

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

На правах рукописи



МАЗУР АНДРЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПОЛИЭТИЛЕНА И
ПОЛИСТИРОЛА НА ОТДЕЛЬНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ МОРСКИХ
БЕСПОЗВОНОЧНЫХ**

1.5.15. Экология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ростов-на-Дону – 2023

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

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

Официальные оппоненты: **Ковалев Николай Николаевич**,
доктор биологических наук,
федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Дальневосточный государственный технический
рыбохозяйственный университет» (ФГБОУ ВО
«Дальрыбвтуз»), центр инновационных технологий,
ведущий научный сотрудник
Скуратовская Екатерина Николаевна,
кандидат биологических наук,
федеральный исследовательский центр «Институт
биологии южных морей имени А. О. Ковалевского
РАН» (ФИЦ ИнБЮМ), отдел ихтиологии,
заместитель директора по научной работе, ведущий
научный сотрудник

Защита диссертации состоится **22 ноября 2023** года в **16.00** на заседании
диссертационного совета ЮФУ801.01.01 по биологическим наукам на базе Академии
биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета
по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1, к. 712.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке им Ю.А.
Жданова Южного федерального университета по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону,
ул. Р. Зорге, 21 Ж и на сайте Южного федерального университета
<https://hub.sfedu.ru/diss/show/1319199/>.

Автореферат разослан «__»_____2023 г.

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

Ученый секретарь
диссертационного совета

Тимошенко Алёна Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Научное сообщество осознало проблему загрязнения биосферы пластиком в полной мере относительно недавно несмотря на то, что корнями она уходит в 50-е годы прошлого столетия. Тогда же было дано и определение понятию «пластик», объединяющее разнородные группы синтетических органических полимеров (Thompson et al., 2009; Wagner et al., 2014). Масштабное и повсеместное использование полимерных изделий привело к резкому скачку их производства. По оценкам исследователей, за последние 50 лет производство пластика увеличилось в 600 раз. (Hamlin et al., 2015). Большая часть синтезируемого пластика — это устойчивые к распаду в окружающей среде соединения. В структуре промышленного производства данных материалов доминируют одноразовые изделия и изделия с ограниченным сроком использования. Например, в странах Евросоюза на долю упаковочного сектора приходится около 40% всего произведенного пластика. По оценкам экологов, ежегодно в мировой торговой сети только пластиковых пакетов используется от 500 до 1000 млрд, что составляет около 150 штук/год на каждого жителя планеты (Lithner et al., 2011).

В то же время резкое увеличение производства полимерных изделий стало причиной экспоненциального роста пластмассовых отходов, которые загрязняют большинство экосистем нашей планеты. На данный момент огромное количество пластиковых отходов сконцентрировано на многочисленных мусорных полигонах, откуда разносятся ветром и различными водотоками, попадая в воды Мирового океана. Так, по самым скромным подсчетам, на данный момент в Мировом океане находится около 5,25 трлн пластиковых фрагментов (Camargo et al., 2009; Dris et al., 2016). Однако, в начале нынешнего столетия ученые обнаружили более масштабную и серьезную экологическую проблему, связанную с поступлением полимерных отходов в окружающую среду. Было обнаружено, что под действием факторов окружающей среды крупные полимерные изделия со временем разрушаются, образуя микроразмерные частицы пластика. Особенно быстро процесс разрушения пластика до микроскопических размеров происходит в морской среде, где синтетические фрагменты постоянно подвергаются воздействию солнечного света и волновой активности. В результате ряда химических преобразований крупные фрагменты полимерного морского мусора становятся более хрупкими и распадаются на мелкие частицы, для обозначения которых Томпсон с коллегами (Thompson et al., 2009) предложили использовать определение «микропластик». Такие частицы способны концентрироваться на поверхности морей и океанов и со временем, в зависимости от различных факторов среды и изменения плавучести, оседать, распределяясь в толще воды, и постепенно достигая донных отложений.

Также, в последние годы особое внимание со стороны исследователей уделяется способности полимеров адсорбировать и насыщаться разнообразными стойкими и высокотоксичными химическими веществами, среди которых обнаруживаются не только гидрофобные ксенобиотики (ПХБ, ПАУ, пестициды и др.), но и ряд тяжелых металлов (Lithner et al., 2011; Chua et al., 2014; Napper et al., 2015). Считается, что соотношение сорбционно-десорбционных свойств полимеров по отношению к различным химическим соединениям в зависимости от характеристик среды лежит в основе их распространения и переноса из различных источников загрязнений в прибрежные и открытые воды океана (Mato et al., 2001; Teuten et al., 2009). Загрязнение прибрежно-морской зоны пластиком является глобальной экологической проблемой (UNEP, 2016).

Частицы микропластика могут попадать внутрь планктонных и бентосных морских организмов, что приводит не только к механическому повреждению слизистых тканей и засорению желудочно-кишечного тракта, но и к серьезным нарушениям физиологических процессов (Hernandez et al., 2017; Fahrenfeld et al., 2019). Однако биологическая активность данных частиц до сих пор остается невыясненной.

Цель работы: оценить влияние фрагментов полиэтилена и микросфер полистирола на отдельных представителей морских беспозвоночных с помощью биомаркеров.

Для выполнения цели работы были поставлены следующие **задачи:**

1) выявить изменение биохимических показателей в тканях тихоокеанской мидии *Mytilus trossulus* в присутствии фрагментов полиэтилена.

2) на основе метода ДНК-комет исследовать генотоксические свойства микросфер полистирола при воздействии на гаметы плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis*.

3) оценить влияние микросфер полистирола на повреждение ДНК клеток жабр и пищеварительной железы мидий *M. trossulus*.

4) с помощью биомаркеров изучить влияние микросфер полистирола на мидию *M. trossulus* в присутствии наночастиц оксида меди.

Научная новизна. В настоящем исследовании впервые проведена оценка токсического влияния двух видов полимерных частиц на тихоокеанскую мидию *M. trossulus* с использованием методов определения параметров окислительного стресса на уровне клетки. В жабрах и пищеварительной железе моллюсков обнаружены изменения стабильности мембран лизосом и интегральной антиоксидантной активности, определен уровень малонового диальдегида, глутатиона и карбониллов белков, а также исследована степень повреждения ДНК клеток анализируемых тканей.

Получены принципиально новые данные об уровне повреждения генома сперматозоидов плоского морского ежа *S. mirabilis*, подвергшихся воздействию микроразмерных частиц полистирола в различных концентрациях. Изучено и проанализировано влияние микропластика на процесс оплодотворения и раннее развитие плоского морского ежа *S. mirabilis*.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты проведенного исследования расширяют представление о биологической активности полимерных частиц инертных в химическом отношении. Полученные данные вносят вклад в процесс изучения ответа гидробионтов на воздействие микросфер полистирола как на клеточном, так и на организменном уровне. Представленные в данной работе модели могут быть использованы для оценки токсичности других видов микропластика. Результаты этой работы могут быть использованы для учебных программ биологических специальностей по таким дисциплинам как «Общая экология», «Биоиндикация и биотестирование», «Экотоксикология».

Основные положения, выносимые на защиту:

1) Фрагменты полиэтилена вызывают у двустворчатого моллюска *M. trossulus* усиление процессов окислительного стресса, выраженное в снижении интегральной антиоксидантной активности и увеличении фрагментации ДНК клеток жабр и пищеварительной железы.

2) Микросферы полистирола проявляют генотоксические свойства, инициируя деструкцию ядерной ДНК сперматозоидов плоского морского ежа *S. mirabilis* и клеток пищеварительной железы мидии *M. trossulus*.

3) При воздействии микросфер полистирола в присутствии наночастиц оксида меди у мидии *M. trossulus* происходит усиление токсического эффекта, что проявляется в снижении стабильности мембран лизосом и увеличении концентрации окисленных форм белков в пищеварительной железе.

Степень достоверности результатов. В процессе реализации данной работы использовались современные методы исследования, достаточный объем анализируемых данных, подкрепленный статистическим анализом с использованием специализированных программных пакетов. В дополнение к этому представление полученных в ходе исследования результатов в рецензируемых научных изданиях подтверждает их достоверность. Экспериментальная часть работы выполнена в полном соответствии с протоколами и методиками.

Апробация работы и публикации. Результаты научной работы были представлены на всероссийских и международных конференциях: VIII конференция молодых учёных «Океанологические исследования» 6–9 июня, 2018 г, Владивосток; Всероссийская научная конференция с международным участием, посвященная 20-летию Международной кафедры ЮНЕСКО «Морская экология» ДВФУ «Прибрежно-морская зона Дальнего Востока: от освоения к

устойчивому развитию» 8–10 ноября, 2018, Владивосток; Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2020» 10–27 ноября, 2020, Москва; IX конференция молодых учёных «Океанологические исследования» 29–30 апреля, 2021, Владивосток; Всероссийская конференция "Морская биология в 21 веке: систематика, генетика, экология морских организмов" 20–23 сентября, 2022, Владивосток.

По теме диссертации опубликовано 8 работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science, Scopus и рекомендуемых ВАК России для опубликования научных результатов.

Данное исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19–35-90015.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, выводов, списка сокращений и обозначений, списка литературы (257, в том числе 14 отечественных и 243 зарубежных источников). Работа изложена на 145 страницах, содержит 20 рисунков и 7 таблиц.

Личный вклад автора состоит в поиске, обобщении и анализе литературных данных о физико-химических свойствах микропластиковых частиц и их токсическом воздействии на морских беспозвоночных. Автор работы принимал непосредственное участие в постановке цели и задач исследования, а также в процессе планирования и проведения экспериментальных работ. Статистическая обработка полученных данных и интерпретация результатов выполнена автором самостоятельно в полном объеме. Кроме того, диссертант принимал участие в подготовке публикаций и докладов по теме исследования.

Соответствие паспорту специальности. Диссертационная работа 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».

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность и признательность за постоянную помощь, внимание и поддержку при выполнении работы научному руководителю д.б.н., профессору Челомину Виктору Павловичу, а также коллегам лаборатории 5/1 «Морская экотоксикология» ТОИ ДВО РАН. Особую признательность автор выражает к.б.н., доценту Международной кафедры ЮНЕСКО «Морская экология» Института мирового океана ДВФУ Журавель Елене Владимировне за всестороннюю помощь и поддержку на всех этапах работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В данной главе обобщена информация, полученная из современных отечественных и зарубежных источников литературы, по видам и объемам производимого в мире пластика, накоплению и деградации пластиковых отходов в Мировом океане, влиянии разноразмерных частиц пластика на жизнедеятельности гидробионтов.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В качестве объектов в данном исследовании были использованы эмбрионы и личинки плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis* Agassiz, 1864, а также половозрелые особи мидии тихоокеанской *Mytilus trossulus* Gould, 1850.

Морские ежи, в частности их гаметы и эмбрионы, используются в современной экотоксикологии для тестирования токсичности различных видов загрязнения. В период нереста гаметы морского ежа выделяются непосредственно в морскую воду, и подвергаются воздействию широкого спектра химических веществ.

Моллюски-фильтраторы, в частности двустворчатые моллюски, также широко используются как биоиндикаторы загрязнения. В процессе питания, профильтровывая большие объемы воды, они наряду с пищевыми частицами, неизбежно извлекают, концентрируют и длительное время удерживают частицы антропогенного происхождения, в то числе и микрочастицы пластика.

2.2. Материалы и методы исследования

Для проведения серии лабораторных экспериментов с *S. mirabilis*, половозрелых особей отбирали в заливе Восток (зал. Петра Великого, Японское море). После акклиматизации гидробионтов для получения яйцеклеток и сперматозоидов проводили стимулирование нереста, вводя в перивисцеральную полость 0,2 мл 0,5 М раствора KCl. По классической методике (Бузников, Подмарев, 1975) подготавливали яйцеклетки для дальнейших экспериментов, а сперматозоиды получали непосредственно перед каждым тестированием и разбавляли фильтрованной морской водой. Затем сперматозоиды и яйцеклетки помещали в растворы с добавлением микросфер полистирола (Tianjin BaseLine ChromTech Research Centre (Китай), диаметр 0.9 мкм) в концентрациях 10^4 , 10^5 , 10^6 шт/л, а также в профильтрованную и стерилизованную морскую воду для

контроля. Влияние микропластика оценивали визуально с помощью микроскопа Axio Imager A1 (Carl Zeiss) по количеству аномалий на стадиях образования оболочки оплодотворения (30 ч), бластулы (8 ч), гаструлы (18 ч) и среднего плутеуса I стадии (48 ч) (Kobayashi, 1984). Кроме того, в сперматозоидах, яйцеклетках и личинках была проведена оценка степени повреждения ДНК.

Взрослые особи *M. trossulus* были отобраны в б. Воевода (Амурский залив, Японское море). В работе по оценке воздействия фрагментов полиэтилена на взрослых особей мидии моллюски в течение 72 ч. содержались в аквариумах ($V = 50$ л каждый) в присутствии 2-х видов фрагментов полиэтилена (ПЭ), а именно, не побывавшие в использовании фрагменты ПЭ («чистые» фрагменты) и фрагменты ПЭ, выловленные в толще воды бухты Золотой Рог (зал. Петра Великого, Японское море), где концентрация отдельных загрязняющих веществ в воде (Качество..., 2016; Зубцова и др., 2018; Пелех, Абрамова, 2020) превышает ПДК в десятки раз («грязные» фрагменты). В экспериментальных аквариумах общая площадь пластиковых фрагментов составила $50 \text{ см}^2/\text{л}$, как рекомендовано в работе Li et al., 2016. Атомно-абсорбционный метод (Julshamn, Andersen, 1983) использовали для определения качественного и количественного содержания тяжелых металлов в жабрах и пищеварительной железе моллюсков. Также в жабрах и пищеварительной железе моллюсков были определены такие биомаркеры как содержание низкомолекулярного антиоксиданта глутатиона (GSH) и интегральная антиоксидантная активность (ИАА), а также определена степень повреждения ДНК.

Для эксперимента по оценке комбинированного воздействия микросфер полистирола (ПС) и наночастиц оксида меди были подготовлены 4 аквариума ($V = 50$ л каждый), в которых в течение 5 суток проводилось экспонирование мидий. В первом из аквариумов содержалась экспериментальная группа, во второй аквариум добавляли микросферы полистирола в концентрации 10^5 шт/л, в третий – 20 мкг/л раствора наноформы оксида меди (Sigma-Aldrich, размер частиц $<50 \text{ нм.}$), в четвертый вносили и микросферы полистирола и наночастицы оксида меди. В жабрах и пищеварительной железе моллюсков были определены такие биомаркеры как стабильность мембран лизосом (СМЛ), интегральная антиоксидантная активность (ИАА), содержание малонового диальдегида (МДА), карбонильные группы белков, а также оценено повреждение ДНК.

Для оценки *стабильности мембран лизосом (СМЛ)* применяли цитохимический метод (Martínez-Gomez et al., 2015). Для этого с помощью медицинского шприца из переднего мускула-аддуктора каждой мидии ($n=10$) собирали гемолимфу объемом $0,1 \text{ мл}$ и добавляли в шприц такой же объем фильтрованной морской воды.

Пищеварительную железу и жабры для дальнейшего определения биохимических параметров, после препарирования взрослой особи мидии,

незамедлительно помещали в жидкий азот и хранили при температуре -80°C . Ткани гомогенизировали в охлажденном 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.0 при 4°C . Супернатант получали центрифугированием при 10000 оборотах в течение 40 мин.

Содержание в тканях *низкомолекулярного антиоксиданта глутатиона (GSH)* определяли по методу Морона с соавторами (Moron et al., 1979).

Интегральную антиоксидантную активность (ИАА) антиоксидантов определяли по их способности подавлять реакцию окисления АВТС пероксильными и алкоксильными радикалами, образующимися при термическом разложении АВАР (2, 2'-азобис (2-аминопропан) гидрохлорид) (Bartosz et al., 1998). Величину ИАА рассчитывали, используя построенный по тролоксу градуировочный график при длине волны 414 нм.

Содержание *малонового диальдегида (МДА)* определяли по цветной реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) (Buege, Aust, 1978).

Карбонильные группы белков в пищеварительной железе определяли щелочным методом (Mesquita et al., 2014).

Концентрацию белка определяли модифицированным методом Лоури (Markwell et al., 1978).

Все измерения проводили на спектрофотометрах Shimadzu UV-1650 PC и Shimadzu UV-2550 с термостатированной ячейкой.

Степень повреждения ДНК оценивали с использованием щелочного варианта кометного анализа (Singh et al., 1988), адаптированного для морских организмов (Mitchelmore et al., 1998). Визуализацию и регистрацию ДНК-комет осуществляли с помощью флуоресцентного микроскопа (Zeiss, Axio Imager A1), оснащенного цифровой фотокамерой AxioCam MRc. Для обработки цифровых изображений была использована компьютерная программа V 1.2.2. CASP (<https://casplab.com>). В качестве показателя генотоксического воздействия вычисляли индекс генетического повреждения (ИГП) по формуле $\text{ИГП} = (C1 + 2 * C2 + 3 * C3 + 4 * C4) / (C0 + C1 + C2 + C3 + C4)$ (Cavas, Konec, 2008).

Статистическая обработка. Результаты всех экспериментов обрабатывали с помощью пакетов программ Excel и Statistica: определяли среднее арифметическое и стандартное отклонение. Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа по критерию Краскела-Уоллиса с последующим парным тестом Манна-Уитни.

ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ ФРАГМЕНТОВ ПОЛИЭТИЛЕНА НА ТИХООКЕАНСКУЮ МИДИЮ

В эксперименте по оценке воздействия фрагментов полиэтилена на взрослых особей *M. trossulus* в тканях моллюсков обеих экспериментальных групп были обнаружены биохимические изменения, свидетельствующие о развитии окислительного стресса.

У экспериментальной группы мидий в присутствии «чистого» пластика в клетках жабр и пищеварительной железы интегральный показатель антиоксидантной активности снизился в 1,5 и 1,3 раза, соответственно, а в присутствии «грязных» фрагментов ПЭ – в 1,7 и 2,5 раза, соответственно (рис. 1А). Уровень низкомолекулярного антиоксиданта глутатиона у всех исследуемых моллюсков достоверно не отличался от контрольных значений. (рис. 1Б).

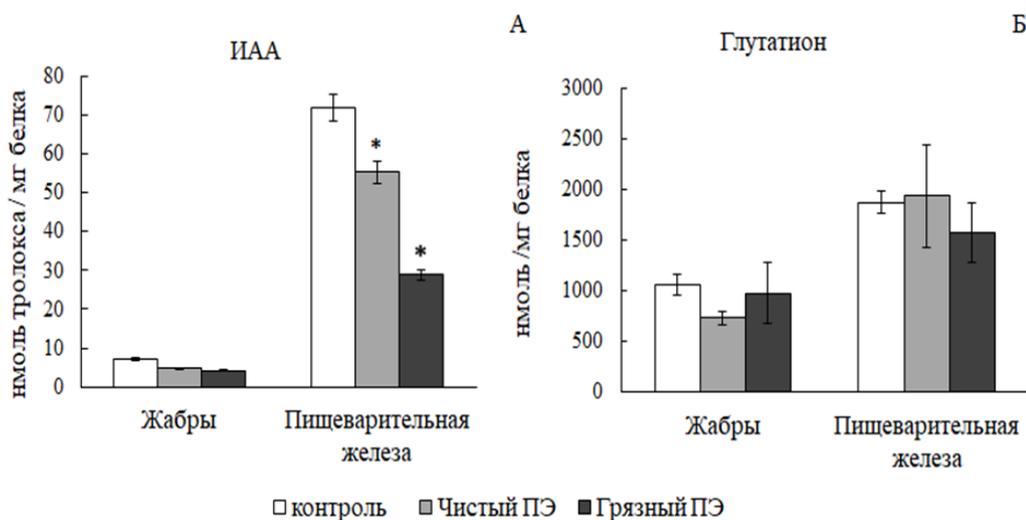


Рисунок 1 – Изменение молекулярных биомаркеров в присутствии фрагментов ПЭ (А - индекс антиоксидантной активности, нмоль тролокса / мг белка; Б – восстановленный глутатион, нмоль / мг белка; (среднее \pm станд. откл., $n=15$). * - отличие от контроля достоверно ($p<0.05$).

Снижение защитного антиоксидантного потенциала у мидий обеих экспериментальных групп привело к резкому развитию проокислительных процессов в тканях, что подтверждается усилением окислительной деструкции молекул ДНК. В клетках жабр и пищеварительной железы мидий, содержащихся в присутствии «чистых» фрагментов ПЭ, степень повреждения ДНК увеличилась, по сравнению с контрольными моллюсками, практически, в 2 и 1,5 раза, соответственно. У экспериментальных моллюсков в присутствии фрагментов ПЭ из бух. Золотой Рог этот показатель был еще более выражен и вырос в 2,5 и 4 раза, соответственно (таб. 1).

Таблица 1 – Уровень повреждения ДНК в клетках жабр и пищеварительной железы мидий в экспериментальных условиях (среднее \pm стандартное отклонение, n = 15 * – достоверное отличие (p<0.05))

	% ДНК в «хвосте»		ИГП	
	Жабры	Пищеварительная железа	Жабры	Пищеварительная железа
Контроль	2,59* \pm 0,48	3,35* \pm 0,67	0,18	0,27
Чистый ПЭ	5,21* \pm 0,61	5,39* \pm 0,33	0,40	0,41
Грязный ПЭ	10,79* \pm 1,17	8,62* \pm 0,81	0,79	0,59

Анализ распределения ДНК комет по классам показал снижение количества комет, относящихся к классу С₀, для которого характерны неповрежденные жизнеспособные клетки в жабрах мидий, находящихся в воде в присутствии как «чистых» фрагментов ПЭ так и загрязненных. В то же время заметно увеличение процента комет классов С₁ и С₂ для которых характерно умеренное повреждение ДНК клеток, что в свою очередь указывает на проявление генотоксичных свойств (рис. 2).

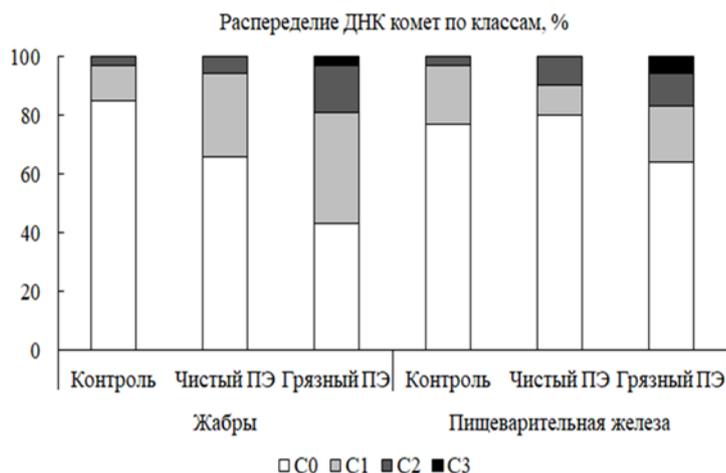


Рисунок 2 – Соотношение классов ДНК комет в соответствии со степенью повреждения

В тканях экспериментальных мидий был определен микроэлементный состав (таб. 2) Выявленные сдвиги в концентрациях большинства микроэлементов носили недостоверный характер. Исключение составил цинк (Zn), концентрация которого достоверно увеличилась в жабрах мидий из аквариумов с «чистыми» фрагментами пластика. Кроме того, достоверное уменьшение концентрации кадмия (Cd), свинца (Pb) и марганца (Mn) отмечено в жабрах и пищеварительной железе у экспериментальных моллюсков.

Учитывая характер проведенных модельных экспериментов (относительно большие фрагменты ПЭ и организмы-фильтраторы), есть все основания полагать, что ведущим фактором, определяющим биохимические сдвиги у экспериментальных мидий, стал химический фактор. В первом случае не побывавшие в применении

фрагменты ПЭ являются источником исключительно эндогенных химических веществ, использующихся при синтезе этого полимера, а во втором, фрагменты ПЭ, выловленные из воды бух. Золотой Рог, несут широкий спектр химических соединений, загрязняющих данную акваторию.

Таблица 2 – Изменение микроэлементного состава в тканях жабр и пищеварительной железы *M. trossulus* под воздействием фрагментов пластика (среднее \pm стандартное отклонение, $n = 15$). * – достоверное отличие ($p < 0.05$)

	Жабры			Пищеварительная железа		
	Контроль	Чистый ПЭ	Грязный ПЭ	Контроль	Чистый ПЭ	Грязный ПЭ
	мкг / г сух. массы			мкг / г сух. массы		
Zn	158,6 \pm 5,1	177,2 \pm 7,8*	152,5 \pm 4,4	109,4 \pm 10,9	91,1 \pm 4,9	98,8 \pm 2,9
Fe	109,2 \pm 8,1	93,3 \pm 10,4	110,4 \pm 11,9	155,5 \pm 11,9	140,5 \pm 7,5	154,3 \pm 21,9
Cu	5,7 \pm 0,6	5,3 \pm 0,3	5,8 \pm 0,5	8,2 \pm 0,4	8,1 \pm 0,1	11,5 \pm 1,2
Cd	0,96 \pm 0,07	0,91 \pm 0,19	0,49 \pm 0,02*	1,68 \pm 0,02	0,91 \pm 0,02*	1,61 \pm 0,05
Pb	1,40 \pm 0,15	0,70 \pm 0,03*	0,96 \pm 0,08*	0,78 \pm 0,05	0,77 \pm 0,02	0,76 \pm 0,18
Mn	18,5 \pm 2,6	17 \pm 0,5	15,2 \pm 0,6*	18,4 \pm 0,2	9,9 \pm 0,5*	10,6 \pm 0,1*

ГЛАВА 4. ТОКСИЧНОСТЬ МИКРОСФЕР ПОЛИСТИРОЛА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА МОРСКИХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

В последнее время морские экосистемы и населяющие их организмы подвержены не только влиянию естественных факторов, но и испытывают серьезное антропогенное воздействие, связанное с различными отходами хозяйственной деятельности человека. При этом одной из самых распространённых групп таких отходов является пластиковый мусор.

Проникая внутрь организмов, фрагменты пластика приводят к многочисленным серьезным повреждениям токсического характера, включая такие, как блокада секреции пищеварительных ферментов, снижение уровней стероидных гормонов, нарушения в иммунной системе, овуляции и репродуктивной функции, замедление роста и развития, изменения в пищевом поведении.

4.1. Спермиотоксичность и эмбриотоксичность микросфер при воздействии на гаметы плоского морского ежа

Эксперимент по оценке влияния микросфер полистирола на процесс оплодотворения не показал значительного воздействия как на подвижность сперматозоидов морского ежа, так и на сам процесс оплодотворения. Процент нормально сформированных зигот, развившихся после экспозиции половых продуктов в воде с добавлением исследуемых концентраций полистирола, (10^4 ,

10^5 и 10^6 микросфер в 1 л), достоверно не отличался от контрольных значений ни в одном из случаев (рис. 3).

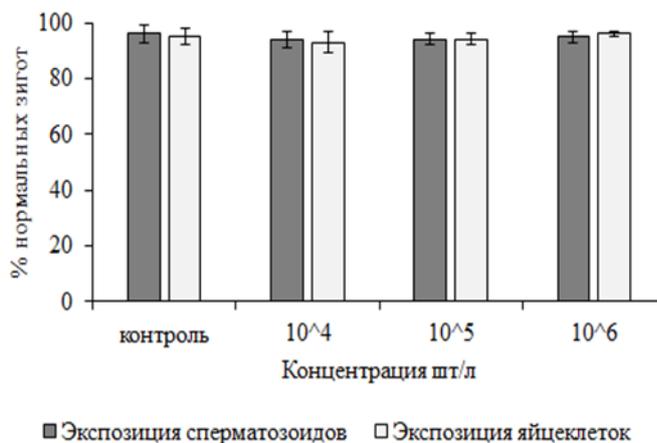


Рисунок 3 – Влияние микропластика на гаметы плоского морского ежа *S. mirabilis* (среднее \pm станд. откл, n=100) * -- отличие от контроля достоверно при $p < 0.05$

Зиготы морского ежа, которые развивались в воде с добавлением исследуемых концентраций микропластика на стадии бластулы достоверно не отличались от контрольных значений (рис. 4). Процент аномально развивающихся эмбрионов составил 18–20%. На стадии гастрюляции было отмечено ингибирование развития, процент нормально развивающихся личинок достоверно снизился до 85% в тестируемой воде с добавлением 10^4 и 10^5 первичных микросфер полистирола на литр по сравнению с контрольными значениями (95% нормально развивающихся эмбрионов). Важно отметить, что дальнейшее развитие личинок до стадии среднего плутеуса происходило без значительных отклонений от контроля.

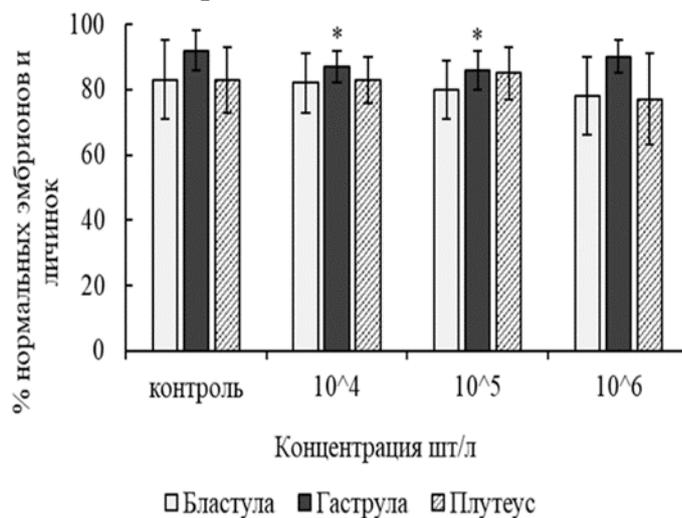


Рисунок 4 – Влияние микропластика на эмбрионы плоского морского ежа *S. mirabilis* (среднее \pm станд. откл, n=100) * – отличие от контроля достоверно при $p < 0.05$

4.2. Генотоксичность микросфер полистирола при воздействии на гаметы плоского морского ежа

При кратковременном воздействии исследуемых концентраций микропластика на яйцеклетки морского ежа не было обнаружено достоверного отличия процента поврежденной ДНК в сравнении с контрольными значениями. Однако, обнаружены статистически значимые отличия от контрольных показателей доли поврежденной ДНК сперматозоидов при экспозиции в воде с добавлением всех исследуемых концентраций микросфер полистирола. Наибольший процент повреждения ДНК (более 20%) выявлен в сперматозоидах, находящихся в течение 1 часа в воде, содержащей 10^5 микросфер пластика в 1 л. Значения ИГП в сперматозоидах превосходили уровень контроля. При концентрации 10^5 частиц микропластика в 1 л значение ИГП в сперматозоидах достигло значения 1.43, что указывает на выраженное генотоксическое воздействие исследуемого токсиканта (таб. 3).

Таблица 3 – Оценка повреждения ДНК (среднее \pm станд. откл., n=16; n=800) * – достоверное отличие (p<0.05)

Концентрация, шт/л	% ДНК в хвосте		ИГП	
	Спермии	Яйцеклетки	Спермии	Яйцеклетки
Контроль	10.89 \pm 0.72	5.51 \pm 0.57	0.88	0.47
10^4	14.06* \pm 1.03	4.86 \pm 0.62	1.06	0.34
10^5	20.17* \pm 0.81	4.15 \pm 0.49	1.43	0.28
10^6	19.11* \pm 0.90	5.17 \pm 0.51	1.26	0.37

Учитывая классификацию повреждения ДНК, предложенную Коллинзом с коллегами (Collins et al., 2013), сперматозоиды особей из контрольной группы формировали кометы, относящиеся к классам C₀ и C₁ и характерные для неповрежденных и малоповрежденных жизнеспособных клеток. При воздействии микропластика на сперматозоиды было выявлено увеличение числа комет 2 класса, которые характеризуются средним повреждением и появление комет 3 класса с высоким уровнем повреждения (рис. 5).

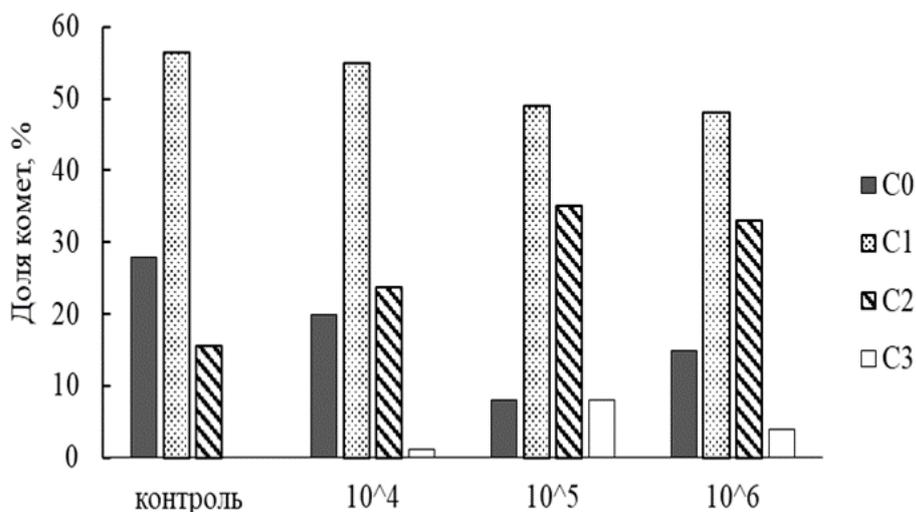


Рисунок 5 – Распределение ДНК комет сперматозоидов по классам

В экспериментах с мужскими гаметамии *S. mirabilis* % ДНК в «хвосте» комет существенно возрастал в зависимости от концентрации полимерных микрочастиц, что свидетельствует о повреждении целостности генома в спермиях. В контроле наибольшее количество клеток имели диапазон повреждения от 6 до 18%, при этом максимальное содержание ДНК в хвосте кометы (21–24%) наблюдалось только у 5% клеток. При кратковременном воздействии микросферами полистирола около трети от общего количества сперматозоидов имели повреждения в ДНК в диапазоне от 21 до 33%. Кроме того, около 10% клеток, формировали кометы с повреждением выше 40%, что характерно для существенного генотоксического воздействия (рис. 6).

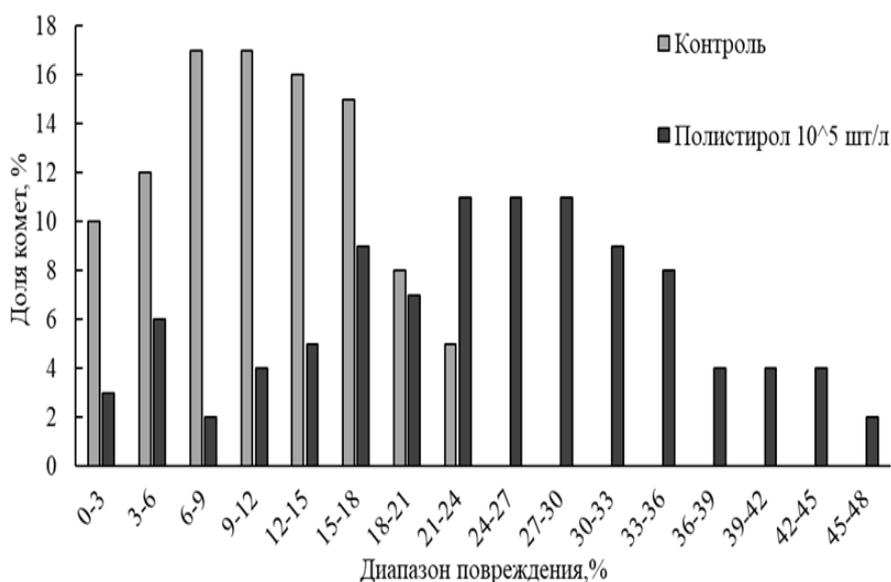


Рисунок 6 – Распределение комет сперматозоидов с интервалом 3%

Морские ежи имеют внешнее размножение и в период нереста их гаметы выделяются непосредственно в морскую воду и напрямую подвергаются воздействию широкого спектра факторов, включая частицы микропластика, присутствующих в окружающей среде (Lithner et al., 2011; Hamlin et al., 2015). Наши эксперименты имитировали условия окружающей среды с точки зрения взаимодействия микрочастиц пластика и гамет морского ежа, но проводились в контролируемых лабораторных условиях, где сведены к минимуму воздействия других сопутствующих стрессовых факторов, характерных для морской среды.

Отличительной особенностью полученных результатов является тот факт, что мы обнаружили повреждение целостности ядерной ДНК именно половых клеток, что указывает на наличие у микрочастиц полистирола генотоксических свойств. При равных условиях воздействия микрочастиц ПС на мужские и женские гаметы морского ежа геном спермиев оказался более чувствителен. По всей вероятности, столь существенные различия в реакции гамет морского ежа на воздействие микрочастиц ПС обусловлены не только особенностями физиолого-биохимических систем и эффективностью систем защиты, но и различиями в механизмах поддержания стабильности генома. Хорошо известно, что сперматозоиды в отличие от соматических клеток или ооцитов потенциально более восприимчивы к повреждению при загрязнении окружающей среды веществами, обладающими генотоксическими свойствами, поскольку считается, что сперматозоиды обладают ограниченной способностью к репарации ДНК и антиоксидантной защите (Lewis, Galloway, 2008; Lacaze et al., 2011).

Из результатов экспериментов следует, что, независимо от уровня повреждения ДНК, спермии сохраняли способность оплодотворять яйцеклетки с эффективностью до 97% (рис. 3). На основании полученных данных можно предположить, что уровень биохимических сдвигов, индуцированных микрочастицами ПС, достаточен, чтобы вызвать повреждения ДНК в спермиях, но недостаточен, чтобы повлиять на их оплодотворяющую способность. Из этого следует, что целостность генома спермиев не является критическим условием оплодотворения, по крайней мере, у этого вида морских ежей.

4.3. Генотоксические свойства микросфер полистирола на примере моллюска *Mytilus trossulus*

На основе метода ДНК-комет с использованием экспериментального подхода выявлено, что микрочастицы ПС, взаимодействуя с пищеварительными тканями двустворчатого моллюска *M. trossulus*, несмотря на химическую инертность, проявляют биологическую активность, выраженную в генотоксических свойствах. У контрольных моллюсков в клетках жабр и пищеварительной железы наблюдается небольшой уровень фрагментации

ядерной ДНК, который образуется в нормальных клетках в процессе функционирования жизнеобеспечивающих систем за счет накопления щелочнолабильных участков разрывов. У мидий, содержащихся в воде с микрочастицами ПС, уровень повреждения ДНК существенно вырос только в клетках пищеварительной железы и практически в 2 раза превысил контрольные значения, что свидетельствует о повреждении целостности генома (рис. 7).

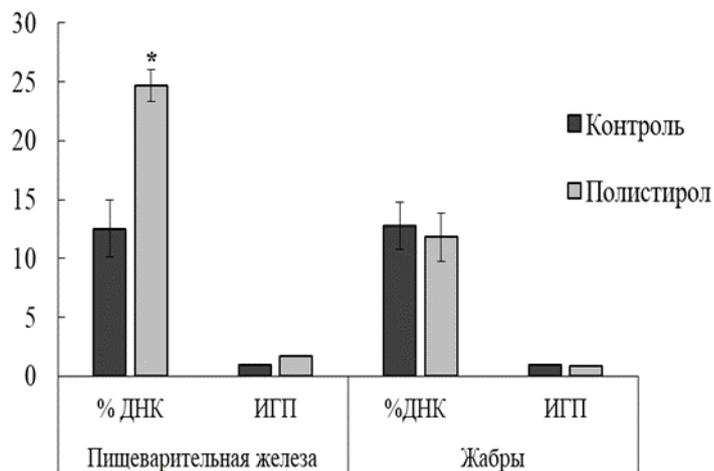


Рисунок 7 – Оценка повреждения ДНК в клетках жабр и пищеварительной железы мидий из контрольной и экспериментальной групп (N = 12; n = 600) * – достоверное отличие ($p < 0.05$)

Анализ распределения комет по классам показал, что у контрольных моллюсков в клетках пищеварительной железы преобладали кометы C_0 (0–5% ДНК в хвосте кометы) и C_1 (5–20%) классов, характерные для неповрежденных и жизнеспособных клеток. Общая сумма комет этих классов ($C_0 + C_1$) составила порядка 88%, тогда как на долю комет с уровнем повреждения ДНК более 20% (C_2 класс) приходилось не более 12%. У экспериментальных мидий в отличие от контрольных в клетках пищеварительной железы резко снизилось содержание неповрежденных клеток (менее 30%), и большая часть комет была представлена классом C_2 (~60%). Кроме того, появлялись кометы с высокой долей повреждения ДНК, относящиеся к классу C_3 (40–75%), доля которых составила около 10% (рис.8).

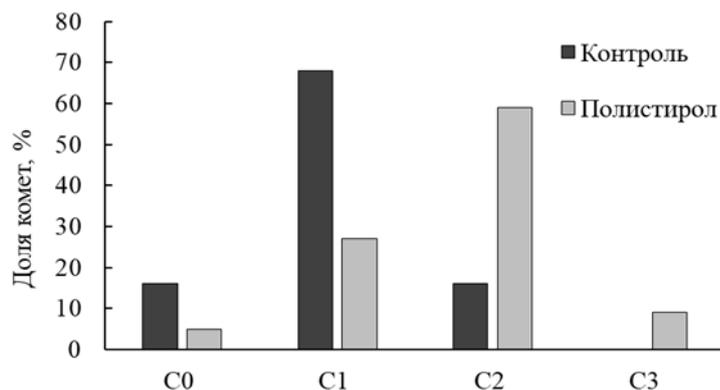


Рисунок 8 – Распределение повреждения ДНК по классам комет в клетках пищеварительной железы мидий из контрольной и экспериментальной групп (N = 12; n = 600)

У контрольных моллюсков наибольшее количество клеток имели диапазон повреждения от 6 до 18%, при этом максимальное содержание ДНК (около 30%) в хвосте кометы наблюдалось только у 5% клеток. После воздействия микрочастиц полистирола около половины клеток пищеварительной железы мидий имели повреждения в ДНК в диапазоне от 25 до 35%. Кроме того, порядка 5% клеток формировали кометы с повреждением около 50%, что характерно для существенного генотоксического воздействия (рис. 9).

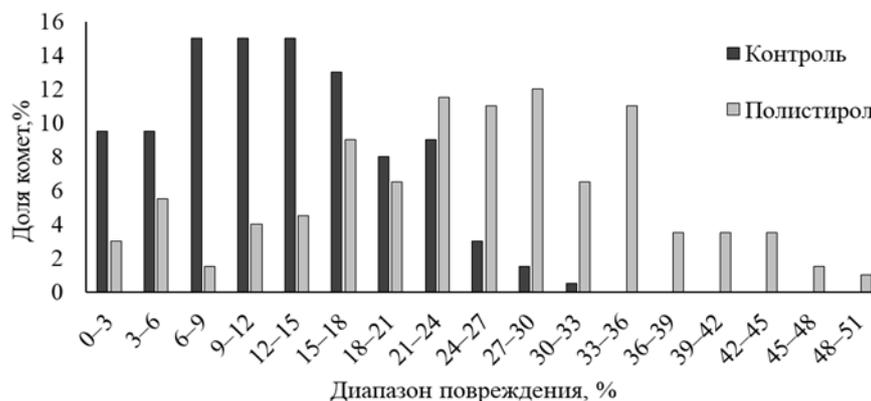


Рисунок 9 – Распределение ДНК-комет при интервале 3% повреждения в клетках пищеварительной железы исследуемых моллюсков (N = 12; n = 600)

В результате проведенных экспериментов была обнаружена деструкция целостности генома, что связано с генотоксическими свойствами микрочастиц ПС при воздействии на ядерную ДНК клеток пищеварительной железы, непосредственно участвующих в аккумуляции микрочастиц пластика. Стоит отметить, что при воздействии микрочастиц ПС на взрослых мидий, клетки пищеварительной железы оказались более чувствительны, чем клетки жабр.

Если к заключительному этапу у экспериментальных мидий в клетках пищеварительной железы уровень повреждения ДНК существенно возростал, практически, в 2 раза, то в клетках жабр достоверных изменений не наблюдалось (рис. 7). По всей вероятности, столь существенные различия в реакции клеток этих двух типов тканей на воздействие микрочастиц ПС обусловлены особенностями физиолого-биохимических систем питания и усвоения разноразмерных частиц, характерных для моллюсков-фильтраторов и мидий, в частности.

Учитывая исключительную роль генома, повреждение ДНК этих клеток может являться началом каскада всей совокупности биохимических сдвигов, приводящих к токсическим последствиям. Полученные результаты позволяют полагать, что клетки пищеварительной железы моллюсков-фильтраторов, способных накапливать микропластик при относительно низких концентрациях этих частиц во внешней среде, могут подвергаться опасности со стороны неуклонно растущего загрязнения морской среды пластиковыми отходами.

ГЛАВА 5. ВОЗДЕЙСТВИЕ МИКРОСФЕР ПОЛИСТИРОЛА И НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА МЕДИ НА ТИХООКЕАНСКУЮ МИДИЮ

В морской среде, особенно в прибрежной части, гидробионты подвергаются воздействию сложных смесей ксенобиотиков, где многие из компонентов взаимодействуя друг с другом, изменяют их биодоступность и токсичность для организма (Santos et al., 2021). Эти взаимодействия в смесях поллютантов могут способствовать либо снижению, либо увеличению токсичности по сравнению с отдельными компонентами. Учитывая физико-химические особенности наночастиц оксидов металлов, в частности наночастиц оксида меди НЧ CuO (склонность к агрегации, низкая растворимость в воде, сорбционная активность) и микросфер полистирола (относительная гидрофобность, сорбционная активность), влияющие на биодоступность, неизбежно возникает комплекс проблем, прогнозировать которые из-за недостатка информации пока не представляется возможным. Анализ немногочисленных экспериментальных работ показывает, что фрагменты микропластика способны сорбировать на своей поверхности наночастицы, тяжелые металлы и органические поллютанты, оказывая влияние на их токсичность (Gonzalez-Soto et al., 2019; Santos et al., 2021).

Исходя из вышесказанного, особую актуальность представляет изучение воздействия относительно стабильных в морской воде наночастиц и микропластика на двустворчатых моллюсков *M. trossulus*, способных

накапливать такие частицы в своих тканях. Благодаря этому свойству мидии являются уникальной моделью, позволяющей изучить воздействие ксенобиотиков органического и неорганического происхождения.

5.1. Стабильность мембран лизосом

В ходе проведенного анализа были получены данные о влиянии исследуемых частиц на стабильность мембран лизосом тихоокеанской мидии. Так, у особей контрольной группы время удержания красителя у 50% клеток препарата составило $77,1 \pm 8,6$ минут. У мидий, находящихся в воде, содержащей 10^5 микросфер полистирола на литр, исследуемый показатель снизился до 65 ± 9 . Достоверные отличия от контрольных значений наблюдалось в экспериментальных группах, подвергшихся воздействию наночастиц оксида меди и при сочетанном воздействии исследуемых токсикантов. При этом, у мидий, экспонирующихся при внесении в воду и наночастиц и микропластика значение СМЛ составило 42 ± 4 минуты, что указывает на патологическое состояние особей (рис. 10).

Полученные данные свидетельствуют о том, что как микроразмерные частицы полистирола, так и наночастицы оксида меди способны проникать в гемолимфу мидии и оказывать токсическое влияние на тканевый и клеточный уровень. При этом наблюдается увеличение токсического воздействия при сочетанном влиянии этих материалов.

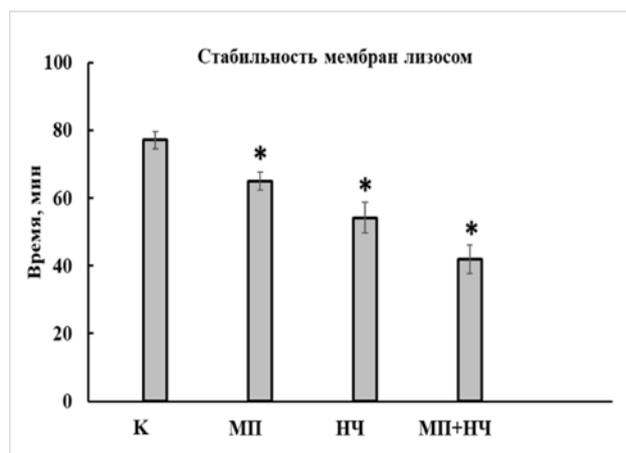


Рисунок 10 – Изменение стабильности мембран лизосом *M. trossulus* при воздействии микросфер полистирола (МП) и наночастиц оксида меди (НЧ) (среднее ± станд.откл., n=20) * – отличие от контроля достоверно при $p < 0.05$

5.2. Интегральная антиоксидантная активность

В результате эксперимента было установлено, что у всех исследованных моллюсков уровень ИАА в клетках пищеварительной железы был выше, чем в жабрах. Отмечено, что в клетках жабр двустворчатых моллюсков уровень ИАА при воздействии исследуемых частиц достоверно не изменился. Однако, в клетках пищеварительной железы, особей, подвергшихся воздействию микросферами полистирола показатель ИАА достоверно снизился с 22,9 до 19,6 единиц тролокса / мг белка. При воздействии наночастиц оксида меди интегральная антиоксидантная активность уменьшилась в 2,2 раза, такое изменение данного биомаркера свидетельствует о снижении активности низкомолекулярного звена антиоксидантной системы и выраженном токсическом воздействии с развитием окислительного стресса в организме. При совместном воздействии исследуемых частиц уровень ИАА также существенно снизился (рис. 11).

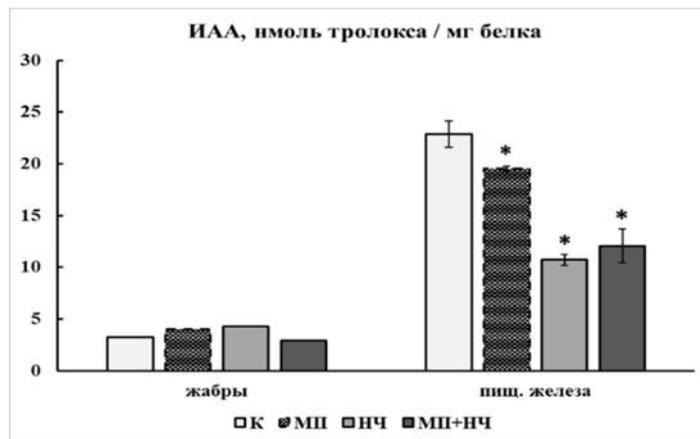


Рисунок 11 – Уровни интегральной антиоксидантной активности в тканях *M. trossulus* при воздействии микросфер полистирола (МП) и наночастиц оксида меди (НЧ) (среднее \pm станд. откл, n=15). * –отличие от контроля достоверно при $p < 0.05$

5.3. Уровень продуктов перекисного окисления липидов

При анализе уровня малонового диальдегида в тканях тихоокеанской мидии было установлено, что концентрация данного продукта распада ПОЛ больше в пищеварительной железе, нежели в жабрах. Содержание МДА в жабрах двустворчатых моллюсков в результате воздействия анализируемых частиц достоверно не отличалось от контрольных значений. В тканях пищеварительной железы при воздействии наночастиц оксида меди был отмечен наибольший уровень МДА (89,7 нмоль/г сыр.веса), который в значительной степени отличался как от контроля (38,9 нмоль/г сыр. веса), так и от значений, полученных в результате оценки влияния микропластика (47 нмоль/г сыр. веса), а также смеси полистирольных микросфер и наноразмерных частиц оксида меди

(40 нмоль/г сыр. веса). Данный факт может свидетельствовать о том, что моллюски, подверженные воздействию нанодисперсных частиц, находились в состоянии выраженного окислительного стресса.

5.4. Карбонилы белков

В ходе нашего исследования было установлено, что в исследуемых тканях мидий, подвергшихся воздействию только микросфер полистирола, концентрация окисленных форм белков достоверно не отличалась от контрольных значений. Однако было выявлено токсическое воздействие наночастиц оксида меди на жабры и пищеварительную железу исследуемых моллюсков. Кроме того, стоит отметить тот факт, что в отличие от уровня МДА, концентрация карбониллов белков в пищеварительной железе достоверно увеличилась в 1,5 раза по отношению к контрольным значениям при совместном воздействии частиц (рис.12)

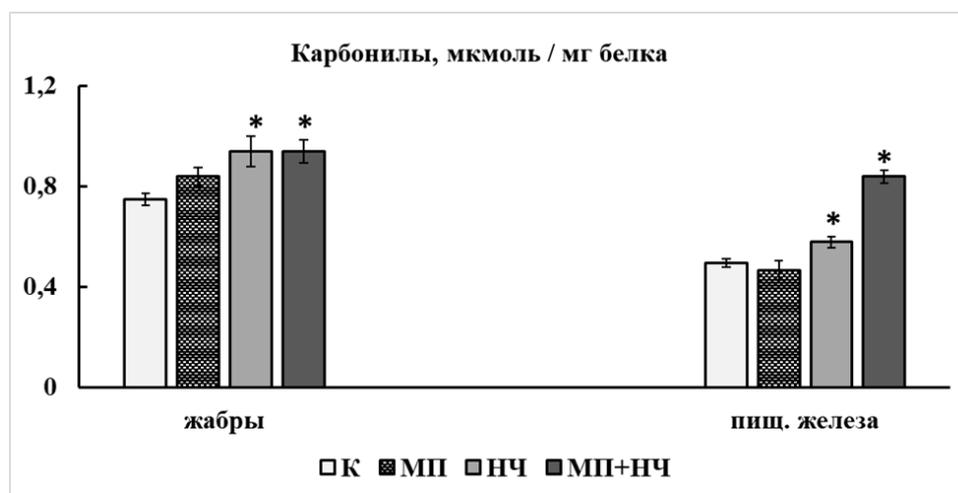


Рисунок 12 – Изменение концентрации карбониллов белков в тканях *M. trossulus* при воздействии микросфер полистирола (МП) и наночастиц оксида меди (НЧ) (среднее \pm станд. откл, n=15). * –отличие от контроля достоверно при $p < 0.05$

5.5. Оценка повреждения ДНК

Повреждение целостности ДНК клеток исследуемых тканей мидий, подвергшихся влиянию наночастиц оксидов меди, значительно увеличилось, при этом доля ДНК, мигрирующей из ядра кометы достигла $12,67 \pm 3,52$ в клетках жабр и $16,24 \pm 2,14$ в клетках пищеварительной железы. Стоит отметить, что в клетках особей, подвергшихся воздействию и частицами микропластика и наночастицами, произошло значительное уменьшение повреждения структуры молекул ДНК относительно значений, полученных при воздействии только наночастиц. Скорее всего, снижение генотоксического эффекта при совместном

воздействии исследуемых токсикантов связано с тем, что микросферы полистирола, сорбируя на своей поверхности нанодисперсный оксид меди, снижали его биодоступность.

ВЫВОДЫ

1. В экспериментальных условиях присутствие в морской среде неиспользованных фрагментов полиэтилена вызывает у двустворчатого моллюска *M. trossulus* снижение интегральной антиоксидантной активности и усиление окислительной деструкции ядерной ДНК клеток жабр и пищеварительной железы.

2. В присутствии в воде фрагментов полиэтилена, извлеченных из загрязненной акватории (б. Золотой Рог, зал. Петра Великого), в клетках исследованных тканей мидий наблюдается существенное усиление процессов окислительного стресса и фрагментации генома (по данным метода ДНК-комет).

3. Установлено, что микросферы полистирола при воздействии на сперматозоиды плоского морского ежа *S. mirabilis* проявляют дозо-зависимые генотоксические свойства (в концентрациях 10^4 , 10^5 и 10^6 частиц/л), что выражается в значительном увеличении повреждений ДНК сперматозоидов. Однако, независимо от уровня повреждения ДНК, спермии сохраняют способность оплодотворять яйцеклетки с эффективностью до 97%.

4. Частицы полистирола индуцируют усиленную фрагментацию ядерной ДНК клеток пищеварительной железы *M. trossulus*. У особой экспериментальной группы 50% клеток пищеварительной железы мидий формировали кометы класса C_2 с повреждением ДНК в диапазоне от 25 до 35%. Доля клеток апоптотического характера с существенными повреждениями ДНК (C_3) составила 8%.

5. Показано, что при совместном воздействии микросфер полистирола и наночастиц оксида меди у экспериментальных моллюсков *M. trossulus* наблюдается синергический эффект в индукции процессов окислительного стресса. Так, при воздействии полистирола и наночастиц по отдельности стабильность мембран лизосом в гемоцитах моллюска снизилась более чем на 15% и 30%, соответственно, тогда как при совместном воздействии этот показатель снизился практически в два раза. В клетках пищеварительной железы опытных групп достоверно снизился уровень интегральной антиоксидантной активности и увеличилась концентрация окисленных форм белков.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Всего по теме диссертации опубликовано 8 научных работ. Ниже представлены основные работы.

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

1. Waterborne Exposure of Adult Sand Dollar, *Scaphechinus mirabilis* (Agassiz, 1864), to Zinc Ions and Zinc Oxide Nanoparticles Affects Early Development of its Offspring / A. A. Mazur, V. V. Slobodskova, S. P. Kukla [et al.] // *Water, Air, and Soil Pollution*. – 2020. – Vol. 231, No. 3. – Art. No 115. – DOI 10.1007/s11270-020-04484-3.
2. Plastics as vehicles of chemical compounds to marine organisms / Dovzhenko N. V., Mazur A. A., Kuklal S. P., Slobodskova V. V., Kolosova L. F., Istomina A. A., Chelomin V. P. // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – 2020. – Vol. 548, No 4. – Art. No 42040. – DOI 10.1088/1755-1315/548/4/042040
3. Genotoxicity of polystyrene (Ps) microspheres in short-term exposure to gametes of the sand dollar *Scaphechinus mirabilis* (agassiz, 1864) (echinodermata, echinoidea) / Mazur A. A., Chelomin V. P., Kukla S. P., Slobodskova V. V., Dovzhenko N. V., Zhuravel E. V. // *Journal of Marine Science and Engineering*. – 2021. – Vol. 9, No. 10. – Art. No 1088. – DOI 10.3390/jmse9101088
4. Genotoxic Properties of Polystyrene (PS) Microspheres in the Filter-Feeder Mollusk *Mytilus trossulus* (Gould, 1850) / Chelomin V. P., Mazur A. A., Slobodskova V. V., Kukla S. P., Dovzhenko N. V. // *Journal of Marine Science and Engineering*. – 2022. – Vol. 10, No. 2. – Art. No 273. – DOI 10.3390/jmse10020273
5. Oxidative Stress in Far Eastern Mussel *Mytilus trossulus* (Gould, 1850) Exposed to Combined Polystyrene Microspheres (μ PSs) and CuO-Nanoparticles (CuO-NPs) / Dovzhenko N. V., Chelomin V. P., Mazur A. A., Kukla S. P., Slobodskova V. V., Istomina A. A., Zhukovskaya A. F. // *Journal of Marine Science and Engineering*. – 2022. – Vol. 10, No. 5. – Art. No 707. – DOI 10.3390/jmse10050707

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

- МП – микропластик
 НЧ – наночастицы
 ПЭ – полиэтилен
 ПС – полистирол
 ПХБ – полихлорированные бифенилы
 ПАУ – полициклические ароматические углеводороды
 СМЛ – стабильность мембран лизосом
 ИАА – интегральная антиоксидантная активность
 МДА – малоновый диальдегид
 КБ – карбонилы белков
 ИГП – индекс генетического повреждения
 АФК – активные формы кислорода