздействию других видов НЧ на *M. Trossulus* подтверждают эту теорию (Chelomin et al., 2017, Kukla et al., 2021). Литературные данные о накоплении кремниевых НЧ в водных организмах свидетельствуют, что они могут накапливаться в пищеварительной и других

системах *D. magna* (Yang et al., 2014), и некоторые даже проникать через хорион в эмбрион *D. rerio* (Pham et al., 2016).

Для оценки влияния накопления НЧ SiO_2 на ДНК *M. trossulus* был проведён кометный анализ. По его результатам в пищеварительной железе мидий контрольной группы степень повреждения ДНК составляла $7,41 \pm 0,33\%$ ДНК в хвосте. После воздействия НЧ этот показатель увеличился более чем в два раза и составил $19,28 \pm 0,86\%$ ДНК в хвосте (рисунок 20).

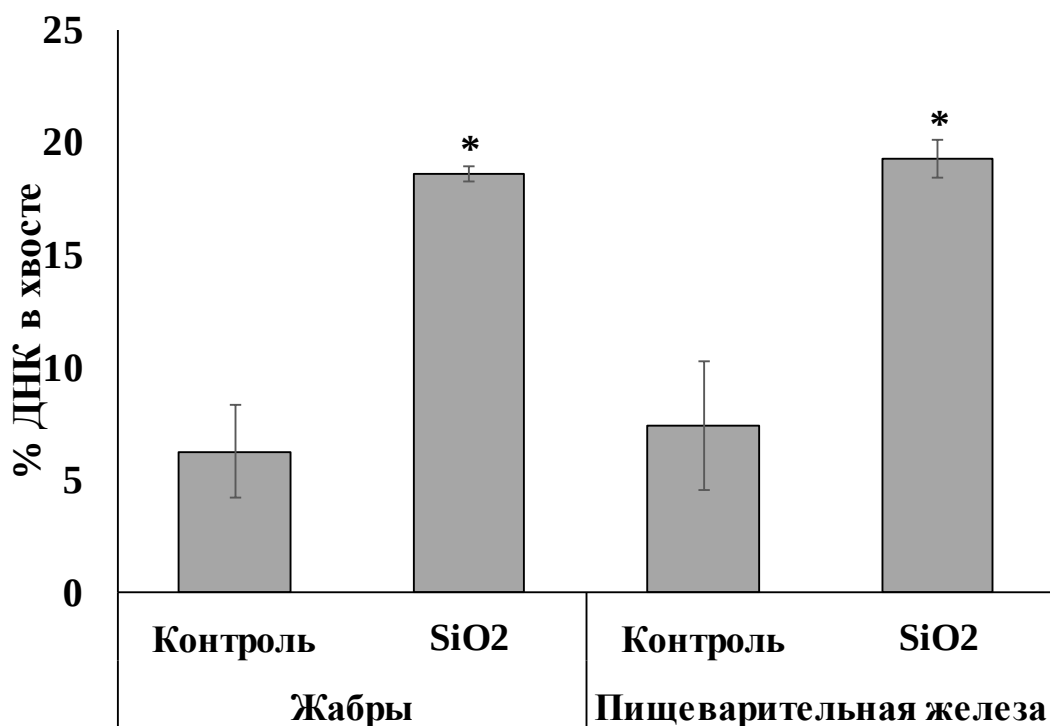


Рисунок 20 – Повреждение ДНК в тканях *M. trossulus*, после воздействия НЧ диоксида кремния (среднее $\pm$ станд. откл $n=15$)

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

На сегодняшний день существует крайне мало данных о токсическом воздействии кремнийсодержащих НЧ на представителей типа моллюски (Ale et al., 2021). Кремниевые нанотрубки оказывали цитотоксический эффект на гемоциты моллюска *Modiolus modiolus*, а также изменяли мембранный потенциал гемоцитов *M. modiolus* и *Arca boucardi* (Pikula et al., 2020). *In vitro*

воздействие НЧ оксида кремния на гемоциты *Mytilus galloprovincialis* вызвало огромное выделение внеклеточных свободных радикалов (Canesi et al., 2010b), а 24ч воздействие *in vivo* привело к индицированию каталазы и дизрегуляции липидного метаболизма в клетках печени *M. galloprovincialis* (Canesi et al., 2010a).

Большинство исследователей, характеризуя повреждения в молекуле ДНК, считают, что они могут быть вызваны как прямыми, так и опосредованными механизмами. К механизмам первого рода следует отнести способность НЧ связываться непосредственно с молекулой ДНК. Не прямые механизмы включают в себя целый спектр различных взаимодействий НЧ с клеткой. Это может быть растворение поглощённой клеткой НЧ с образованием токсичных ионов. НЧ могут вступать во взаимодействие с макромолекулами и структурными составляющими клетки, с последующим нарушением их функций. Однако основной причиной токсичности НЧ принято считать образование ими внутри и на поверхности клетки АФК.

Принимая во внимание разную аккумуляция в органах *M. trossulus*, можно предположить, что НЧ диоксида кремния могут вызывать повреждение ДНК несколькими путями. В случае с клетками пищеварительной железы имеет место 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 оксида 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 *M.trossulus* было вызвано образованием АФК на поверхности НЧ внутри клетки. Высокая площадь НЧ подразумевает нахождение большого числа атомов с высокоэнергетическими связями, легко реагирующими с окружающими молекулами (Nabeshi et al., 2011). Так же нельзя исключать возможность прямого воздействия на ДНК пищеварительной железы. На примере клеток человеческого эпителия было показано, что они могут проникать в ядро и непосредственно

взаимодействовать генетическим аппаратом (Chen, Mikecz 2005). Повреждение генома в жабрах может быть следствием непрямого воздействия НЧ.

7.2. Острое воздействие наночастиц SiO_2 на сперму *S. mirabilis*

У сперматозоидов, не подвергшихся воздействию НЧ, 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 (рисунок 21А).

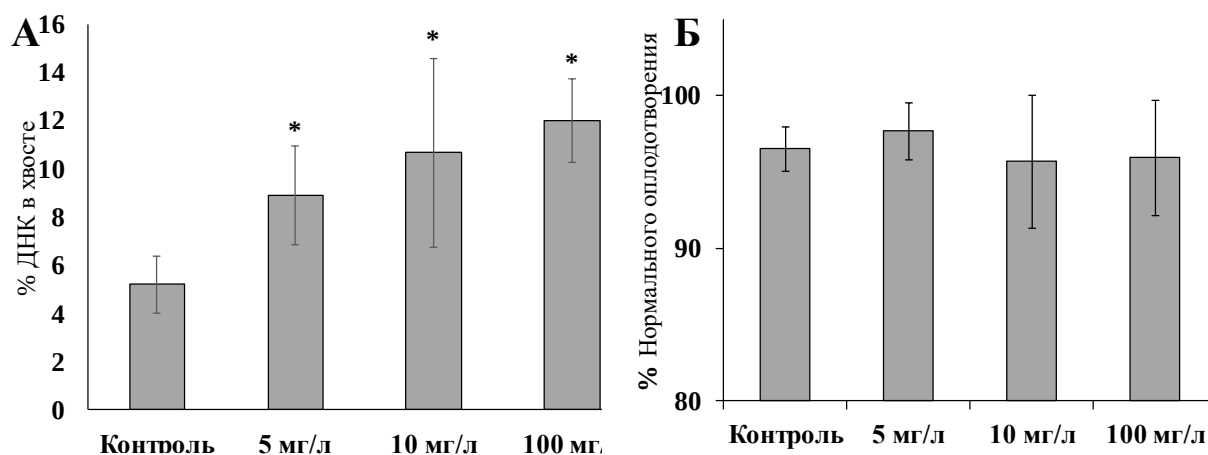


Рисунок 21 – Влияние НЧ диоксида кремния на сперму плоского морского ежа *S. Mirabilis*: А – повреждение ДНК;

Б – эффективность оплодотворения (n=16) (среднее $\pm$ станд. откл)

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

Воздействие НЧ на целостность ДНК сперматозоидов не может быть следствием попадания НЧ внутрь, так как 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.

На сегодняшний день существует ряд экспериментальных работ, показывающих генотоксический эффект НЧ SiO_2 , но все они проведены на *in vivo* и *in vitro* моделях клеток млекопитающих. Например, Maser et al., (2015) показали повреждение ДНК в культурах клеток грызунов и человека после воздействия НЧ оксида кремния. При этом воздействие этих же НЧ на крыс *in vivo* не показало значимого повреждения ДНК. Так же оксид кремния привёл к повреждению ДНК в клетках различных органов мышей (Nemmar et al., 2016).

Также существуют работы, указывающие на изменения экспрессии генов у водных организмов – после воздействия кремнийсодержащих НЧ – что свидетельствует о влиянии НЧ диоксида кремния на функционирование их генетического аппарата. Так, воздействие кремнийсодержащих НЧ вызывало изменения экспрессии генов в клетках круглых червей, моллюсков, иглокожих и рыб (Hu et al., 2016, Barrick et al. 2018, Eom, Choi 2019, Tacconi et al., 2022). Следует особо отметить, что эффектом затрагивались гены, отвечающие за важные функции организма. Анализ экспрессии генов в гемоцитах *M. edulis*, подвергшихся воздействию НЧ чистого кремния, привело к изменению экспрессии генов, в том числе отвечающих за синтез белков системы репарации ДНК и антирадикальной систем (Barrick et al. 2018). А воздействие на взрослых нематод *Caenorhabditis elegans* привело к угнетению экспрессии генов, отвечающих за оплодотворяющую способность сперматозоидов и нормальное личиночное развитие организма (Eom, Choi 2019). Изменения в работе подобных систем могут представлять серьёзную опасность для нормального функционирования взрослого организма и его репродуктивного потенциала.

В рамках рассматриваемой проблемы, чтобы оценить функциональные свойства спермиев с различной степенью повреждения генома, было проведено тестирование их способности к оплодотворению яйцеклеток.

Оказалось, что, независимо от уровня выявленных в ходе экспериментов повреждений ДНК, диоксид кремния не оказывал выраженного воздействия на процесс оплодотворения. Результат теста на спермиотоксичность 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 (рисунок 22Б).

На основании полученных данных можно предположить, что концентрации НЧ, использованные в наших экспериментах, достаточны, чтобы вызвать биохимические сдвиги в спермиях, приведшие к повреждению ДНК, но недостаточны, чтобы повлиять на их оплодотворяющую способность. С другой стороны, правомочно также предположить, что целостность генома спермиев не является критическим условием оплодотворения у этого вида морских ежей.

Существующие единичные статьи, посвящённые спермиотоксичности НЧ SiO_2 , согласуются с полученными результатами. В экспериментах по воздействию НЧ SiO_2 на сперму ежа *P. lividus* значительных изменений в количестве оплодотворённых яйцеклеток не наблюдалось (Gambardella et al., 2015c); так же как и при экспозиции спермы *P. lividus* модифицированными аминами НЧ SiO_2 (Tasconi et al., 2022).

Однако несмотря на то, что повреждение ДНК не всегда оказывает воздействие на оплодотворяющую способность сперматозоидов, оно может стать причиной серьёзных отклонений в дальнейшем развитии полученных в результате оплодотворения организмов. В работе Gambardella et al. (2015), не смотря на отсутствие отклонений в оплодотворении, после воздействия НЧ оксида кремния на сперматозоиды на стадиях гастрюлы и плутеуса наблюдались задержки и отклонения их развития. Увеличение числа аномалий личиночного развития морских ежей, также отмечалось после воздействия НЧ серебра, золота, оксидов цинка и меди (Buric et al., 2015, Pikula et al. 2020). Сопоставление литературных данных с полученными результатами говорят о возможных патологических последствиях воздействия НЧ диоксида кремния на сперму *S. mirabilis*.

В заключение стоит отметить, что нами впервые был показан генотоксический эффект воздействия НЧ SiO_2 на морские организмы. Повреждение ДНК было вызвано как хроническим воздействием на бентосный организм фильтратор, так и острым воздействием на сперматозоиды, находящиеся в водной толще.

Данные результаты говорят о необходимости дальнейших экотоксикологических исследованиях воздействия НЧ на морские организмы разных систематических и трофических групп. Важно, что реакция сперматозоидов отмечалась только на надклеточном уровне и отсутствовала на клеточном. Упор дальнейших исследований должен быть сделан на использование комплексного биохимического подхода. А также в использовании экологически достоверных концентраций НЧ.

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 *M. trossulus* и *S. mirabilis*, 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 исследуемых частиц 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

ААС – атомно абсорбционная спектроскопия

АФК – активные формы кислорода

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

МДА – малоновый диальдегид

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

НЧ – наночастицы

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия

Ag – серебро

Co - кобальт

CuO – оксид меди

ZnO – оксид цинка

TiO₂ – диоксид титана

SiO₂ – диоксид кремния

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бегун А.А., Елькин Ю.Н., Максимов С.О., Белогурова Л.С., Артюков А.А. Структура питания клипестер *Echinarachnius parma* и *Scaphechinus mirabilis* (Echinoidea, Clypeasteroidea) в бухте Троицы Японского моря // Известия ТИНРО. 2014. Т. 178. С. 199-205.
2. Брыков В.А. Индивидуальный возраст и рост некоторых видов плоских морских ежей // Биология морских моллюсков и иглокожих. Материалы Советско-Японского симпозиума. Академия наук СССР, Владивосток. 1974. 170 с.
3. Бузников Г.Н., Подмарев В.К. Морские ежи *Strogolocentrotus drobachiensis*, *S. nudus*, *S. intermedius* // Объекты биологии развития. – 1975. – С. 179-216.
4. Евсеев Г.А., Яковлев Ю.М. Двустворчатые моллюски дальневосточных морей. Владивосток: ПК Поликон, 2006. 120 с.
5. Касьянов В.Л., Медведева Л.А., Яковлев Ю.М., Яковлев С.Н. Размножение иглокожих и двустворчатых моллюсков. М.: Наука. 1980. 207 с.
6. Кобаяси Н., Найдено Т.Х., Ващенко М.А. Стандартизация биотеста с использованием зародышей морского ежа // Биология моря. 1994. Т. 20. № 6. С. 457-464.
7. Ковалев Н.Н., Крыжановский С.П., Кузнецова Т.А., Костецкий Э.Я., Беседнова Н.Н. Морские ежи: биомедицинские аспекты практического применения // Владивосток: Дальнаука. 2016. 128 с.
8. Ковтун Г.П. Вережкина А.А. Наноматериалы: технологии и материаловедение: Обзор. Харьков: ННЦ ХФТИ. 2010. 73 с.
9. Мазур А.А., Журавель Е.В., Слободскова В.В., Мазур М.А. Оценка токсического воздействия ионов цинка и наночастиц оксида цинка на раннее развитие морского ежа *Scaphechinus mirabilis* (Agassiz, 1864) (Echinodermata: Echinoidea) // Биология моря. 2020. Т. 46. №1. с. 53-59.

10. Репина Е.М. Л. Г. Седова Д. А. Соколенко. Плоские морские ежи в прибрежье Приморья (Японское море): Распределение и ресурсы // Известия ТИНРО. 2012. Т. 171. С. 121-132.
11. Скорлато О.А. Двустворчатые моллюски умеренных вод северо-западной части Тихого океана. Л.: Наука, 1981. 480 с.
12. Явнов С.В., Поздняков С.Е. Атлас двустворчатых моллюсков дальневосточных морей России. Владивосток: «Дюма», 2000. 168 с.
13. Adeleye A.S., Conway J.R., Perez T., Rutten P., Keller A.A. Influence of extracellular polymeric substances on the long-term fate, dissolution, and speciation of copper-based nanoparticles // Environmental Science and Technology. 2014.V. 48. 12561–12568.
14. Adeleye A.S., Oranu E.A., Tao M., Keller A.A. Release and detection of nanosized copper from a commercial antifouling paint // Water Research. 2016. V. 102. P. 374-382.
15. Ageenko N.V., Kiselev K.V., Odintsova N.A Quinoid Pigments of Sea Urchins *Scaphechinus mirabilis* and *Strongylocentrotus intermedius*: Biological Activity and Potential Applications // Marine Drugs. 2022. V. 20. P. 611.
16. Ahamed M, Siddiqui M. A, Akhtar M. J., Ahmad I., Pant A. B., Alhadlaq H. A. Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2010. V. 396. P. 578-583.
17. Ahamed A.; Liang L.; Lee M.Y.; Bobacka J.; Lisak G. Too small to matter? Physicochemical transformation and toxicity of engineered nTiO₂, nSiO₂, nZnO, carbon nanotubes, and nAg // Journal of Hazardous Materials. 2021. V. 404, 124107.
18. Akcha, F.; Spagnol, C.; Rouxel, J. Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos // Aquatic Toxicology. 2012. V. 106-107. P. 104-113.

19. Ale A.; Gutierrez M.F.; Rossi A.S.; Bacchetta C.; Desimone M.F.; Cazenave J. Ecotoxicity of silica nanoparticles in aquatic organisms: An updated review // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2021. V. 87,103689.
20. Ali D., Ali H., Alarifi S., Kumar S., Serajuddin M., Mashih A.P., Ahmed M., Khan M., Adil S.F., Shaik M.R., Ansari A.A. Impairment of DNA in a freshwater gastropod (*Lymnea luteola* L.) after exposure to titanium dioxide nanoparticles // *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2015. Vol. 68. P. 543-552.
21. Al-Sid-Cheikh M.; Rouleau C.; Pelletier E. Tissue distribution and kinetics of dissolved and nanoparticulate silver in Iceland scallop (*Chlamys islandica*) // *Marine Environmental Research*. 2013. V. 86. P. 21-28.
22. Ameh T, Sayes CM. The potential exposure and hazards of copper nanoparticles: A review // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2019. V. 71,103220.
23. Amin M.T., Alazba A.A., Manzoor U. A Review of Removal of Pollutants from Water/Wastewater Using Different Types of Nanomaterials // *Advances in Materials Science and Engineering*. 2014. P. 1 -24.
24. Arora, S.; Rajwade, J.M.; Paknikar, K.M. Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2012. V. 258. P. 151-165.
25. Baig N., Kammakakam I., Falathabe W. Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges // *Materials Advances*. 2021. V. 2. P. 1821-1871
26. Baker T.J., Tyler C.R., Galloway T.S. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms // *Environmental Pollution*. 2014. V. 186. P. 257-271.
27. Barmo C., Ciacchi C., Canonico B., Fabbri R., Cortese K., Balbi T., Marcomini A., Pojana G., Gallo G., Canesi L. *In vivo* effects of n-TiO₂ on digestive gland and immune function of the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* // *Aquatic Toxicology*. 2013. V. 132-133. P. 9-18.

28. Barrick A.; Mouneyrac C.; Manier N.; De Lantivy L.; Jrad N.; Châtel A. Towards the development of a high throughput screening approach for *Mytilus edulis* hemocytes: A case study on silicon-based nanomaterials // Marine Environmental Research. 2018. V. 142. P. 306-318.
29. Beninger P. G., Le Pennec M., Donval A., Mode of particle ingestion in five species of suspension-feeding bivalve molluscs // Marine Biology. 1991. V. 108. P. 255-261.
30. Bondarenko O., Ivask A., Kakinen A., Kahru A. Sub-toxic effects of CuO-nanoparticles on bacteria: Kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action // Environmental Pollution. 2012. V. 169. P. 81-89.
31. Bongaerts E.; Nawrot T.S.; van Pee T.; Ameloot M.; Bové H. Translocation of (ultra)fine particles and nanoparticles across the placenta; a systematic review on the evidence of in vitro, ex vivo, and in vivo studies // Particle and Fibre Toxicology. 2020. V. 17, 56.
32. Breznan D.; Das D.D.; O'Brien J.S.; MacKinnon-Roy C.; Nimesh S.; Vuong N.Q.; Bernatchez S.; DeSilva N.; Hill M.; Kumarathasan P.; Vincent R. Differential cytotoxic and inflammatory potency of amorphous silicon dioxide nanoparticles of similar size in multiple cell lines // Nanotoxicology. 2017. V. 11. P. 223-235.
33. Brun N., Lenz M., Wehrli B., Fent K. Comparative effects of zinc oxide nanoparticles and dissolved zinc on zebrafish embryos and eleuthero-embryos: Importance of zinc ions // Science of The Total Environment. 2014. V. 476. №.74. P. 657-666.
34. Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation // Methods in enzymology. New York: Academic Press. 1978. P. 302-310.
35. Buffet P.E., Tankoua O.F., Pan J.F., Berhanu D., Herrenknecht C., Poirier L., Amiard-Triquet C., Amiard J.C., Bérard J.B., Risso C., Guibbolini M., Roméo M, Reip P., Valsami-Jones E., Mouneyrac C. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles // Chemosphere. 2011. V. 84. P. 166-174.

36. Bumbudsanpharoke N., Ko S. Nano-food packaging: an overview of market, migration research, and safety regulations // *Journal of Food Science*. 2014. Vol. 80. P. 910-923.
37. Bundschuh M., Filser J., Lüderwald S., McKee M.S., Metreveli G., Schaumann G.E., Schulz R., Wagner S. Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? // *Environmental Sciences Europe*. 2018. V. 30(1), 6.
38. Bundschuh M., Seitz F., Rosenfeldt R.R., Schulz R. Titanium dioxide nanoparticles increase sensitivity in the next generation of the water flea *Daphnia magna* // *PLoS One*. 2012. V. 7(11), e48956.
39. Burić P., Jakšić Ž., Štajner L., Dutour Sikirić M., Jurašin D., Cascio C., Calzolari L., Lyons D.M. Effect of silver nanoparticles on Mediterranean sea urchin embryonal development is species specific and depends on moment of first exposure // *Marine Environmental Research*. 2015. V. 111. P. 50-59.
40. Buzea C., Blandino I.I.P., Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity // *Biointerphases*. 2007. V. 2. No 4. P. 17-172.
41. Canesi L., Fabbri R., Gallo G., Vallotto D., Marcomini A., Pojana G. Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO₂, Nano-SiO₂) // *Aquatic Toxicology*. 2010. V. 100. P. 168-177.
42. Cappello T., Vitale V., Oliva S., Villari V., Mauceri A., Fasulo S., Maisano M. Alteration of neurotransmission and skeletogenesis in sea urchin *Arbacia lixula* embryos exposed to copper oxide nanoparticles // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. 2017. V. 199. P. 20-27.
43. Chang Y., Zhang M., Xia L., Zhang J., Xing G. The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles // *Materials*. 2012. Vol. 5. P. 2850-2871.

44. Chelomin V. P., Slobodskova V.V., Zakhartsev M., Kukla S. Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in the bivalve mollusk *Mytilus trossulus* // Journal of ocean university of China. 2017. Vol. 16. №2. P. 339-345.
45. Chen M.; von Mikecz A. Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles // Experimental Cell Research. 2005. V. 305. P. 51-62.
46. Chen S.; Guo H.; Cui M.; Huang R.; Su R.; Qi W.; He Z. Interaction of particles with mucosae and cell membranes // Colloids. Surf. B. Biointerfaces. 2020, 186, 110657.
47. Chen Z., Wang Y., Ba T., Li Y., Pu J., Chen T., Song Y., Gu Y., Qian Q., Yang J. and Jia G. Genotoxic evaluation of titanium dioxide nanoparticles *in vivo* and *in vitro* // Toxicology Letters. 2014. V. 226. P. 314-319.
48. Collins A.R. The comet assay Principles, Application, and // Methods in Molecular Biology. 2002. V. 203. P. 163-174.
49. D'Agata A., Fasulo S., Dallas L.J., Fisher A.S., Maisano M., Readman J.W. and Jha A.N. Enhanced toxicity of 'bulk' titanium dioxide compared to 'fresh' and 'aged' nano-TiO₂ in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*) // Nanotoxicology. 2014. V. 8. P. 549-558.
50. Dastjerdi R., Montazer M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2010. Vol. 79. P. 5-18.
51. Della Torre C., Balbi T., Grassi G., Frenzilli G., Bernardeschi M., Smerilli A., Guidi P., Canesi L., Nigro M., Monaci F., Scarcelli V., Rocco L., Focardi S., Monopoli M., Corsi I. Titanium dioxide nanoparticles modulate the toxicological response to cadmium in the gills of *Mytilus galloprovincialis* // Journal of Hazardous Materials. 2015. V. 297. P. 92-100.
52. Devakumar C.; Gopalakrishnan H.; Chinnasamy A.; Subramanian B.; Durai P. Toxicity of silver nanoparticles on fertilization success and early development of the marine polychaete *Hydroides elegans* (Haswell, 1883) // The Journal of Basic and Applied Zoology. 2017. V. 78, 1.

53. Donaldson K., Poland C.A., Schins R.P.F. Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: Criteria for improved test strategies // *Nanotoxicology*. 2010. V. 4. P. 414-420
54. Devaux, A.; Fiat, L.; Gillet, C.; Bony, S. Reproduction impairment following paternal genotoxin exposure in brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) // *Aquatic Toxicology*. 2011. V. 101. P. 405-411.
55. Devaux, Y.; Zangrando, J.; Schroen, B.; Creemers, E.E.; Pedrazzini, T.; Chang, C.P.; Dorn, G.W.; Thum, T.; Heymans, S. Cardiolinc Network. Long noncoding RNAs in cardiac development and ageing // *Nature Reviews Cardiology*. 2015. V. 12. P. 415-425.
56. Dikilitas M., Kocyigit A., Yigit F. A molecular-based fast method to determine the extent of DNA damages in higher plants and fungi // *African Journal of Biotechnology*. 2009. Vol. 8. № 14. P. 3118-3127.
57. Dixon D.R., Pruski A.M., Dixon L.R.J., Jha A.N. Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological Overview // *Mutagenesis*. 2002. V.17 N. P.495-507.
58. Donaldson K, Seaton A. A short history of the toxicology of inhaled particles // *Particle and Fibre Toxicology*. 2012. V. 9, 13.
59. Doyle J., Ward J., Mason R. . Exposure of bivalve shellfish to titania nanoparticles under an environmental-spill scenario: Encounter, ingestion and egestion // *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 2016. V. 96(1). P. 137-149.
60. D'Mello S.R.; Cruz C.N.; Chen M.L.; Kapoor M.; Lee S.L.; Tyne K.M. The evolving landscape of drug products containing nanomaterials in the United States // *Nature Nanotechnology*. 2017. V. 12. P. 523-529.
61. Durkina V.B. Morphofunctional changes in the development of offspring of sea urchins as effects of copper and zinc on adult animals // *Russian Journal of Marine Biology*. 1994. V. 20. № 4. P. 305-310.

62. Eom, H.J.; Choi J. Clathrin-mediated endocytosis is involved in uptake and toxicity of silica nanoparticles in *Caenorhabditis elegans* // *Chemico-Biological Interaction*. 2019. V. 311, 108774.
63. Fairbairn E.A., Keller A.A., Mädler L., Zhou D., Pokhrel S., Cherr G.N. Metal oxide nanomaterials in seawater: linking physicochemical characteristics with biological response in sea urchin development // *Journal of Hazardous Materials*. 2011. V. 192(3). P. 1565-1571.
64. Falugi C., Aluigi M.G., Chiantore M.C., Privitera D., Ramoino P., Gatti M.A., Fabrizi A., Pinsino A., Matranga V. Toxicity of metal oxide nanoparticles in immune cells of the sea urchin // *Marine Environmental Research*. 2012. V. 76. P. 114-121.
65. Farkas J., Bergum S., Nilsen E.W., Olsen A.J., Salaberria I., Ciesielski T.M., Bączek T., Konieczna L., Salvenmoser W. and Jenssen B.M. The impact of TiO₂ nanoparticles on uptake and toxicity of benzo(a)pyrene in the blue mussel (*Mytilus edulis*) // *Science of The Total Environment*. 2015. V. 511. P. 469-476.
66. Farré M., Gajda-Schrantz K., Kantiani L. Barceló D. Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009. V. 393. P. 81-95.
67. Franklin N.M., Rogers N.J., Apte S.C. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility // *Environmental Science and Technology*. 2007. V. 41. № 24. P. 8484-8490.
68. Fytianos G.; Rahdar A.; Kyzas G.Z. Nanomaterials in cosmetics: recent updates // *Nanomaterials*. 2020. V. 10, 979.
69. Gallo A., Manfra L., Boni R., Rotini A., Migliore L., Tosti E. Cytotoxicity and genotoxicity of CuO nanoparticles in sea urchin spermatozoa through oxidative stress // *Environment International*. 2018. V. 118. P. 325-333
70. Gallo A, Boni R, Buttino I, Tosti E. Spermioxicity of nickel nanoparticles in the marine invertebrate *Ciona intestinalis* (ascidians) // *Nanotoxicology*. 2016. V. 10(8). P. 1096-1104.

71. Galloway T., Lewis C., Dolciotti I., Johnston B.D., Moger J., Regoli F. Sublethal toxicity of nanotitanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete // *Environmental Pollution*. 2010. V. 158. P. 1748-1755.
72. Gambardella C, Aluigi MG, Ferrando S, Gallus L, Ramoino P, Gatti AM, Rottigni M, Falugi C. Developmental abnormalities and changes in cholinesterase activity in sea urchin embryos and larvae from sperm exposed to engineered nanoparticles // *Aquatic Toxicology*. 2013. V. 130-131. P. 77-85.
73. Gambardella C, Ferrando S, Morgana S, Gallus L, Ramoino P, Ravera S, Bramini M, Diaspro A, Faimali M, Falugi C. Exposure of *Paracentrotus lividus* male gametes to engineered nanoparticles affects skeletal bio-mineralization processes and larval plasticity // *Aquatic Toxicology*. 2015a. V. 158. P.181-91.
74. Gambardella C., Ferrando S., Gatti A.M., Cataldi E., Ramoino P., Aluigi M.G., Faimali M., Diaspro A., Falugi C. Review: Morphofunctional and biochemical markers of stress in sea urchin life stages exposed to engineered nanoparticles // *Environmental Toxicology*. 2015b. V. 31(11). P.1552-1562.
75. Gambardella C., Morgana S., Bari G.D., Ramoino P., Bramini M., Diaspro A., Falugi C., Faimali M. Multidisciplinary screening of toxicity induced by silica nanoparticles during sea urchin development // *Chemosphere*. 2015b. V. 139. P. 486-95.
76. Garnett M. C., Kallinteri P. Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles // *Occupational Medicine*. 2006. V. 56. P. 307-311.
77. Giese B.; Klaessig F.; Park B.; Kaegi R.; Steinfeldt M.; Wigger H.; von Gleich A.; Gottschalk F. Risks, release and concentrations of engineered nanomaterial in the environment // *Scientific Reports*. 2018. V. 8, 1565.
78. Geiser M., Rothen-Rutishauser B., Kapp N., Schürch S., Kreyling W., Schulz H., Semmler M., Hof V. I., Heyder J., Gehr P. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells // *Environmental Health Perspectives*. 2005. V. 113. P. 1555-1560.
79. Giannetto A., Cappello T., Oliva S., Parrino V., De Marco G., Fasulo S., Mauceri A., Maisano M. Copper oxide nanoparticles induce the transcriptional

modulation of oxidative stress-related genes in *Arbacia lixula* embryos // *Aquatic Toxicology*. 2018. V. 201. P. 187-197.

80. Girardello F., Custódio Leite C., Vianna Villela I., da Silva Machado M., Luiz Mendes Juchem A., Roesch-Ely M., Neves Fernandes A., Salvador M., Antonio Pêgas Henriques J. Titanium dioxide nanoparticles induce genotoxicity but not mutagenicity in golden mussel *Limnoperna fortune* // *Aquatic Toxicology*. 2016. V. 170. P. 223-228.

81. Gomes T., Araujo O., Pereira R., Almeida A. C., Cravo A., Bebianno M. J. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis* // *Marine Environmental Research*. 2013. V. 84. P. 51-59.

82. Gomes T., Pereira C.G., Cardos C., Pinheiro J.P. Cancio I. Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* // *Aquatic Toxicology*. 2012. V. 118-119. P. 72-79.

83. Gondikas A.P., von der Kammer F., Reed R.B., Wagner S., Ranville J.F., Hofmann T. Release of TiO₂ nanoparticles from sunscreens into surface waters: a one-year survey at the old Danube recreational Lake // *Environmental Science and Technology*. 2014. V. 48(10). P. 5415-22.

84. Gottschalk F., Sun T.Y., Nowack B. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies // *Environmental Pollution*. Vol 181. 2013. P. 287-300.

85. Greenberg M.I., Waksman J., Curtis J. Silicosis: A Review // *Disease-a-Month*. 2007. V. 53. P. 394-416.

86. Han Y., Shi W., Rong J., Zha S., Guan X., Sun H., Liu G. Exposure to Waterborne nTiO₂ Reduces Fertilization Success and Increases Polyspermy in a Bivalve Mollusc: A Threat to Population Recruitment // *Environmental Science and Technology*. 2019. V. 53(21). P. 12754-12763.

87. Hanna S., Miller R., Zhou D., Keller A., Lenihan H. Accumulation and toxicity of metal oxide nanoparticles in a soft-sediment estuarine amphipod // *Aquatic Toxicology*. 2013. V. 15. P. 142-143.

88. Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V., Tice R.R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay // *Mutagenesis*. 2003. V.18. P.45-51.
89. Hayashi M., Kuge T., Endoh D., Nakayama, K., Arikawa, J., Takazawa, A., and Okui, T. Hepatic copper accumulation induces DNA strand breaks in the liver cells of Long-Evans Cinnamon strain rats // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000. V. 276. P. 174-178.
90. Haynes V.N., Ward J.E., Russell B.J., Agrios A.G. Photocatalytic effects of titanium dioxide nanoparticles on aquatic organisms – Current knowledge and suggestions for future research // *Aquatic toxicology*. 2017. V. 185. P. 138-148.
91. Hiebert T.C., Butler B., Shanks F.L, Rudy P. Oregon Estuarine Invertebrates: Rudy's Illustrated Guide to Common Species. 3rd ed. Charleston, Oregon: University of Oregon Libraries, Oregon Institute of Marine Biology. 2017. V. 1-3. P. 869.
92. Hou J., Wang X., Hayat T., Wang X. Ecotoxicological effects and mechanism of CuO nanoparticles to individual organisms // *Environmental Pollution*. 2017. V. 221. P. 209-217.
93. Hu H.; Li Q.; Jiang L.; Zou Y.; Duan J.; Sun Z. Genome-wide transcriptional analysis of silica nanoparticle-induced toxicity in zebrafish embryos // *Toxicological Research*. 2016. V. 5. P. 609-620.
94. Hu W, Culloty S, Darmody G, Lynch S, Davenport J, Ramirez-Garcia S, Dawson KA, Lynch I, Blasco J, Sheehan D. Toxicity of copper oxide nanoparticles in the blue mussel, *Mytilus edulis*: a redox proteomic investigation // *Chemosphere*. 2014. V.108. P. 289-99.
95. Huang X., Liu Z., Xie Z., Dupont S., Huang W., Wu F., Kong H., Liu L., Sui Y., Lin D., Lu W., Hu M., Wang Y. Oxidative stress induced by titanium dioxide nanoparticles increases under seawater acidification in the thick shell mussel *Mytilus coruscus* // *Marine Environmental Research*. 2018. V. 137. P. 49-59.

96. Huerta-García E.; Márquez-Ramírez S.G., Ramos-Godinez M.P.; López-Saavedra A.; Herrera L.A.; Parra A.; Alfaro-Moreno E.; Gómez E.O., López-Marure R. Internalization of titanium dioxide nanoparticles by glial cells is given at short times and is mainly mediated by actin reorganization-dependent endocytosis // *Neurotoxicology*. 2015. V. 51. P. 27-37.
97. Isani G., Falcioni M. L., Barucca G., Sekar D., Andreani G., Carpena E., Falcioni G. Comparative toxicity of CuO nanoparticles and CuSO₄ in rainbow trout // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2013. V. 97. P. 40-46.
98. Jugan M.L., Barillet S., Simon-Deckers A., Herlin-Boime N., Sauvaigo S., Douki T., Carriere M. Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells // *Nanotoxicology*. 2012. V. 6. P. 501-513.
99. Kaegi R., Ulrich A., Sinnet B., Vonbank R., Wichser A., Zuleeg S., Simmler H., Brunner S., Vonmont H., Burkhardt M., Boller M. Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment // *Environmental Pollution*. 2008. V. 156. P. 233-239.
100. Kanold J.M., Wang J., Brümmer F., Šiller L. Metallic nickel nanoparticles and their effect on the embryonic development of the sea urchin *Paracentrotus lividus* // *Environmental Pollution*. 2016. V. 212. P. 224-229.
101. Kazama, M.; Hino, A. Sea urchin spermatozoa generate at least two reactive oxygen species; the type of reactive oxygen species changes under different conditions // *Molecular Reproduction and Development*. 2012. V. 79. P. 283-295.
102. Keller A. A., McFerran S., Lazareva A., Suh S. Global life cycle releases of engineered nanomaterials // *Journal of Nanoparticle Research*. 2013. V. 15. P. 1-17.
103. Kobayashi N., Okamura H. Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. 1. Tracing the cause by the effects // *Chemosphere*. 2004. V. 55. P. 1403-1412
104. Kreuter J. Nanoparticles – a historical perspective // *International journal of pharmaceutics*. 2007. V. 331. P. 1-10.

105. Kukla S.P., Slobodskova V.V., Chelomin, V.P. The genotoxicity of copper oxide nanoparticles to marine organisms based on the example of the Pacific mussel *Mytilus trossulus gould, 1850 (Bivalvia: Mytilidae)* // Russian Journal of Marine Biology. 2017. V. 43. P. 171-175.
106. Kukla S., Slobodskova V., Mazur A., Chelomin V., Kamenev Y. Genotoxic Testing of Titanium Dioxide Nanoparticles in Far Eastern Mussels, *Mytilus Trossulus* // Pollution. 2021. V. 7. P. 129-140.
107. Lacaze E., Geffard O., Goyet D., Bony S., Devaux A. Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay // Environmental Research. 2011. V. 111. P. 626-634.
108. Lah B., Zinko B., Narat M., Marinsek-Logar R. Monitoring of Genotoxicity in Drinking Water Using in vitro Comet Assay and Ames Test // Food technology and biotechnology. 2005. V. 43. Pp 139-146.
109. Lewis C., Galloway T.S. Genotoxic damage in Polychaetes: A study of species and cell-type sensitivities // Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2008. V. 654. P. 69-75.
110. Ma T., Gong S., Tian B. Effects of sediment-associated CuO nanoparticles on Cu bioaccumulation and oxidative stress responses in freshwater snail *Bellamya aeruginosa* // Science of The Total Environment. 2017. V. 580. P. 797-804.
111. Madhav M.R., David S.E.M., Kumar R.S.S., Swathy J.S., Bhuvaneshwari M., Mukherjee A., Chandrasekaran N. Toxicity and accumulation of Copper oxide (CuO) nanoparticles in different life stages of *Artemia salina* // Environmental Toxicology and Pharmacology. 2017. V. 52. P. 227-238.
112. Magesky A., Ribeiro C.A., Pelletier É. Physiological effects and cellular responses of metamorphic larvae and juveniles of sea urchin exposed to ionic and nanoparticulate silver // Aquatic Toxicology. 2016. V. 174. P. 208-27.

113. Magdolenova Z., Collins A., Kumar A., Dhawan A., Stone V., Dusinka M. Mechanisms of genotoxicity. A review of *in vitro* and *in vivo* studies with engineered nanoparticles // *Nanotoxicology*. 2014. V. 8. P. 233-278.
114. Manke A., Wang L., Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity // *BioMed Research International*. 2013. P. 1 -15.
115. Manzo S, Miglietta ML, Rametta G, Buono S, Di Francia G. Embryotoxicity and spermiotoxicity of nanosized ZnO for Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus* // *Journal of Hazardous Materials*. 2013. V. 254-255. P. 1-9.
116. Manzo S., Schiavo S., Oliviero M., Toscano A., Ciaravolo M., Cirino P. Immune and reproductive system impairment in adult sea urchin exposed to nanosized ZnO via food // *Science of The Total Environment*. 2017. V. 599-600. P. 9-13.
117. Markus A.A., Krystek P., Tromp P.C., Parsons J.R., Roex E. W.M., Voogt, P., Laane R. W.P.M. Determination of metal-based nanoparticles in the river Dommel in the Netherlands via ultrafiltration, HR-ICP-MS and SEM // *The Science of the total environment*. 2018. V. 631-632. P. 485-495.
118. Marisa I., Matozzo V., Martucci A., Franceschinis E., Brianese N., Marin M.G. Bioaccumulation and effects of titanium dioxide nanoparticles and bulk in the clam *Ruditapes philippinarum* // *Marine Environmental Research*. 2018. V. 136. P. 179-189.
119. Marnett, L. J. Oxyradicals and DNA damage // *Carcinogenesis*. 2000. V. 21: P. 361-370.
120. Maser E., Schulz M., Sauer U.G., Wiemann M., Ma-Hock L., Wohlleben W., Hartwig A., Landsiedel R. In vitro and in vivo genotoxicity investigations of differently sized amorphous SiO₂ nanomaterials // *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2015. V. 794. P. 57-74.
121. Matouke M.M., Mustapha M. Bioaccumulation and physiological effects of copepods sp. (*Eucyclop sp.*) fed *Chlorella ellipsoides* exposed to titanium

dioxide (TiO₂) nanoparticles and lead (Pb²⁺) // *Aquatic Toxicology*. 2018. V. 198. P.30-39.

122. Mazur A.A., Zhuravel E.V., Slobodskova V.V., Mazur M.A., Kukla S.P., Chelomin V.P. Waterborne Exposure of Adult Sand Dollar, *Scaphechinus Mirabilis* (Agassiz, 1864), to Zinc Ions and Zinc Oxide Nanoparticles Affects Early Development of its Offspring // *Water, Air and Soil Pollution*. 2020. Vol 231. P. 1-9.

123. McCarthy M.P., Carroll D.L., Ringwood A. H. Tissue specific responses of oysters, *Crassostrea virginica*, to silver nanoparticles // *Aquatic Toxicology*. 2013. V. 138-139. P. 123-128.

124. Merk O., Speit G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity // *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 1999 V. 33. P. 167-172.

125. Midander K., Cronholm P., Karlsson H.L., Elihn K., Möller L., Leygraf C., Wallinder I.O. Surface characteristics, copper release, and toxicity of nano- and micrometer-sized copper and copper(II) oxide particles: a cross-disciplinary study // *Small*. 2009. V. 5(3). P. 389-99.

126. Miller R.J., Bennett S., Keller A.A., Pease S., Lenihan H.S. TiO₂ nanoparticles are phototoxic to marine phytoplankton // *PLoS One*. 2012. V. 7, e30321.

127. Minetto D., Ghirardini A.V., Libralato G. Saltwater ecotoxicology of Ag, Au, CuO, TiO₂, ZnO and C60 engineered nanoparticles: An overview // *Environment International*. 2016. V. 92-93. P. 189-201.

128. Mitchelmore C.L., Birmelin C., Livingstone D.R., Chipman J.K. Detection of DNA strand breaks in isolated mussels (*Mytilus edulis*) digestive gland cells using the «Comet» assay // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1998. V. 41. P. 51-58.

129. Montes M., Hanna S., Lenihan H., Keller A. Uptake, accumulation, and biotransformation of metal oxide nanoparticles by a marine suspension-feeder // *Hazard Materials*. 2012. V. 30. P. 225-226.

130. Moore M.N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? // *Environment International*. 2006. V. 32(8). P. 967-976.
131. Mueller N., Nowack B. Exposure Modeling of Engineered Nanoparticles in the Environment // *Environmental Science and Technology*. 2008. V. 42. P. 4447-4453.
132. Mwaanga P., Carraway E.R., van den Hurk P. The induction of biochemical changes in *Daphnia magna* by CuO and ZnO nanoparticles // *Aquatic Toxicology*. 2014. V. 150. P. 201-209.
133. Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes // *Particle and Fibre Toxicology*. 2011. V. 8, 1.
134. Nel A., Xia T., Madler L., Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel // *Science*. 2006. V. 311. P. 622-627.
135. Nemmar A., Yuvaraju P., Beegam S., Yasin J., Kazzam E.E., Ali B.H. Oxidative stress, inflammation, and DNA damage in multiple organs of mice acutely exposed to amorphous silica nanoparticles // *International Journal of Nanomedicine*. 2016. V. 11. P. 919-928.
136. Navarro E., Piccapietra F., Wagner B., Marconi F., Kaegi R., Odzak, Sigg N. L., Behra R. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii* // *Environmental Science and Technology*. 2008. V. 42. P. 8959-8964.
137. Nowack B., Bucheli T.D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment // *Environmental pollution*. 2007. Vol. 150. P. 5-22.
138. Nowack B., Krug H. F., Height M. 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers // *Environmental Science and Technology*. 2011. V. 45. P. 1177-1183.

139. Oberdorster G, Ferin J, Finkelstein J, Wade P, Corson N. Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles? II. Lung lavage studies // *Journal of Aerosol Science*. 1990. V. 21. P.384-387.
140. Oberdorster G., Oberdorste, E., Oberdorster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles // *Environmental Health Perspectives* 2005. V. 113. P. 823-839.
141. Oberdorster G., Stone V., Donaldson K. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective // *Nanotoxicology*. 2007. V. 1. P. 2-25.
142. Oliviero M., Schiavo S., Dumontet S., Manzo S. DNA damages and offspring quality in sea urchin *Paracentrotus lividus* sperms exposed to ZnO nanoparticles // *Science of The Total Environment*. 2019. V. 651. P. 756-765.
143. Pérez-Cerezales S., Martínez-Páramo S., Beirão J., Herráez M.P. Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant // *Theriogenology*. 2010. V. 74. P. 282-289.
144. Piccinno F., Gottschalk F., Seeger S., Nowak B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world// *Journal of Nanoparticle Research*. 2012. V. 14. P. 1-11.
145. Pikula K., Chaika V., Zakharenko A., Savelyeva A., Kirsanova I., Anisimova A., Golokhvast K. Toxicity of carbon, silicon, and metal-based nanoparticles to the hemocytes of three marine bivalves // *Animals*. 2020. V. 10, 827.
146. Pham D.H., Roo B.D., Nguyen X.B., Vervaele M., Kecskés A., Ny A., Copmans D., Vriens H., Locquet J.P., Hoet P. de Witte P.A.M. Use of zebrafish larvae as a multi-endpoint platform to characterize the toxicity profile of silica nanoparticles // *Scientific Reports*. 2016. V. 6, 37145.
147. Reeves J.F., Davies S.J., Dodd N.J., Jha A.N. Hydroxyl radicals (*OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells // *Mutation Research*. 2008. V. 640. P. 113-122.

148. Rim K.T., Song S.W., Kim H.Y. Oxidative DNA damage from nanoparticle exposure and its application to workers' health: a literature review // Safety and Health at Work. 2013. V. 4. P. 177-186.
149. Praetorius A., Gundlach-Graham E., Goldberg W., Fabienke J., Navratilova A., Gondikas R., Kaegi D., Günther T. Hofmann and F. von der Kammer, Single-particle multi-element fingerprinting (spMEF) using inductively-coupled plasma time-of-flight mass spectrometry (ICP-TOFMS) to identify engineered nanoparticles against the elevated natural background in soils // Environmental Science: Nano. 2017. V. 4. P. 307-314.
150. Rocco L., Santonastaso M., Nigro M., Mottola F., Costagliola D., Bernardeschi M., Guidi P., Lucchesi P., Scarcelli V., Corsi I., Stingo V., Frenzilli G. Genomic and chromosomal damage in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*: Effects of the combined exposure to titanium dioxide nanoparticles and cadmium chloride // Marine Environmental Research. 2015. V. 111. P. 144-148.
151. Robichaud C.O., Uyar A. E., Darbym R., Zucker L.G., Wiesner M.R. Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO₂ production as a basis for exposure assessment // Environmental science & technology. 2009. V. 43. P. 4227-4233.
152. Salianni M., Jalal R., Goharshadi E.K. mechanism of oxidative stress involved in the toxicity of ZnO nanoparticles against eukaryotic cells // Nanomedicine Journal. V. 3. P. 1-13
153. Santamaria A. Historical overview of nanotechnology and nanotoxicology // Methods in molecular biology. Clifton, N.J. 2012 P. 926.
154. Santos R., Palos-Ladeiro M., Besnard A., Porcher J.M., Bony S., Sanchez W., Devaux A. Relationship between DNA damage in sperm after ex vivo exposure and abnormal embryo development in the progeny of the three-spined stickleback // Reproductive Toxicology. 2013. V. 36. P. 6-11
155. Sawicki K., Czajka M., Matysiak-Kucharek M., Fal B., Drop B., Meczynska-Wielgosz S., Sikorska K., Kruszewski M., Kapka-Skrzypczak L.

Toxicity of metallic nanoparticles in the central nervous system // Nanotechnology. Rev. 2019. V. 8. P. 175-200.

156. Scherzad A., Meyer T., Kleinsasser N., Hackenberg S. Molecular mechanisms of zinc oxide nanoparticle-induced genotoxicity short running title: genotoxicity of ZnO NPs // Materials. 2017. V. 10. P. 1 -19.

157. Semisch A., Ohle J., Witt B., Hartwig A. Cytotoxicity and genotoxicity of nano- and microparticulate copper oxide: Role of solubility and intracellular bioavailability // Particle and Fibre Toxicology. 2014. V. 11. P. 10-16.

158. Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells // Experimental Cell Research. 1988. Vol. 175. P. 184-191.

159. Singh N., Manshian B., Jenkins G.J.S., Griffiths S.M., Williams P.M., Maffeis T.G.G., Wright C. J., Doak S. H. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials // Biomaterials. 2009. V. 30. P. 3891-3914.

160. Shah S.N.A., Shah Z., Hussain M.I., Khan M. Hazardous Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles in Ecosystem // Bioinorganic Chemistry and Applications. 2017. P. 1 -12.

161. Shaw B.J., Handy R.D. Physiological effects of nanoparticles in fish: a comparison of nanometals versus metal ions // Environment International. 2011. V. 37, 1083-1097.

162. Siddiqui S., Goddard R.H., Bielmyer-Fraser G.K. Comparative effects of dissolved copper and copper oxidenanoparticle exposure to the sea anemone, *Exaiptasia pallida* // Aquatic Toxicology. 2015. V. 160. P. 205-213.

163. Song M.F., Li Y.S., Kasai H., Kawai K. Metal nanoparticle-induced micronuclei and oxidative DNA damage in mice // Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. 2012. V. 50. P. 211-216.

164. Souza I.C., Mendes V.A.S., Duarte I.D., Rocha L.D., Azevedo V.C., Matsumoto S.T., Elliott M., Wunderlin D.A., Monferrán M.V., Fernandes M.N. Nanoparticle transport and sequestration: Intracellular titanium dioxide

nanoparticles in a neotropical fish // Science of The Total Environment. 2019. V. 658. P. 798-808.

165. Sruthi S., Ashtami J., Mohanan P.V. Biomedical application and hidden toxicity of Zinc oxide nanoparticles // Mater. Today Chem. 2018. V. 10. P. 175-186.

166. Suh W.H., Suslick K.S., Stucky G.D., Suh Y.H. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience // Progress in Neurobiology. 2009. V. 87. P. 133-170.

167. Sun T.Y., Bornhoft N.A., Hungerbühler K., Nowack B. Dynamic probabilistic modeling of environmental emissions of engineered nanomaterials // Environmental Science and Technology. 2016. V. 50. P. 4701-4711.

168. Sun T.Y., Gottschalk F., Hungerbühler K., Nowack B. Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials // Environmental pollution. 2014. V. 2014. P. 69-76.

169. Sureda A., Capó X., Busquets-Cortés C. and Tejada S. Acute exposure to sunscreen containing titanium induces an adaptive response and oxidative stress in *Mytilus galloprovincialis* // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2018. V. 149. P. 58-63.

170. Tacconi S., Augello S., Persano F., Sbarigia C., Carata E., Leporatti S., Fidaleo M., Dini L. Amino-functionalized Mesoporous silica nanoparticles (NH₂-MSiNPs) impair the embryonic development of the sea urchin *Paracentrotus lividus* // Environmental Toxicology and Pharmacology. 2022. V. 95, 103956.

171. Tang Y., Xin H., Yang S., Guo M., Malkoske T., Yin D., Xia S. Environmental risks of ZnO nanoparticle exposure on *Microcystis aeruginosa*: Toxic effects and environmental feedback // Aquatic Toxicology. 2018. V. 204. P. 19-26.

172. Tellis M.S., Lauer M.M., Nadella S., Bianchini A., Wood C. Sublethal mechanisms of Pb and Zn toxicity to the purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) during early development // Aquatic Toxicology. 2013. V. 146. P. 220-229.

173. Tian S., Zhang Y., Song C., Zhu X., Xing B. Titanium dioxide nanoparticles as carrier facilitate bioaccumulation of phenanthrene in marine bivalve, ark shell (*Scapharca subcrenata*) // Environmental Pollution. 2014. V. 192. P. 59-64
174. Torres-Duarte C., Adeleye A.S., Pokhrel S., Mädler L., Keller A.A., Cherr G.N. Developmental effects of two different copper oxide nanomaterials in sea urchin (*Lytechinus pictus*) embryos // Nanotoxicology. 2016. V. 10(6). P. 671-679.
175. Torres-Duarte C., Ramos-Torres K.M., Rahimoff R., Cherr G.N. Stage specific effects of soluble copper and copper oxide nanoparticles during sea urchin embryo development and their relation to intracellular copper uptake // Aquatic Toxicology. 2017. V. 189. P. 134-141.
176. Vance M.E., Kuiken T., Vejerano E.P., McGinnis S.P., Hochella M.F., Rejeski D., Hull M.S. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory // Beilstein Journal of Nanotechnology. 2015. V. 6. P. 1769-1780.
177. Vevers W.F., Jha A.N. Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on fish cells *in vitro* // Ecotoxicology. 2008. V. 17. P. 410-420.
178. Vignardi C.P., Hasue F.M., Sartório P.V., Cardoso C.M., Machado A.S., Passos M.J., Santos T.C., Nucci J.M., Hewer T.L., Watanabe I.S., Gomes V., Phan N.V. Genotoxicity, potential cytotoxicity and cell uptake of titanium dioxide nanoparticles in the marine fish *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766) // Aquatic Toxicology. 2015. V. 158. P. 218-229.
179. Vandghanooni S., Eskandani M. Comet Assay: A Method to Evaluate Genotoxicity of Nano-Drug Delivery System // BioImpacts. 2011. V. 1. P. 87-97.
180. Wang Z., Xia B., Chen B., Sun X., Zhu L., Zhao J., Du P., Xing B. Trophic transfer of TiO₂ nanoparticles from marine microalga (*Nitzschia closterium*) to scallop (*Chlamys farreri*) and related toxicity // Environmental Science: Nano. 2017. V. 4. P. 415-424.

181. Ward J.E., Kach D.J. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves // *Marine Environmental Research*. 2009. V. 68. P. 137-142.
182. Wu B., Torres-Duarte C., Cole B.J., Cherr G.N. Copper oxide and zinc oxide nanomaterials act as inhibitors of multidrug resistance transport in sea urchin embryos: their role as chemosensitizers // *Environmental Science and Technology*. 2015. V. 49(9). P. 5760-70.
183. Xia B., Zhu L., Han Q., Sun X., Chen B. and Qu K. Effects of TiO₂ nanoparticles at predicted environmental relevant concentration on the marine scallop *Chlamys farreri*: An integrated biomarker approach // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2017. V. 50. P. 128-135.
184. Xiong D., Fang T., Yu L., Sima X., Zhu W. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage // *Science of the Total environment*. 2011. V. 409. P. 1444-1452.
185. Yang S.; Ye R.; Han B.; Wei C.; Yang X. Ecotoxicological effect of nano-silicon dioxide particles on *Daphnia magna* // *Integrated Ferroelectrics*. 2014. V. 154. P. 64-72.
186. Yuan S.; Wei Y.; Wang X.; Liu S.; Zhang H.; Yuan S. Mechanistic study of the adsorption and penetration of modified SiO₂ nanoparticles on cellular membrane // *Chemosphere*. 2022. V. 294, 133793.
187. Zhao X., Wang S., Wu Y., You H., Lv L. Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish // *Aquatic Toxicology*. 2013. V. 136-137. P. 49-59.
188. Zhang L., Pornpattananangkul D., Hu C.M.J., Huang C.M. Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery // *Current Medicinal Chemistry*. 2010. V. 17. P. 585-594.
189. Zhu X., Zhou J. and Cai Z. The toxicity and oxidative stress of TiO₂ nanoparticles in marine abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) // *Marine Pollution Bulletin*. 2011. V. 63. P. 334-338.

190. Zhu X., Zhu L., Duan Z. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage // Journal of Environmental Science and Health, Part A. Toxic/hazardous substances and environmental engineering. 2008. V. 43(3). P. 278-284.