

Влияние бикомпонентных наночастиц ZnO-ZnFe₂O₄ на гемоциты средиземноморской мидии (*Mytilus galloprovincialis*) в условиях эксперимента *in vitro*

М. С. Подольская^{1*}, А. А. Ткачук¹, А. Ю. Андреева¹,
Е. С. Кладченко¹, Э. С. Челебиева¹, А. А. Мосунов²

¹ Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН,
Севастополь, Россия

² Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия
*e-mail: podolskaya_m99@bk.ru

Аннотация

Исследовано токсическое действие бикомпонентных наночастиц ZnO-ZnFe₂O₄, являющихся основным действующим компонентом отечественного противобрастающего покрытия, на маркерные показатели клеток гемолимфы (гемоциты) средиземноморской мидии (*Mytilus galloprovincialis*) в экспериментальных условиях *in vitro*. Оценивались следующие показатели: смертность, клеточный состав и продукция активных форм кислорода. В эксперименте гемоциты инкубировали в течение 1 и 2 ч в 1 мл стерильной морской воды, содержащей наночастицы в различных концентрациях: 0.03, 0.3 и 3 мг/мл. Данные анализировали с помощью метода точной цитометрии. Установлено, что действие наночастиц ZnO-ZnFe₂O₄ оказало влияние на клеточный состав гемолимфы: снижалась доля агранулоцитов, воздействие 0.03 мг/мл наночастиц при часовой инкубации снижало уровень продукции активных форм кислорода в 2.5 раза по сравнению с контрольной пробой ($p \leq 0.05$). Инкубация гемоцитов с максимальной концентрацией наночастиц (3 мг/мл) привела к гибели клеток уже через 1 ч после воздействия. Остро токсического воздействия на гемоциты при применении 0.03 мг/мл и 0.3 мг/мл наночастиц оксида цинка и феррита цинка не наблюдалось.

Ключевые слова: наночастицы, средиземноморская мидия, гемоциты, АФК

Благодарности: синтез наночастиц (ZnO-ZnFe₂O₄) был выполнен в рамках выполнения проекта РФФ № 21-13-00498 «Экологически безопасные и высокоэффективные противобрастающие покрытия на основе бикомпонентных наночастиц металлов и их оксидов». Оценка токсичности наночастиц на организм мидий (анализ параметров гемоцитов) проводился за счет средств госзадания ФИЦ ИнБИОМ № 121102500161-4 «Закономерности организации иммунной системы промысловых гидробионтов и исследование влияния факторов внешней среды на функционирование их защитных систем».

© Подольская М. С., Ткачук А. А., Андреева А. Ю.,
Кладченко Е. С., Челебиева Э. С., Мосунов А. А., 2023



Контент доступен по лицензии Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0) License

Для цитирования: Влияние бикомпонентных наночастиц ZnO-ZnFe₂O₄ на гемоциты средиземноморской мидии (*Mytilus galloprovincialis*) в условиях эксперимента *in vitro* / М. С. Подольская [и др.] // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон моря. 2023. № 1. С. 124–136. EDN BPTQRT. doi:10.29039/2413-5577-2023-124-136

Effect of Bicomponent ZnO-ZnFe₂O₄ Nanoparticles on Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) Hemocytes under *in vitro* Conditions

**M. S. Podolskaya^{1*}, A. A. Tkachuk¹, A. Yu. Andreyeva¹,
E. S. Kladchenko¹, E. S. Chelebieva¹, A. A. Mosunov²**

¹ *Institute of Biology of the Southern Seas named after A.O. Kovalevsky RAS, Sevastopol, Russia*

² *Sevastopol State University, Sevastopol, Russia*

**e-mail: podolskaya_m99@bk.ru*

Abstract

The present work investigates the toxic effect of bicomponent ZnO-ZnFe₂O₄ nanoparticles, which are the main active component of the domestic antifouling coating, on marker indicators of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) hemolymph cells (hemocytes) under *in vitro* experimental conditions. The following indicators were evaluated: mortality, cellular composition and production of reactive oxygen species. In the experiment, hemocytes were incubated for 1 and 2 hours in 1 mL of sterile seawater containing nanoparticles of different concentrations: 0.03, 0.3 and 3 mg/mL. The data were analyzed using the flowing cytometry. It was shown that ZnO-ZnFe₂O₄ nanoparticles had an effect on the cellular composition of the hemolymph: the proportion of agranulocytes decreased and hour exposure to 0.03 mg/mL nanoparticles reduced the level of production of reactive oxygen species by 2.5 times compared to the control ($p \leq 0.05$). Incubation of hemocytes with a maximum concentration of nanoparticles (3 mg/mL) led to cell death within 1 hour after exposure. No acute toxic effects on hemocytes with the use of 0.03 mg/mL and 0.3 mg/mL of zinc oxide and zinc ferrite nanoparticles were observed.

Key words: nanoparticles, Mediterranean mussel, hemocytes, reactive oxygen species

Acknowledgements: the synthesis of nanoparticles (ZnO-ZnFe₂O₄) was carried out under RSF project no. 21-13-00498 “Environmentally safe and highly effective antifouling coatings based on bicomponent metal nanoparticles and their oxides”. Assessment of the toxicity of nanoparticles on the body of mussels (analysis of hemocyte parameters) was carried out at the expense of the state task of FRC IBSS No. 121102500161-4 “Patterns of the organization of the immune system of commercial hydrobionts and the study of the influence of environmental factors on the functioning of their protective systems”.

For citation: Podolskaya, M.S., Tkachuk, A.A., Andreyeva, A.Yu., Kladchenko, E.S., Chelebieva, E.S. and Mosunov, A.A., 2023. Effect of Bicomponent ZnO-ZnFe₂O₄ Nanoparticles on Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) Hemocytes under *in vitro* Conditions. *Ecological Safety of Coastal and Shelf Zones of Sea*, (1), pp. 124–136. EDN BPTQRT. doi:10.29039/2413-5577-2023-124-136

Введение

Биообрастание – это естественный процесс, предполагающий прикрепление микро- и макроорганизмов к различным субстратам, находящимся в водной среде¹⁾. При этом поселение организмов-обрастателей на поверхностях гидротехнических сооружений причиняет значительный ущерб судоходству, нефтяным платформам и промышленности в целом [1, 2]. Общемировой ущерб от морского обрастания на данный момент превышает 50 млрд долларов США в год [3]. Основная задача противообрастающих покрытий – предотвращение образования биологической пленки, которая является первым этапом биообрастания [4]. В то же время такие покрытия должны быть безопасными по отношению к нецелевым организмам. Широко применяемые в прошлом противообрастающие покрытия создавали на основе таких биоцидов, как трибутилолово и медь, которые оказались высокотоксичными по отношению к морским организмам и были запрещены [5–7].

Один из инновационных методов защиты от биообрастания – применение покрытий на основе наноструктур оксидов металлов [8]. Наиболее часто используются наночастицы металлов цинка, алюминия, железа, титана, серебра и меди, а также их оксиды [9]. Такие наночастицы обладают доказанными антибактериальными, антикоррозионными и противообрастающими свойствами [10].

Важным качеством новых противообрастающих компонентов является их низкая токсичность для водных организмов. Тем не менее имеющихся в литературе данных недостаточно для того, чтобы сделать однозначный вывод о токсичности наночастиц по отношению к морским организмам. Известно, что токсичность наночастиц зависит от вида металла, размера, формы и поверхностного заряда частиц [11]. Среди возможных механизмов токсического действия наночастиц на организм гидробионтов можно выделить продукцию ими активных форм кислорода (АФК), что является следствием непропорционально большой площади поверхности наночастиц [12]. Перепроизводство АФК, превышающее способность клеток к антиоксидантной защите, вызывает окислительный стресс, приводящий к нарушениям структуры клеточной мембраны, митохондрий, окислению белков и ДНК [13, 14]. Например, исследование воздействия наночастиц оксигидроксида алюминия (бёмита) не выявило острой токсичности по отношению к *Daphnia magna* (Straus, 1820) [15]. В то же время исследование наночастиц диоксида титана выявило способность наночастиц накапливаться в организме дафний [16]. Воздействие наночастиц оксида меди приводило к нарушению поведения моллюска *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778) [17]. А воздействие наночастиц оксида цинка оказывало негативное влияние на развитие личинок морской рыбы *Oryzias melastigma* (McClelland, 1839) [18].

В настоящий момент разработка противообрастающих покрытий на основе наночастиц считается перспективным направлением. Ранее был создан новый компонент противообрастающей краски, содержащий наночастицы

¹⁾ Подводная технология / В. А. Коробков [и др.]. Ленинград : Судостроение, 1981. 240 с. URL: <https://www.geokniga.org/bookfiles/geokniga-podvodnaya-tehnologiya.pdf> (дата обращения: 11.03.2023).

ZnO-ZnFe₂O₄, полученные путем электрического взрыва свитых проволочек цинка и железа в кислородосодержащей атмосфере. Наночастицы ZnO способны поглощать видимый свет и ингибировать рост микроорганизмов вследствие фотокаталитического процесса [19]. Состав является отечественной разработкой и имеет доказанные противообрастающие свойства [20], но нет данных о его безопасности по отношению к морским организмам. Поскольку применяемый нами способ получения наночастиц является достаточно оригинальным [21], а частицы изучаемого состава, как нам известно, были получены впервые, подробное изучение их физико-химических свойств, а также механизмы биологического действия являются предметом наших будущих исследований.

Двустворчатые моллюски являются удобными модельными объектами для изучения воздействия наночастиц, так как ведут прикрепленный образ жизни и являются фильтраторами [22]. Функциональное состояние моллюсков оценивают по морфологическим и физиологическим показателям клеток гемолимфы – гемоцитам, которые, в свою очередь, являются эффекторами клеточного иммунитета [23]. В основе клеточного иммунного ответа лежит продукция гемоцитами активных форм кислорода (АФК), фагоцитоз и инкапсуляция инородных тел [24, 25]. Гемоциты моллюска реагируют на действие раздражителей респираторным взрывом, суть которого состоит в резком увеличении продукции клетками АФК, вызывающими окислительный стресс у патогенных организмов [26]. Гемоциты являются общепринятой моделью для оценки физиологического состояния моллюсков [6].

Изучение токсичности новых компонентов краски на основе наночастиц, определение допустимых диапазонов концентрации и понимание влияния наночастиц на эффекторы иммунной системы является актуальной задачей. В связи со сказанным выше целью настоящей работы является оценка токсического действия наночастиц ZnO-ZnFe₂O₄ на функциональные показатели гемоцитов гемолимфы двустворчатого моллюска *Mytilus galloprovincialis*.

Материалы и методы

Половозрелые мидии (*M. galloprovincialis*) возрастом четыре года, массой 12.9 ± 2.3 г, размером 57.8 ± 1.8 мм были отобраны в количестве 210 шт. в прибрежной акватории Севастополя (температура воды 15–20 °С, соленость 17–18 ЕПС, содержание кислорода 7.2–8.5 мг/л). Мидий доставляли в лабораторию в пластиковых контейнерах без воды. Моллюсков акклимировали к лабораторным условиям в аквариумах с плотностью посадки 3–5 л на особь в течение 7 сут. В аквариумах поддерживались условия, близкие к точке сбора материала: температура – 23.3 ± 0.1 °С, соленость – 18.2 ± 0.02 ЕПС, pH – 8.1 ± 0.01 , содержание кислорода – 7.7 ± 0.1 мг/л. Содержание кислорода и температуру воды контролировали при помощи портативного кислородомера с температурным датчиком ST300D (Ohaus, США). Соленость и pH контролировали при помощи портативного кондуктометра-солемера sensION 5 HACH (США) и pH-метра ST2100-F (Ohaus, США). На протяжении всего эксперимента, включая период акклимации к лабораторным условиям, для удаления метаболитов ежедневно меняли воду с сохранением значения солености. Моллюсков кормили смесью микроводорослей *Tetraselmis viridis* (штамм IBSS–25 из коллекции отдела биотехнологии и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ)

из расчета 5–10 мл смеси на каждые 50 л аквариумной воды. После акклимации гидробионтов разделили на 7 групп по 30 особей в каждой группе (одна контрольная, три группы с инкубацией в течение 1 ч (группы 1.1, 1.2 и 1.3), три группы с инкубацией в течение 2 ч (группы 2.1, 2.2 и 2.3).

Влияние наночастиц на гемоциты моллюсков исследовалось в условиях *in vitro*. Для этого у 10 особей стерильным шприцем из мускула-замыкателя отбирали гемолимфу и объединяли в одну пробу. Для получения гемоцитов объединенную пробу трижды отмывали в стерильной морской воде путем центрифугирования (500 г, 5 мин). Для дальнейшего анализа использовали осадок. Все работы по отмывке и подготовке клеток для анализа проводились при температуре +4 °С для предотвращения слипания клеток.

В эксперименте клетки инкубировали в 1 мл стерильной морской воды, содержащей наночастицы. В каждой пробе содержалось $1 \cdot 10^6$ клеток/мл. В работе применялись синтезированные в рамках проекта Российского научного фонда биметаллические наночастицы ZnO-ZnFe₂O₄ в различных концентрациях: 0.03 (концентрация ниже активной в 10 раз), 0.3 (активная концентрация разработанной противообрастающей смеси) и 3 (концентрация выше активной в 10 раз) мг/мл. Клетки инкубировали в термошейкере с охлаждением для микропробирок (*Biosan TS-100C*) при температуре +4 °С и 1000 об/мин. Одну часть проб гемоцитов в диапазоне исследуемых концентраций наночастиц (группы 1.1 (концентрация наночастиц в пробе 0.03 мг/мл), 1.2 (0.3 мг/мл) и 1.3 (0.03 мг/мл)) инкубировали в течение 1 ч, другую (группы 2.1 (концентрация наночастиц в пробе 0.03 мг/мл), 2.2 (0.3 мг/мл) и 2.3 (0.03 мг/мл)) – в течение 2 ч. Контролем служила проба гемоцитов в морской воде без наночастиц. После инкубации клетки опытных проб отмывали от наночастиц в стерильной морской воде путем центрифугирования (500 г, 5 мин).

Анализ функциональных показателей гемоцитов проводился на проточном цитометре *Cytomics FC 500* (*Beckman Coulter*, США), оборудованном однофазным аргоновым лазером (длина волны 488 нм). Для анализа методом проточной цитометрии готовили суспензию с концентрацией гемоцитов $(1-2) \cdot 10^6$ клеток на 1 мл.

Для идентификации типов гемоцитов готовую суспензию клеток гемолимфы окрашивали красителем *SYBR Green I* (*SGI*). Финальная концентрация *SGI* в пробе – 10 мкмоль/л. Окрашенные клетки инкубировали 40 мин в темноте при 4 °С. Содержание ДНК в гемоцитах анализировали на основании гистограмм распределения флуоресценции красителя в канале *FL1* при помощи программы *Flowing Software 5.2*. Ось абсцисс на гистограмме распределения флуоресценции красителя отображала содержание ДНК в клетках, а ось ординат – число клеток.

Оценка способности гемоцитов к спонтанной продукции АФК проводилась на основании оценки интенсивности флуоресценции красителя 2-7-дихлорфлуоресцеин-диацетата (*DCF-DA*). Затем 1 мл суспензий гемоцитов инкубировали с 10 мкл раствора *DCF-DA* в течение 40 мин в темноте. Финальная концентрация красителя в пробе составляла 10 мкмоль/л. Флуоресценция красителя анализировалась в канале *FL1*.

Выживаемость гемоцитов определяли при помощи йодистого пропидия (PI), флуоресцентного красителя для нуклеиновых кислот. К 1 мл суспензии гемоцитов добавляли 10 мкл раствора PI (*Sigma Aldrich*) и инкубировали в темноте в течение 40 мин при 4 °С. Долю мертвых клеток в общем числе гемоцитов оценивали по гистограммам флуоресценции PI в канале FL2 цитометра.

При обработке результатов нормальность распределения проверяли при помощи теста Колмогорова – Смирнова. Различия между группами анализировали с использованием программного обеспечения *RStudio*, версия 4.1.0.

Распределение функциональных показателей гемоцитов не подчинялось нормальному закону распределения, поэтому данные анализировали при помощи непараметрического критерия Манна – Уитни. Результаты выражены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего.

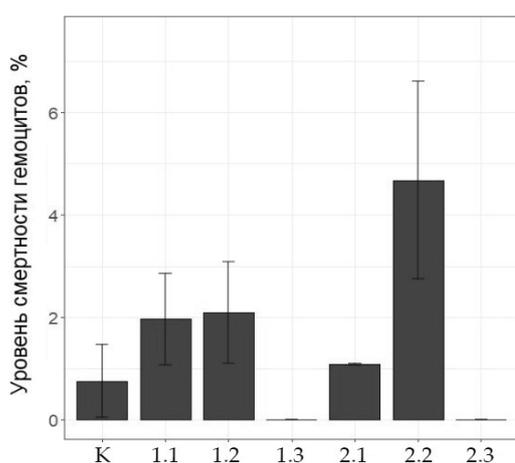


Рис. 1. Влияние наночастиц ZnO-ZnFe₂O₄ на смертность гемоцитов средиземноморской мидии (*M. Galloprovincialis*): К – контроль; 1.1 – инкубация 1 ч, концентрация 0.03 мг/мл; 1.2 – инкубация 1 ч, концентрация 0.3 мг/мл; 1.3 – инкубация 1 ч, концентрация 3 мг/мл; 2.1 – инкубация 2 ч, концентрация 0.03 мг/мл; 2.2 – инкубация 2 ч, концентрация 0.3 мг/мл; 2.3 – инкубация 2 ч, концентрация 3 мг/мл

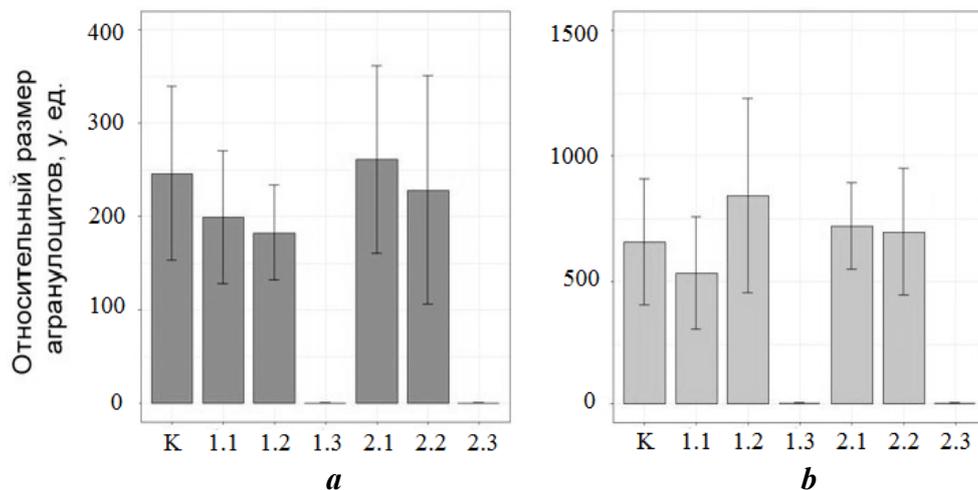
Fig. 1. Effect of ZnO-ZnFe₂O₄ nanoparticles on the mortality of Mediterranean mussel (*M. galloprovincialis*) hemocytes. K – control; 1.1 – incubation 1 h, concentration 0.03 mg/mL; 1.2 – incubation 1 h, concentration 0.3 mg/mL; 1.3 – incubation 1 h, concentration 3 mg/mL; 2.1 – incubation 2 h, concentration 0.03 mg/mL; 2.2 – incubation 2 h, concentration 0.3 mg /mL; 2.3 – incubation 2 h, concentration 3 mg/mL

Результаты

Достоверных различий между контрольной (проба гемоцитов в морской воде без наночастиц) и опытными (пробы гемоцитов с различными концентрациями наночастиц и временем инкубации (группы 1.1, 1.2, 1.3, 2.1, 2.2 и 2.3) группами гемоцитов по количеству мертвых клеток не выявлено, хотя наблюдалась тенденция к увеличению их числа в результате воздействия наночастиц (рис. 1).

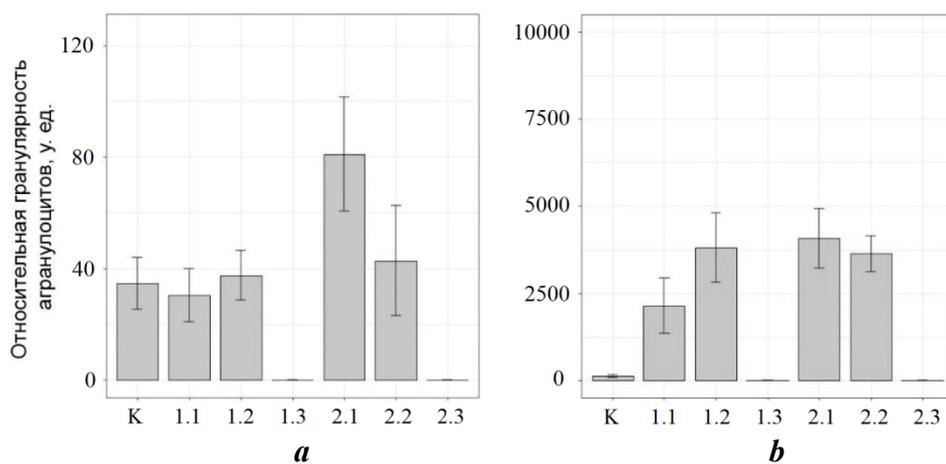
Так как краситель проникает в клетки через поврежденную мембрану, отсутствие данных на графике при воздействии максимальной концентрации (3 мг/мл) указывает на то, что клетки гемолимфы разрушились и погибли уже после первого часа воздействия, и были удалены другими гемоцитами посредством фагоцитоза.

Воздействие наночастиц на размер и гранулярность клеток гемолимфы мидии показано на рис. 2 и 3. Достоверных различий между группами не выявлено, что может свидетельствовать о том, что присутствующие в пробах наночастицы не оказали существенного воздействия на размер и гранулярность гемоцитов. Однако наблюдалась тенденция к снижению размера агранулоцитов при увеличении концентрации наночастиц.



Р и с . 2 . Влияние наночастиц $ZnO-ZnFe_2O_4$ на относительный размер гемцитов средиземноморской мидии (*M. galloprovincialis*): *a* – агранулоцитов; *b* –гранулоцитов. Остальные обозначения те же, что для рис. 1

F i g . 2 . Effect of $ZnO-ZnFe_2O_4$ nanoparticles on the relative size of hemocytes of Mediterranean mussel (*M. galloprovincialis*): *a* – that of agranulocytes; *b* – that of granulocytes. For the other nomenclatures see Fig. 1



Р и с . 3 . Влияние наночастиц $ZnO-ZnFe_2O_4$ на относительную гранулярность гемцитов средиземноморской мидии (*M. galloprovincialis*): *a* – агранулоцитов; *b* – гранулоцитов. Остальные обозначения те же, что для рис. 1

F i g . 3 . The effect of $ZnO-ZnFe_2O_4$ nanoparticles on the relative granularity of Mediterranean mussel (*M. galloprovincialis*) hemocytes: *a* – that of agranulocytes; *b* – that of granulocytes. For the other nomenclatures see Fig. 1

В результате инкубации гемоцитов с наночастицами отмечались небольшие изменения в уровне относительной гранулярности гемоцитов: значения бокового рассеяния у агранулоцитов возрастали при увеличении концентрации наночастиц, тогда как у гранулоцитов, напротив, наблюдалась тенденция к повышению уровня гранулярности цитоплазмы в зависимости от концентрации (рис. 3). Вместе с тем изменения значений бокового рассеяния между контрольными и опытными группами не были достоверны.

Наночастицы существенно повлияли на спонтанную продукцию АФК клетками гемолимфы. Интенсивность флуоресценции агранулоцитов и гранулоцитов, окрашенных флуоресцентным красителем *DCF-DA*, снижалась в зависимости от концентрации наночастиц в среде (рис. 4). Продукция АФК агранулоцитами снизилась в 2.5 раза с 182.3 ± 69.7 относительных единиц флуоресценции (ОЕФ) в контрольной пробе до 72.1 ± 28.2 ОЕФ в пробе с часовой инкубацией, содержащей наночастицы в концентрации 0.03 мг/мл ($p \leq 0.05$). Рост продукции АФК наблюдался только при двухчасовой *инкубации* при воздействии наночастиц в концентрации 0.3 мг/мл на обе популяции клеток, однако эти изменения были статистически незначимыми.

Обсуждение

Результаты работы свидетельствуют о том, что активная концентрация наночастиц (0.3 мг/мл) не оказывала существенного воздействия на гемоциты средиземноморской мидии *M. galloprovincialis*. Достоверных различий в функциональных показателях клеток между контрольной и опытными

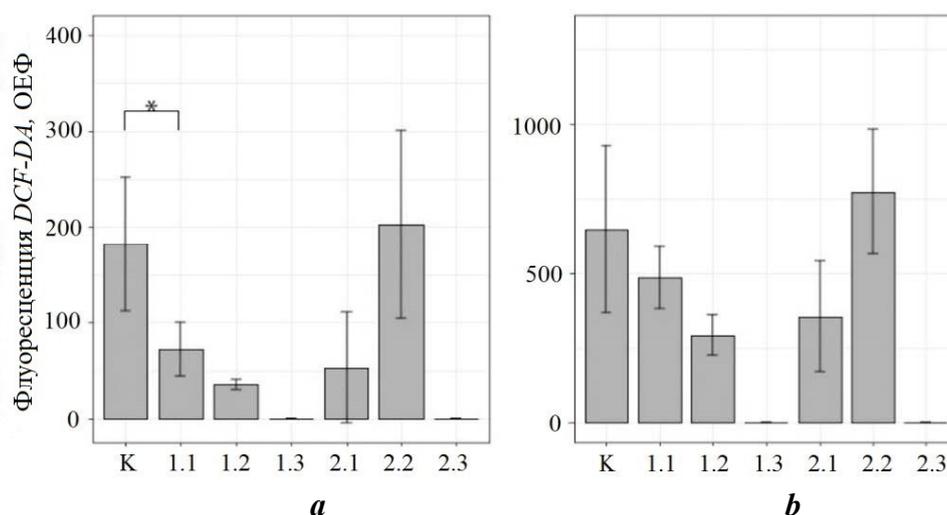


Рис. 4. Влияние наночастиц $ZnO-ZnFe_2O_4$ на интенсивность флуоресценции *DCF-DA* в гемоцитах средиземноморской мидии (*M. galloprovincialis*): *a* – в агранулоцитах, ОЕФ; *b* – в гранулоцитах, ОЕФ. Остальные обозначения те же, что для рис. 1

Fig. 4. The effect of $ZnO-ZnFe_2O_4$ nanoparticles on DCF-DA fluorescence intensity of the Mediterranean mussel (*M. galloprovincialis*) hemocytes: *a* – in agranulocytes, relative fluorescent units, RFU; *b* – in granulocytes, RFU. For the other nomenclatures see Fig. 1

группами выявлено не было. Наблюдалась тенденция к росту доли гранулоцитов и снижению доли агранулоцитов. Наблюдалось также незначительное увеличение размера и гранулярности клеток. Концентрация наночастиц ниже активной в 10 раз (0.03 мг/мл) также не оказала существенного влияния на функциональные показатели гемоцитов мидии. Вместе с тем воздействие наночастиц при часовой инкубации снижало уровень продукции АФК в 2.5 раза по сравнению с контрольной пробой. Инкубация гемоцитов с наночастицами в концентрации выше активной в 10 раз (3 мг/мл) привела к гибели клеток уже через 1 ч после воздействия.

Известно, что гемоциты двустворчатых моллюсков играют важную функциональную роль в организме, отвечая за клеточно-опосредованный иммунитет путем фагоцитоза и продукции цитотоксических молекул различной природы [23]. Во время инкубации гемоцитов с наночастицами отмечалась тенденция к увеличению размера и степени гранулярности гемоцитов, что может говорить об активном фагоцитозе наночастиц. В этом случае формирование фагосом с наночастицами приводило к увеличению неоднородности содержимого цитоплазмы гемоцитов и, как следствие, возрастанию показателя бокового рассеяния. Изменения формы клеток, содержащих различные количества наночастиц, также влияли на величину прямого рассеяния проб. Интенсивное поглощение наночастиц гемоцитами, вероятно, способно снижать общую фагоцитарную емкость гемоцитов, что может привести к ослаблению врожденной иммунной системы двустворчатых моллюсков [27]. Аналогично нашим результатам воздействие наночастиц Ag и TiO₂ на гемолимфу устрицы *Crassostrea virginica* также приводило к снижению фагоцитоза клетками после двухчасового воздействия [28].

Увеличение концентрации наночастиц в группе с часовой инкубацией привело к снижению продукции АФК, а с двухчасовой, наоборот, индуцировало продукцию АФК (рис. 4). Так как наночастицы способны самостоятельно генерировать АФК, увеличение содержания АФК в клетках следует рассматривать как развитие окислительного стресса в гемоцитах [29, 30]. Известно также, что поглощенные гемоцитами наночастицы могут влиять на иммунные функции, такие как фагоцитоз и продукцию АФК [31]. При этом было выявлено, что фагоцитоз чужеродных частиц вызывает увеличение продукции АФК [32]. Основным источником АФК являются митохондрии [33]. Продукция АФК гемоцитами является важной защитной функцией врожденного иммунитета двустворчатых. Попадая в клетку, наночастицы способны деполаризовать митохондриальную мембрану и нарушать ее функции [29]. В ответ на такое воздействие митохондрии увеличивают продукцию АФК, вызывая окислительный стресс [34]. Как известно, фагоцитоз является энергозатратным процессом, и это тоже может являться причиной генерации АФК [35]. Ранее исследование влияния наночастиц сажи на гемоциты мидии *M. galloprovincialis* в условиях *in vitro* в течение 0.5–4 ч (1–10 мкг/мл) также показало увеличение продукции АФК в клетке [23]. А в другом исследовании того же автора, посвященном влиянию наночастиц TiO₂ и SiO₂ на гемоциты мидии, наоборот, не выявлено значительного токсического воздействия на клетку [36]. При воздействии наночастиц TiO₂ на гемоциты мидии было отмечено существенное увеличение продукции АФК

и снижение мембранного потенциала митохондрий, которые наблюдаются при воздействии максимальных концентраций [35].

Заключение

Таким образом, можно сделать вывод, что токсичность наночастиц в основном зависела от их концентрации и времени воздействия. Результаты показали, что острый токсический эффект возникал при концентрации 3 мг/мл, при которой гибель клеток последовала уже в результате часовой инкубации. В группах 1.1, 1.2 и 1.3 с часовой инкубацией наблюдалось снижение продукции АФК, а в группах 2.1, 2.2 и 2.3 с двухчасовой инкубацией, напротив, ее увеличение, что может говорить о механизмах адаптации клеток к стрессу. Специфического ответа клеток при воздействии наночастиц в концентрациях 0.03 и 0.3 мг/мл не наблюдалось, что допускает использование таких концентраций в водной среде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Звягинцев А. Ю., Полтаруха О. П., Масленников С. И.* Обрастание морских систем технического водоснабжения и анализ методов защиты от обрастания в водоводах (аналитический обзор) // *Вода: химия и экология*. 2015. № 1. С. 30–51. EDN TWNISJ.
2. *Абачараев М. М., Абачараев И. М.* Перспективные разработки по борьбе с морским обрастанием // *Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Морская техника и технология*. 2011. № 3. С. 7–9. EDN ONJAIF.
3. *Звягинцев А. Ю.* Морское обрастание в северо-западной части Тихого океана. 2005. 432 с.
4. *Nurioglu A. G., Esteves A. C. C., de With G.* Non-toxic, non-biocide-release antifouling coatings based on molecular structure design for marine applications // *Journal of Materials Chemistry B*. 2015. Vol. 3, iss. 32. С. 6547–6570. doi:10.1039/C5TB00232J
5. Comparative Toxicity of “Tin Free” Self-Polishing Copolymer Antifouling Paints and Their Inhibitory Effects on Larval Development of a Non-Target Organism / *J. Castritsi-Catharios [et al.] // Materials Sciences and Applications*. 2014. Vol. 5. P. 158–169. doi:10.4236/msa.2014.53020
6. *Meador J. P.* Predicting the fate and effects of tributyltin in marine systems // *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. New York : Springer, 2000. Vol. 166. P. 1–48.
7. Acoustic methods for biofouling control: A review / *M. Legg [et al.] // Ocean Engineering*. 2015. Vol. 103. P. 237–247. doi:10.1016/j.oceaneng.2015.04.070
8. A study of the bactericidal, anti-biofouling, cytotoxic and antioxidant properties of actinobacterially synthesised silver nanoparticles / *T. Shanmugasundaram [et al.] // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013. Vol. 111. P. 680–687. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.06.045
9. Закономерности формирования антимикробных микро/нанокompозитов при окислении биметаллических наночастиц Al/Zn / *А. С. Ложкомоев [и др.] // Журнал физической химии*. 2018. Т. 92, № 12. С. 1958–1962. EDN YMNDTV. doi:10.1134/S0044453718120270
10. *Palza H.* Antimicrobial polymers with metal nanoparticles // *International Journal of Molecular Sciences*. 2015. Vol. 16, iss. 1. P. 2099–2116. doi:10.3390/ijms16012099

11. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction / N. Hoshyar [et al.] // *Nanomedicine*. 2016. Vol. 11, iss. 6. P. 673–692. doi:10.2217/nnm.16.5
12. Toxicity of copper oxide nanoparticles in the blue mussel, *Mytilus edulis*: a redox proteomic investigation / W. Hu [et al.] // *Chemosphere*. 2014. Vol. 108. P. 289–299. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.01.054
13. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm / T. Xia [et al.] // *Nano Letters*. 2006. Vol. 6, iss. 8. P. 1794–1807. doi:10.1021/nl061025k
14. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS-and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells / Y.-H. Hsin [et al.] // *Toxicology letters*. 2008. Vol. 179, iss. 3. P. 130–139. doi:10.1016/j.toxlet.2008.04.015
15. Evaluation of the toxicity of nanostructural aluminium oxyhydroxide with the help of hydrobionts / N. V. Svarovskaya [et al.] // *Chemistry for Sustainable Development*. 2013. Vol. 21, iss. 4. P. 411–414. URL: https://sibran.ru/en/journals/issue.php?ID=150645&ARTICLE_ID=150654 (date of access: 18.02.2023).
16. Trophic transfer of TiO₂ nanoparticles from daphnia to zebrafish in a simplified freshwater food chain / X. Zhu [et al.] // *Chemosphere*. 2010. Vol. 79, iss. 9. P. 928–933. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.03.022
17. Impacts of metal oxide nanoparticles on marine phytoplankton / R. J. Miller [et al.] // *Environmental science and technology*. 2010. Vol. 44, iss. 19. P. 7329–7334. doi:10.1021/es100247x
18. The embryotoxicity of ZnO nanoparticles to marine medaka, *Oryzias melastigma* / Y. Cong [et al.] // *Aquatic Toxicology*. 2017. Vol. 185. P. 11–18. doi:10.1016/j.aquatox.2017.01.006
19. Antimicrobial effects of TiO₂ and Ag₂O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites / A. M. Allahverdiyev [et al.] // *Future Microbiology*. 2011. Vol. 6, iss. 8. P. 933–940. doi:10.2217/fmb.11.78
20. Mosunov A. A., Evstigneev V. P. Nanoparticles in marine antifouling coatings: a case study // *Journal of Physics: Conference Series*. 2021. Vol. 2094, iss. 2. 022041. doi:10.1088/1742-6596/2094/2/022041
21. Electroexplosive synthesis of composite ZnO/ZnFe₂O₄/Zn nanoparticles with photocatalytic and antibacterial activity / O. Bakina [et al.] // *Materials Science in Semiconductor Processing*. 2022. Vol. 152. 107076. doi:10.1016/j.mssp.2022.107076
22. Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes / L. Canesi [et al.] // *Environment International*. 2008. Vol. 34, iss. 8. P. 1114–1119. doi:10.1016/j.envint.2008.04.002
23. Анализ клеточного цикла и морфофункциональных параметров гемоцитов *Mytilus galloprovincialis* Lam., 1819 (Bivalvia) в прибрежных экосистемах с различной антропогенной нагрузкой / А. Ю. Андреева [и др.] // *Биология внутренних вод*. 2019. № 4-2. С. 74–81. EDN TUBWWR. doi:10.1134/S0320965219060032
24. Bacteria–hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves / L. Canesi [et al.] // *Microscopy research and technique*. 2002. Vol. 57, iss. 6. P. 469–476. doi:10.1002/jemt.10100
25. Koutsogiannaki S., Kaloyianni M. Signaling molecules involved in immune responses in mussels // *Invertebrate Survival Journal*. 2010. Vol. 7, iss. 1. P. 11–21. URL: <https://www.isj.unimore.it/index.php/ISJ/article/view/204/119> (date of access: 18.02.2023).

26. Tiscar P. G., Mosca F. Defense mechanisms in farmed marine molluscs // Veterinary Research Communications. 2004. Vol. 28, suppl. 1. P. 57–62. doi:10.1023/B:VERC.0000045379.78547.23
27. Jovanović B., Palić D. Immunotoxicology of non-functionalized engineered nanoparticles in aquatic organisms with special emphasis on fish – Review of current knowledge, gap identification, and call for further research // Aquatic Toxicology. 2012. Vol. 118. P. 141–151. doi:10.1016/j.aquatox.2012.04.005
28. Chalew T. E. A., Galloway J. F., Graczyk T. K. Pilot study on effects of nanoparticle exposure on *Crassostrea virginica* hemocyte phagocytosis // Marine Pollution Bulletin. 2012. Vol. 64, iss. 10. P. 2251–2253. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.06.026
29. The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles / A. A. Dayem [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. 2017. Vol. 18, iss. 1. P. 120. doi:10.3390/ijms18010120
30. Sokolova I. M. Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors // Integrative and Comparative Biology. 2013. Vol. 53, iss. 4. P. 597–608. doi:10.1093/icb/ict028
31. In vivo effects of n-TiO₂ on digestive gland and immune function of the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* / C. Barmo [et al.] // Aquatic Toxicology. 2013. Vol. 132–133. P. 9–18. doi:10.1016/j.aquatox.2013.01.014
32. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): current knowledge and future prospects / L. Donaghy [et al.] // Aquaculture. 2009. Vol. 297, iss. 1–4. P. 10–24. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.09.003
33. Starkov A. A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling // Annals of the New York Academy of Sciences. 2008. Vol. 1147, iss. 1. P. 37–52. doi:10.1196/annals.1427.015
34. Differential in vivo hemocyte responses to nano titanium dioxide in mussels: Effects of particle size / T. Wang [et al.] // Aquatic Toxicology. 2019. Vol. 212. P. 28–36. doi:10.1016/j.aquatox.2019.04.012
35. Diversity and environmental adaptation of phagocytic cell metabolism / L. C. Davies [et al.] // Journal of Leukocyte Biology. 2019. Vol. 105, iss. 1. P. 37–48. doi.org/10.1002/JLB.4RI0518-195R
36. In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO₂, SiO₂) on *Mytilus* hemocytes / L. Canesi [et al.] // Aquatic Toxicology. 2010. Vol. 96, iss. 2. P. 151–158. doi:10.1016/j.aquatox.2009.10.017

Поступила 9.08.2022 г.; одобрена после рецензирования 5.12.2022 г.;
принята к публикации 01.02.2023 г.; опубликована 24.03.2023 г.

Об авторах:

Подольская Мария Сергеевна, младший научный сотрудник, Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН (299011, Россия, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2), **ORCID ID: 0000-0001-8185-3985**, *podolskaya_m99@bk.ru*

Ткачук Анастасия Александровна, младший научный сотрудник, Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН (299011, Россия, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2), **ORCID ID: 0000-0002-4017-7164**, *aatkachuk86@gmail.com*

Андреева Александра Юрьевна, руководитель лаборатории экологической иммунологии гидробионтов, Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН (299011, Россия, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2), ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук **ORCID ID: 0000-0001-7845-0165**, **ResearcherID: Z-6151-2019**, **Scopus AuthorID: 57191916535**, *andreevaal@gmail.com*

Кладченко Екатерина Сергеевна, научный сотрудник, Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН (299011, Россия, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2), **ORCID ID: 0000-0001-9476-6573**, **ResearcherID: U-7749-2019**, **Scopus AuthorID: 57205560752**, *Kladchenko_Ekaterina@bk.ru*

Челебиева Элина Сергеевна, старший научный сотрудник, Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН (299011, Россия, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2), кандидат биологических наук, **ORCID ID: 0000-0002-7662-2573**, **ResearcherID: H-3359-2014**, **Scopus AuthorID: 56549997100**, *elina.chelebieva@gmail.com*

Мосунов Андрей Алексеевич, ведущий научный сотрудник, Севастопольский государственный университет (299053, Россия, г. Севастополь, ул. Университетская, 33), кандидат физико-математических наук, **ORCID ID: 0000-0002-1390-5832**, **ResearcherID: R-5570-2016**, **Scopus AuthorID: 36802573200**, *aamosunov@sevsu.ru*

Заявленный вклад авторов:

Подольская Мария Сергеевна – подготовка текста статьи, проведение экспериментальных исследований, качественный анализ данных и интерпретация, обработка и описание результатов исследования, обзор литературы по теме исследования

Ткачук Анастасия Александровна – формализованный анализ данных, обзор литературы по теме исследования, проведение экспериментальных исследований, подготовка графического материала, редактирование текста

Андреева Александра Юрьевна – формулировка и постановка задачи, разработка концепции, разработка методики проведения экспериментальных исследований, формулирование выводов, редактирование текста

Кладченко Екатерина Сергеевна – подготовка графических материалов, проведение экспериментальных исследований, редактирование текста

Челебиева Элина Сергеевна – проведение экспериментальных исследований, редактирование текста

Мосунов Андрей Алексеевич – синтез наночастиц, редактирование текста

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.