

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Куклы Сергея Петровича на тему «Влияние наночастиц оксидов микроэлементов (CuO, ZnO, TiO₂, SiO₂) на морских беспозвоночных (на примере *Mytilus trossulus* и *Scaphechinus mirabilis*)», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.15. Экология (биологические науки)

Диссертационная работа Куклы Сергея Петровича посвящена одной из актуальных экологических проблем – антропогенному влиянию на водные организмы и экосистемы. Среди антропогенных факторов химическое загрязнение поверхностных морских вод является наиболее экологически значимым с точки зрения его распространенности и масштабности. В последнее время в связи с развитием высоких технологий, наряду с такими, хорошо известными загрязнителями как тяжелые металлы, все большее значение приобретают наночастицы, в частности, оксидов микроэлементов. Однако исследований, посвященных изучению их влияния на водные организмы все еще достаточно мало.

Учитывая изложенное выше, становится очевидной актуальность, востребованность и теоретическая значимость диссертационной работы **Сергея Петровича Куклы**, цель которой – изучить экотоксикологические последствия воздействия наночастиц оксидов микроэлементов (CuO, ZnO, TiO₂, SiO₂) на типичных представителей дальневосточной фауны морских беспозвоночных: мидию тихоокеанскую *Mytilus trossulus* и необыкновенного плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis*.

Для достижения поставленной цели диссертант решает ряд логически связанных и обоснованных задач. При их решении им использованы адекватные современные методы исследования: классическая схема токсикологического лабораторного эксперимента на гидробионтах в условиях *in vivo*, трансмиссионная микроскопия для структурного анализа наночастиц, атомно-

абсорбционная спектрометрия для определения содержания микроэлементов в биологических тканях, эмбриотест для оценки успешности оплодотворения и развития эмбриона, кометный анализ для оценки генотоксичности и спектрофотометрический метод для биохимического определения показателя состояния окислительного стресса – содержания малонового диальдегида (МДА), являющегося продуктом перекисного окисления липидов (ПОЛ) .

Структура работы традиционна для подобного рода исследований. Она состоит из введения, семи глав, выводов, списка сокращений и условных обозначений, а также списка литературы, состоящего из 188 источников, в т. ч. 173 — иностранных. Общий объем рукописи — 112 страниц. Работа включает 5 таблиц и иллюстрирована 23 рисунками.

Во ВВЕДЕНИИ автор обозначает исследуемую проблему, лаконично, но убедительно обосновывает актуальность избранной темы и степень её разработанности, формулирует цель и задачи исследования, научную новизну, практическую значимость, выносимые на защиту положения, указывает личный вклад соискателя в подготовку диссертационной работы, подтверждает ее соответствие паспорту специальности, перечисляет, где и когда проводилась апробация материалов, описывает объём и структуру работы, приводит количество публикаций по теме диссертации, выражает благодарности руководителю и коллегам, помогавшим в выполнении работы.

В главе 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ дается достаточно подробная общая характеристика наночастиц, описывается история изучения токсичности наночастиц на живые организмы и современные представления о взаимодействии наночастиц с живыми организмами, включая роль оксидативного стресса в этом процессе, разбираются особенности кометного анализа, как удобного и надежного теста на генотоксичность наночастиц.

В главе 2. ОПИСАНИЕ ОБЪЕКТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ приводятся данные о систематическом положении, внешнем виде и морфометрических характеристиках, особенностях биологии и экологии, географической распространенности двух исследуемых видов гидробионтов: двусторчатом

моллюске *Mytilus trossulus* (Gould, 1850) и морском еже *Scaphechinus mirabilis* (Agassiz, 1864).

Глава 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ дает описание методов и мест вылова исследуемых гидробионтов и условия адаптации их к лабораторным условиям, основные характеристики используемых наночастиц и ионов микроэлементов, условий проведения экспериментов, описание методов препарирования и подготовки органов и тканей для последующего анализа. Приводятся условия проведения эмбриотеста, ДНК-комет анализа, определения содержания МДА и микроэлементов в органах и тканях, описываются методы статистической обработки данных.

Главы 4-7 посвящены результатам собственных исследований диссертанта. В главе 4. ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА МЕДИ представлены результаты сравнительного исследования хронического воздействия наночастиц CuO и Cu²⁺ на мидию и наночастиц оксида меди на морского ежа. В главе 5. ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЦИНКА описаны результаты сравнительного исследования хронического воздействия наночастиц ZnO и Zn²⁺ на морского ежа и их острого воздействия на его сперму. В главе 6. ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА НА *M. TROSSULUS* даны результаты изучения накопления титана в жабрах и пищеварительной железе мидии. В главе 7. ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ приводятся результаты изучения хронического воздействия наночастиц SiO₂ на мидию и их острое воздействие на сперму морского ежа.

Поскольку все экспериментальные работы выполнены по единой схеме с небольшими различиями и главы написаны в едином ключе, поэтому, чтобы не повторяться, можно сделать по ним следующее общее заключение. Исследуемые наночастицы оксидов микроэлементов (CuO, ZnO, TiO₂, SiO₂) преодолевают мембранные и тканевые барьеры, несмотря на их способность к агрегации и укрупнению общих размеров агрегированных частиц, и способны накапливаться в мягких тканях как мидии и морского ежа, так, видимо, и других морских беспозвоночных. В модельных экспериментах с наночастицами оксидов меди и

цинка выявлены количественные и качественные различия между сублетальными эффектами, вызываемыми в организме наночастицами оксидов микроэлементов и растворёнными формами соответствующих микроэлементов, которые выражаются в разных темпах аккумуляции и интенсивности токсических эффектов. На примере тихоокеанской мидии *M. trossulus* установлено, что при воздействии наночастиц оксидов микроэлементов (CuO , TiO_2 , SiO_2) основными местом их аккумуляции в организме являются клетки пищеварительной железы, а в жабрах их накопление заметно ниже. Обнаружено, что исследуемые наночастицы оксидов микроэлементов (CuO , TiO_2) вызывают окислительный стресс в тканях исследованных животных, о чём свидетельствует рост содержания продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегида), результатом которого являются деструктивные генетические изменения в соматических и половых клетках исследуемых морских беспозвоночных. С помощью метода ДНК-комет установлено, что воздействие наночастиц исследуемых оксидов микроэлементов (CuO , ZnO , TiO_2 , SiO_2) вызывает усиление процессов деструкции генома (ДНК) в клетках жабр и пищеварительной железы мидии *M. trossulus* и сперматозоидах морского ежа *S. mirabilis*.

Таким образом, диссертант убедительно показал, что одним из негативных последствий действия наночастиц оксидов микроэлементов на морских беспозвоночных являются их биоаккумуляция в тканях и вызванные этим генотоксические и эмбриотоксические эффекты, в основе которых лежит образование активных форм кислорода (АФК) в результате развития оксидативного стресса. Об этом свидетельствуют данные о прямой дозозависимой связи увеличения содержания продуктов ПОЛ в тканях гидробионтов и генетических нарушений в ДНК как в половых, так и в соматических клетках, наблюдаемое с повышением концентрации наночастиц в воде.

Исходя из полученных результатов, логично вытекают защищаемые положения, сформулированные диссертантом: 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 индуцировании окислительного стресса и повреждении генома, как в соматических, так в половых клетках.

Полученные результаты безусловно обладают новизной, научной значимостью, имеют практический выход. 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».

В целом, диссертационная работа, выполнена на высоком методическом и теоретическом уровне, логически четко выстроена. Все полученные результаты статистически значимы, наглядно проиллюстрированы и не вызывают сомнений. Цель и задачи, поставленные автором, достигнуты, полностью подтверждены результатами, соответствуют сделанным выводам и отражены в защищаемых положениях. Основные результаты работы получены автором самостоятельно, неоднократно обсуждались научной общественностью на международных и всероссийских конференциях и полностью опубликованы в 17 научных работ, из них 8 статей, опубликованных в изданиях, входящих в базы данных международных индексов научного цитирования Scopus и/или Web of Science.

По существу замечаний к диссертационной работе нет. Однако есть ряд следующих замечаний и вопросов, касающихся, в большинстве своем, описанию методики и оформлению диссертации:

1. В формулировке цели более правильно заменить термин «экотоксикологические» на «токсикологические», поскольку в

диссертации рассматриваются, главным образом, биологические эффекты наночастиц на организменном уровне, а не на уровне популяций и сообществ.

2. Данные, приведенные в таблице 2, и схемы, представленные на рис.1 и 2, являются авторскими или взяты из сторонних источников? Если второе, то необходимо указать источники.
3. В целом, раздел Материалы и методы описан недостаточно детально. В частности, не понятно, эксперименты проводились в проточных условиях или в статических? Если в проточных, то как поддерживалась необходимая концентрация исследуемых веществ?
4. Какие соли микроэлементов использовались в эксперименте для получения водных растворов их ионов?
5. Не указана изоформа диоксида титана, анатаз или рутил.
6. Не описан метод приготовления растворов наночастиц (они плохо растворяются в воде). Или это были суспензии? Как их готовили? Кроме того, в автореферате не указан производитель и источник получения НЧ, хотя в диссертации эта информация есть.
7. Для кислот, используемых для пробоподготовки, не указаны какие кислоты использовались, их нормальность.
8. По таблице 3 в диссертации (таблица 1 в автореферате) два вопроса: 1. Почему только эксперименты с наночастицами представлены в таблице, а ионные формы нет? 2. Почему в экспериментах с мидией для различных НЧ экспозиция разная, а для морского ежа одинаковая?
9. Нет полной информации по использованным приборам (марка, производитель, другие характеристики) и режимам их использования, в частности, для ультразвуковой ванны.
10. Каким образом и на каком оборудовании готовились гомогенаты органов и тканей для биохимического анализа? Для биохимического анализа использовали цельный гомогенат или супернатант?

11. Какой спектрофотометр использовался для анализа содержания малонового диальдегида? Определение проводилось в кюветах или микропланшетах?
12. Какой прибор использовался для электрофореза в комет-анализе?
13. Методика определения макроэлементов описана очень поверхностно (какие кислоты использовались, их основные характеристики, кто производитель, режим ААС, при котором проводилось определение и т.д.) и нет соответствующей ссылки. Откуда были получены сертифицированные образцы тканей моллюсков и их характеристики?
14. В автореферате методика описана еще более скупо, чем в диссертации, и в то же время, много места уделено обсуждению результатов. Можно было бы в существующих рамках объема реферата дать более подробное описание методических вопросов, сократив обсуждение, без ущерба для понимания полученных результатов.
15. Вызывает сожаление заметное количество опечаток, несогласований слов в предложении, повторов одинаковых слов в одном предложении или абзаце, грамматических ошибок, стилистически неудачных фраз, что, вероятно, связано с невнимательностью автора при написании диссертации. Например, на с.4 «...НЧ склонны к постепенной седиментации в морской среде, постепенно накапливаясь в донных осадках», на с.6 «...выражающееся в индицировании окислительного стресса...» вместо «индукции» или «инициировании», там же «...участие в планировании и постановки экспериментов...» вместо «постановке», с.9 «сверх пластичности» вместо «сверхпластичности», с.10 «Когда вулкан извергается столб пепла и газов,... высота его может достигать 18000 метров...» вместо «Когда вулкан извергает столб пепла и газов,... высота которого может достигать 18000 метров..» или «Когда вулкан извергается, высота столба пепла и газов может достигать 18000 метров...», с.14 «В процессе использование косметологических средств...» вместо «В процессе использования косметических

средств...», там же «По прогнозам, основанным на математических моделях поступление НЧ в окружающую среду, концентрации отдельных НЧ достигают нескольких десятком мкг/л в 2020 году» вместо «По прогнозам, основанным на математических моделях поступления НЧ в окружающую среду, концентрации отдельных НЧ в водных объектах к 2020 году могут достичь нескольких десятков мкг/л», с.29 «...энергия рассеется вводе тепла...» вместо «...энергия рассеется в виде тепла ...» и другие.

Однако высказанные замечания, в целом, не умаляют достоинств диссертации и она заслуживает высокой оценки.

Таким образом, диссертация Куклы Сергея Петровича на тему «Влияние наночастиц оксидов микроэлементов (CuO, ZnO, TiO₂, SiO₂) на морских беспозвоночных (на примере *Mytilus trossulus* и *Scaphechinus mirabilis*)» соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней в ЮФУ» (№270-ОД от 29.09.2023 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. А ее автор, Кукла Сергей Петрович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.15. Экология (биологические науки).

Доктор биологических наук,
главный научный сотрудник,
заведующий лабораторией физиологии
и токсикологии водных животных
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина
Российской академии наук (ИБВВ РАН)

Чуйко Григорий Михайлович

Почтовый адрес: 152742, Ярославская обл., Некоузский р-н,
п. Борок, ИБВВ РАН.

Телефон: 8 4854 72 48 16

e-mail: gchuyko@ibiw.ru

сайт: <http://ibiw.ru>

6 ноября 2023 г.

