

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*)»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.15 – экология (биологические науки)

Актуальность темы диссертационного исследования. Стремительное развитие современных технологий сопряжено с попаданием в окружающую среду широкого спектра веществ, являющихся чужеродными для водных и наземных экосистем. Расширение областей применения наночастиц, обладающих многочисленными особенностями, положительно влияющими на свойства и характеристики техногенных макрообъектов, создает предпосылки для загрязнения окружающей среды. Живые организмы не зависимо от уровня биологической организации вынуждены адаптироваться к ксенобиотикам за счет привлечения дополнительных энергетических ресурсов, пластических трансформаций, перестройки биохимических циклов. В этих условиях возможно возникновение различных нарушений и аномалий, затрагивающих наследственный аппарат, формирование тканей и органов в раннем онтогенезе, развитие неоплазий и пр. Кроме того, наночастицы обладают свойствами, отличными от свойств макрочастиц этих же материалов, а значит возможно ожидать от наночастиц токсического эффекта даже в случае если макрочастицы этого вещества токсическими свойствами не обладают.

Работы, поднимающие вопросы токсического воздействия наночастиц на живые организмы в мировой научной литературе постепенно становятся все более и более многочисленными, но, в силу объективных исторических причин эта тема в настоящее время проработана существенно меньше, чем токсикология традиционных макроксенобиотиков. В этой связи, диссертационная работа Куклы Сергея Петровича, направленная на изучение влияния наночастиц оксидов микроэлементов на гидробионтов, несомненно, является актуальной и обладает научной новизной.

Целью диссертационной работы было изучение экотоксикологических последствий воздействия наночастиц оксидов микроэлементов (CuO, ZnO,

TiO₂, SiO₂) на типичных представителей дальневосточной фауны беспозвоночных: мидию тихоокеанскую *Mytilus trossulus* и необыкновенного плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis*.

Диссертантом для достижения цели были поставлены и успешно решены следующие задачи: оценить биодоступность наночастиц оксидов микроэлементов (CuO, ZnO, TiO₂, SiO₂) в сублетальных концентрациях для *Mytilus trossulus* и *Scaphechinus mirabilis*; выявить способность наночастиц оксидов микроэлементов, на примере CuO и TiO₂, индуцировать окислительный стресс в клетках *Mytilus trossulus* и *Scaphechinus mirabilis*; оценить степень повреждения генома в тканевых клетках и гаметах модельных организмов (*Mytilus trossulus* и *Scaphechinus mirabilis*), при воздействии наночастиц оксидов микроэлементов (CuO, ZnO, TiO₂, SiO₂).

В ходе выполнения поставленных задач автором были использованы различные методы исследований, в том числе, биохимические и генотоксикологические, проведена статистическая обработка полученных результатов.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, подтверждается большим объемом экспериментальных данных, корректностью методологии исследований, достоверностью полученных результатов. Сергей Петрович применял в работе информативные методики, что благоприятно отразилось на сделанных выводах, логически вытекающих из результатов проведенного исследования. Материалы исследований, изложенные в диссертации, иллюстрируются большим количеством графического и табличного материала, подтверждающего полученные данные. Выводы четко сформулированы и хорошо аргументированы.

Основные положения диссертации прошли обсуждение на международных и всероссийских конференциях. 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.

Научная новизна и практическая значимость работы.

Впервые на основе биомаркеров представлена сравнительная оценка сублетальных эффектов наноразмерных частиц оксидов металлов (CuO, ZnO, TiO₂) и неметаллов (SiO₂) на дальневосточные морские организмы. Автором последовательно в сравнительном аспекте рассмотрены

токсические эффекты наноразмерных и макрочастиц одних и тех же элементов на наследственный аппарат двустворчатых моллюсков и морских ежей.

Показано, что исследованные наночастицы проявляют биологическую активность, вызывая окислительный стресс и повреждение генома в тканях *Mytilus trossulus* и гаметях *Scaphechinus mirabilis*.

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.

При дальнейшей конкретизации количественных характеристик генотоксичности в зависимости от концентраций наночастиц конкретных веществ возможно разработать методику оценки экологической ситуации на исследуемых акваториях.

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».

Объем и структура диссертации. Текст диссертации изложен на 110 страницах машинописного текста и состоит из введения, 7 глав, выводов и списка литературы, включающего 190 источников, из них 178 на иностранном языке. Фактический материал и результаты его обработки представлены в 5 таблицах и 21 рисунке.

Анализ диссертации по главам.

В 1-й главе (стр. 9–35) представлен аналитический обзор современной отечественной и зарубежной литературы по проблеме исследования. Представлена характеристика наночастиц, их физико-химических свойствах, источников поступления в наземные и водные экосистемы. Дана краткая токсикологическая характеристика наноматериалов.

Отдельно автором рассмотрен исторический аспект изучения наночастиц применительно к физиологии и биохимии живых организмов. Приведены современные представления о взаимодействии наночастиц с живыми организмами на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях.

На основании литературного анализа отечественной и зарубежной литературы обосновывается методологический подход, основанный на

изучении повреждения ДНК (кометный анализ).

Глава 2 (стр. 36–39) посвящена характеристике объектов исследования. Подробно охарактеризованы география, морфологические характеристики, биология и экология *Mytilus trossulus* и *Scaphechinus mirabilis*

Глава 3 (стр. 40–45) содержит подробное описание методики и методов сбора биологического материала и лабораторных исследований. Подробно представлены схемы экспериментов, описаны токсикологические тесты, физиологические и химико-аналитические методы.

В главе 4 (стр. 46–59) представлены результаты лабораторных исследований воздействия наночастиц (НЧ) оксида меди на гидробионтов. Проведено сравнение воздействия наночастиц CuO и Cu²⁺ на *M. trossulus*. Показана способность мидий накапливать взвешенные НЧ CuO из окружающей воды. Проведен сравнительный анализ накопления наночастиц в пищеварительной железе и жабрах. Показано, 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.

В экспериментах с плоским морским ежом выявлены эффекты инициации окислительного стресса в гонадах, проявившееся в накоплении малонового диальдегида. При этом, воздействие НЧ не сказывалось на оплодотворяющей способности сперматозоидов и не приводило к отклонениям развития на стадиях бластулы, гастролы и раннего плутеуса.

В главе 5 (стр. 60–72) приведены результаты токсикологических исследований по воздействию НЧ оксида цинка на плоского морского ежа. Обнаружена способность НЧ ZnO проникать внутрь организмов и накапливаться в мягких тканях плоских морских ежей. Полученные данные сопоставлены с результатами аналогичных исследований других авторов.

Выявлено, что при воздействии на родительские особи увеличивается доля аномально развивающихся эмбрионов и личинок. Сделано заключение, что ионы цинка 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. Проведенный спермиотест показал, что воздействие, как НЧ, так и ионов цинка снижало оплодотворяющую способность сперматозоидов *S. Mirabilis*.

Глава 6 (стр. 73–78) описывает результаты токсического воздействия

на мидию *M. trossulus* наночастиц диоксида титана. Выявлена доминирующая роль пищеварительной железы в накоплении НЧ. Тем не менее, несмотря на слабую степень аккумуляции титана в жабрах, процент повреждения в их клетках был выше, чем в пищеварительной железе.

Глава 7 (стр. 79–85) описывает результаты токсических экспериментов по изучению действия наночастиц SiO_2 на *M. trossulus*. Выявлены токсические эффекты в форме повреждения ДНК в жабрах и пищеварительной железе. На основе сопоставления с литературными данными сделаны предположения о возможных механизмах генотоксического воздействия вещества.

В заключении работы приводятся выводы и список использованной литературы. В выводах приводятся полученные автором основные результаты диссертационного исследования. Выводы сформулированы корректно и отражают содержание диссертационного исследования.

Автореферат диссертации достаточно полно отражает содержание диссертации.

Замечания и рекомендации

1. Автор изучает в работе воздействие наночастиц на тихоокеанскую мидию и необыкновенного плоского морского ежа. Можно сделать предположение о типичности, массовости данных объектов, их оседлости, а значит возможности использования в качестве тест-объектов в токсикологических исследованиях. Обоснования выбора именно этих видов животных для исследования в диссертации нет. Краткая информация дана только в автореферате.

2. В своих исследованиях автор использует молекулярно-генетические, биохимические и химико-аналитические методы для получения определенных количественных результатов. При этом, наверное, все изучаемые в работе показатели довольно переменчивы, характеризуются высокой дисперсией по причине, во-первых, особенностей самих методов, не позволяющих, иногда, получать стабильные результаты и во-вторых, индивидуальных характеристик изучаемых животных, отличающихся в выборке адаптационными возможностями, биохимическим статусом и т.д. В этих случаях рекомендуется увеличивать численность изучаемых выборок. Тем не менее, в эмбриотесте объем выборки составлял 16 объектов, в методе ДНК-комет – 15 объектов, определении малонового диальдегида – 15 объектов, определении микроэлементов – 15 объектов. В этой связи

возникает вопрос, как определялась достаточность объема изучаемой выборки?

3. При описании эмбриотеста, метода ДНК-комет, определения малонового диальдегида, определения микроэлементов автор говорит про «параллели». Речь идет о параллелях эксперимента, или повторностях анализов, проводимых на одном и том же объекте? Про параллели экспериментов в разделе описания схем экспериментов не говорится.

4. В дополнение к предыдущему вопросу: биохимические и аналитические методы предполагают получение количественных данных от каждой пробы в двух или трех повторностях для исключения артефактов или случайных выбросов, возникающих по причине человеческого фактора, или особенностей изучаемого объекта. Если повторности проводились, то как учитывались полученные данные с учетом их разброса между повторностями?

5. Во всех сериях экспериментов затравка делалась веществами в концентрациях от 20 мкг/л до 5 мг/л. Стоковый раствор (суспензия?) НЧ готовился в ультразвуковой ванне. Насколько вероятно, что часть изучаемых веществ в процессе приготовления раствора не седиментировалась на стенках ванны и не произошло изменение итоговой концентрации? Или подобными допущениями можно пренебречь, исходя из количественных особенностей изучаемых биологических характеристик?

6. Известно, что инициация в организме токсического стресса запускает антиоксидантные и детоксикационные ферментативные механизмы в целях поддержания гомеостаза. Активность некоторых ферментов используется в том числе и в качестве индикаторов экологической ситуации на водоеме. Возникает закономерный вопрос, почему автор не использовал показатели активности антиоксидантных систем?

Вышеизложенные вопросы озвучены в качестве дискуссии и не снижают качество диссертационной работы.

Общее заключение. Диссертационное исследование Куклы Сергея Петровича выполнено на самом современном методическом уровне и представляет собой законченную научно-исследовательскую работу. Работа написана грамотным научным языком, хорошо иллюстрирована. Материал представлен в логической последовательности, стиль изложения и оформление соответствуют уровню требований, предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук.

Полученные результаты, сделанные выводы и сформулированные положения научно обоснованы, достоверны, подтверждены значительным экспериментальным и аналитическим материалом, имеют существенную научную значимость и большую практическую ценность.

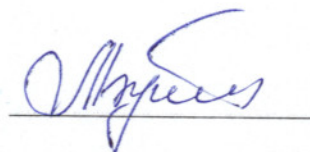
Поставленные задачи решены, цель исследования достигнута, работа прошла успешную апробацию на многих международных и всероссийских конференциях.

Таким образом, по своей актуальности, современным методам исследования, объему фактического материала и качеству его анализа и обработки, научной новизне и практической значимости диссертационная работа и автореферат отвечают требованиям <положения о присуждении ученых степеней в ЮФУ (№270-ОД от 29.09.2023 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Кукла Сергей Петрович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.15. Экология (биологические науки).

Официальный оппонент

Бугаев Леонид Анатольевич, кандидат биологических наук по специальности 03.03.01 Физиология, доцент, заведующий лабораторией молекулярной генетики и физиологии рыб Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» (ФГБНУ «ВНИРО»)

03 ноября 2022 года



344002, г. Ростов-на-Дону, ул. Береговая, 21в.

Тел. +7(989) 8196290, e-mail: bugaevla@azniirkh.vniro.ru.

Подпись Л.А. Бугаева удостоверяю
Ученый секретарь Азово-Черноморского
филиала ФГБНУ «ВНИРО» («АзНИИРХ»)



У. И. Икрбаева