



УДК 574.64:594.1

ГЕНОТОКСИЧНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА НА ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *MYTILUS TROSSULUS* (GOULD, 1850) В МОРСКОЙ СРЕДЕ

© 2018 г. С. П. Кукла, В. В. Слободскова, В. П. Челомин

Тихоокеанский океанологический институт имени В. И. Ильичёва ДВО РАН, Владивосток, Россия
E-mail: kukla.sp@mail.ru

Поступила в редакцию 12.04.2018; после доработки 17.07.2018;
принята к публикации 18.12.2018; опубликована онлайн 28.12.2018.

Увеличение поступления наночастиц диоксида титана (TiO_2) в морскую среду способно вызвать непрогнозируемые последствия и создать потенциальную опасность для организмов различных трофических уровней. С помощью метода ДНК-комет изучено воздействие наночастиц диоксида титана на двустворчатого моллюска *Mytilus trossulus* (Gould, 1850), оценены уровни повреждения ДНК. Показано, что 10-дневное воздействие TiO_2 в концентрациях 200 и 1000 $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ приводит к деструктивным изменениям ДНК жабр и пищеварительной железы моллюска. Отмечены различия степени повреждения ДНК у двух исследуемых тканей. В пищеварительной железе моллюска зафиксировано увеличение концентрации титана и малонового диальдегида.

Ключевые слова: наночастицы, генотоксичность, диоксид титана TiO_2 , двустворчатые моллюски, кометный анализ

Стремительное внедрение достижений нанотехнологии в разнообразную антропогенную деятельность сопровождается неуклонным ростом содержания наночастиц в окружающей среде [32]. Это представляет реальную опасность не только для человека, но и для других организмов различных трофических уровней [26]. По мнению специалистов, проникновение продуктов нанотехнологии в биосферу чревато многими последствиями, прогнозировать которые пока не представляется возможным из-за недостатка экотоксикологических исследований [23].

Термин «наночастица» (далее — НЧ) означает наноразмерную (менее 100 нм) часть макроскопической фазы вещества. От макроразмерных частиц того же состава НЧ отличаются не только размерами. НЧ обладают принципиально иными физико-химическими свойствами: большей удельной поверхностью, высокой адсорбционной и кумулятивной способностями, широким химическим потенциалом на межфазной границе, в результате чего изменяются растворимость, а также реакционная (сравнимая с таковой радикалов) и каталитическая интенсивность [2]. В то же время уникальные физические и химические свойства НЧ, которые лежат в основе технологической и потребительской привлекательности наноматериалов, способны обуславливать высокую реакционную специфичность этих частиц по отношению к основным биоструктурам и макромолекулам клетки, что может стать причиной развития неизвестных патобиохимических процессов.

Имеющиеся в мировой научной литературе экспериментальные данные свидетельствуют о том, что НЧ различной природы могут проникать в неизменном виде через биологические мембраны, в том числе ядерные [9], и накапливаться в биологических системах различных уровней организации. При воздействии на организмы млекопитающих и человека наночастицы способны преодолевать обычные защитные барьеры (желудочный, плацентарный и гематоэнцефалический) [26, 33].

НЧ могут непосредственно контактировать с плодом, попадать в центральную нервную систему, а также, циркулируя в кровеносной и лимфатической системах и обладая очень длительным периодом полувыведения из организма, накапливаться в органах и тканях. После проникновения в клетку наночастицы потенциально могут:

- 1) приводить к образованию токсичных продуктов, повреждающих внутренние структуры клетки [21], в том числе молекулу ДНК;
- 2) напрямую взаимодействовать с ядерной ДНК;
- 3) ингибировать репарацию ДНК [15].

Учитывая вероятные особенности взаимоотношения наночастиц с внутриклеточными биохимическими системами, их биодоступность и возможность влиять непосредственно на генные структуры, необходимо отметить неизбежность возникновения комплекса проблем, которые являются отдалёнными последствиями интоксикации. Они способны негативно влиять на воспроизводство и представляют потенциальную опасность для потомства [28, 31].

Наночастицы диоксида титана (далее — НЧ TiO_2) — одни из наиболее широко применяемых НЧ на сегодняшний день. В мире ежегодно производится до нескольких сотен тысяч тонн НЧ TiO_2 [27, 30, 32]. Благодаря своим фотокаталитическим и антибактериальным свойствам, НЧ TiO_2 включены в состав лакокрасочной продукции, а также лекарственных, косметических, гигиенических и защитных средств. Между тем в процессе производства, транспортировки, хранения, потребления и утилизации данных продуктов доля НЧ TiO_2 поступает в окружающую среду, при этом в результате различных миграционных процессов они неизбежно оказываются в морских прибрежных экосистемах [22, 23, 37]. Проникновение наночастиц в морскую среду чревато многочисленными последствиями, прогнозировать которые из-за недостатка информации пока не представляется возможным. Казалось бы, тенденция к агрегации и низкая растворимость в воде [17] должны в определённой мере ограничивать доступность НЧ для морских организмов, однако экспериментальные данные свидетельствуют о высоких уровнях аккумуляции наночастиц оксидов металлов в гидробионтах [2, 5]. Имеются сведения о вымывании НЧ TiO_2 из фасадных красок [16] и о поступлении их в сточные воды [18]. По расчётам математических моделей, в настоящее время концентрация НЧ в воде и донных отложениях может достигать нескольких десятков мкг (в расчёте на литр и килограмм соответственно) [14, 25, 32].

В данном контексте приобретает особую актуальность изучение влияния относительно высокостабильных в морской среде наночастиц TiO_2 на двустворчатых моллюсков-фильтраторов, способных аккумулировать в своих тканях различные металлы. Благодаря этому свойству моллюски семейства митилид (*Mytilidae*) являются уникальными моделями для изучения взаимоотношения живых организмов с ксенобиотиками неорганического происхождения и широко используются для мониторинга загрязнения разных акваторий Мирового океана [23]. Исходя из этих рассуждений, мы посчитали крайне важным исследовать биодоступность и токсические свойства (генотоксичность) НЧ TiO_2 на примере дальневосточного моллюска *Mytilus trossulus* (Gould, 1850). Для оценки токсического влияния на ДНК гидробионта мы использовали клетки пищеварительной железы и жабр — ключевых органов взаимодействия организма с окружающей средой.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Моллюски *M. trossulus* отобраны в экологически малонарушенной б. Средняя (залив Восток, Японское море). Перед экспериментом мидий отсортировали по размеру — $(4,5 \pm 0,5)$ см — и провели акклимацию в аквариумах не менее двух суток. После неё гидробионтов разделили на три группы по 40 экз. (контрольная и две экспериментальные) и поместили в аквариумы из расчёта 0,7 л морской воды на одного моллюска. Параметры морской воды были следующими: солёность — $(32,75 \pm 0,33)\%$; рН — $(8,16 \pm 0,06)$; O_2 — $(7,91 \pm 0,08)$ мкг·л⁻¹; T — $(17,37 \pm 0,31)$ °C. В аквариумах с экспериментальными группами каждые 12 ч меняли

воду и вносили НЧ TiO_2 (Sigma-Aldrich, CAS no. 13463-67-7), доводя рабочие концентрации до 200 и 1000 $\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ (в пересчёте на ионы титана). Непосредственно перед внесением в аквариум стоковый раствор НЧ TiO_2 ($100\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$) подвергали ультразвуковой обработке (40 Вт) в течение 20 минут. На протяжении всего эксперимента (10 суток) и в период адаптации поддерживали стабильную температуру воды [$(17,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$], использовали принудительную аэрацию, животных дополнительно не кормили. Контрольную группу мидий содержали в аналогичных условиях, но без добавления НЧ TiO_2 .

После окончания экспозиции в экспериментальных аквариумах с растворами НЧ TiO_2 и в контрольных с чистой морской водой из моллюсков *M. trossulus* отбирали жабры и пищеварительную железу. Для оценки уровня повреждения ДНК использовали щелочной вариант метода ДНК-комет, описанный авторами ранее [1]. Полученные изображения обрабатывали с помощью программы CaspLab (v. 1.2.2). При оценке целостности ДНК в качестве критерия использовали процент ДНК в «хвосте кометы». Количество титана в исследованных тканях моллюсков определяли методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии на приборе Shimadzu AA-6800-F. Содержание малонового диальдегида (далее — МДА) в тканях определяли по цветной реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [4].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы STATISTICA 8. Достоверность различий между показателями контрольной и экспериментальных групп моллюсков определяли по непараметрическому критерию Манна — Уитни (при $p \leq 0,05$). Всего проведено четыре серии экспериментов в аквариуме ($N = 4$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За десять суток воздействия НЧ TiO_2 на моллюсков при концентрации НЧ $200\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ существенного различия в содержании диоксида титана в жабрах, по сравнению с таковым в контрольной группе, не отмечено; при концентрации НЧ $1000\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ на 7-е и 10-е сутки зафиксировано увеличение содержания титана. В пищеварительной железе на 7-е сутки воздействия при концентрации НЧ TiO_2 $200\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ отмечен рост содержания титана (в 4 раза); при концентрации $1000\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ на 5-е сутки отмечено увеличение НЧ TiO_2 (в 27 раз). Максимальное значение (в 48 раз выше, чем в контрольной группе) зарегистрировано к концу эксперимента, при концентрации НЧ TiO_2 в среде $1000\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ (табл. 1).

Таблица 1. Содержание НЧ TiO_2 и МДА в жабрах (Ж) и пищеварительной железе (ПЖ) *M. trossulus*

Table 1. Content of titanium dioxide nanoparticles and malondialdehyde in gills (Ж) and digestive gland (ПЖ) of *M. trossulus*

		Концентрация титана, $\text{мкг}\cdot\text{г}^{-1}$ сух. веса					
орган	контроль	$200\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$			$1000\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$		
		5 суток	7 суток	10 суток	5 суток	7 суток	10 суток
Ж	0	следы	следы	следы	следы	$2,78 \pm 0,14$	$5,49 \pm 0,28$
ПЖ	$2,68 \pm 0,13$	следы	$13,27 \pm 0,66$	$31,33 \pm 1,57$	$72,84 \pm 3,64$	$105,18 \pm 5,26$	$129,60 \pm 6,48$
		Концентрация МДА, $\text{нмоль}\cdot\text{г}^{-1}$					
орган	контроль	$200\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$			$1000\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$		
		5 суток	7 суток	10 суток	5 суток	7 суток	10 суток
Ж	$0,43 \pm 0,1$	$0,58 \pm 0,02$	$0,54 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,02$	$0,44 \pm 0,02$	$0,55 \pm 0,04$	$0,9 \pm 0,01$
ПЖ	$1,25 \pm 0,12$	$1,29 \pm 0,12$	$0,36 \pm 0,06$	$2,53 \pm 0,06$	$2,190 \pm 0,11$	$1,25 \pm 0,09$	$2,49 \pm 0,05$

В тканях моллюсков из экспериментальной группы, по сравнению с таковыми контрольной, наблюдалось изменение концентрации МДА. Наиболее сильные отклонения отмечены на 10-е сутки эксперимента при воздействии концентрации НЧ $1000\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$ как для жабр (в 2,1 раза), так и для пищеварительной железы (практически в 2 раза) (табл. 1).

В условиях нашего эксперимента воздействие НЧ TiO_2 на *M. trossulus* привело к росту повреждений цепей ДНК в клетках жабр и пищеварительной железы моллюсков, о чём свидетельствуют результаты генетического анализа. Процент ДНК в «хвосте кометы» у клеток пищеварительной железы и жабр моллюсков экспериментальных групп значительно (до 4,5 раз) превышал соответствующий показатель контрольной группы (рис. 1). При воздействии высокой концентрации НЧ TiO_2 ($1000 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$) данный показатель возрастал с течением времени воздействия.

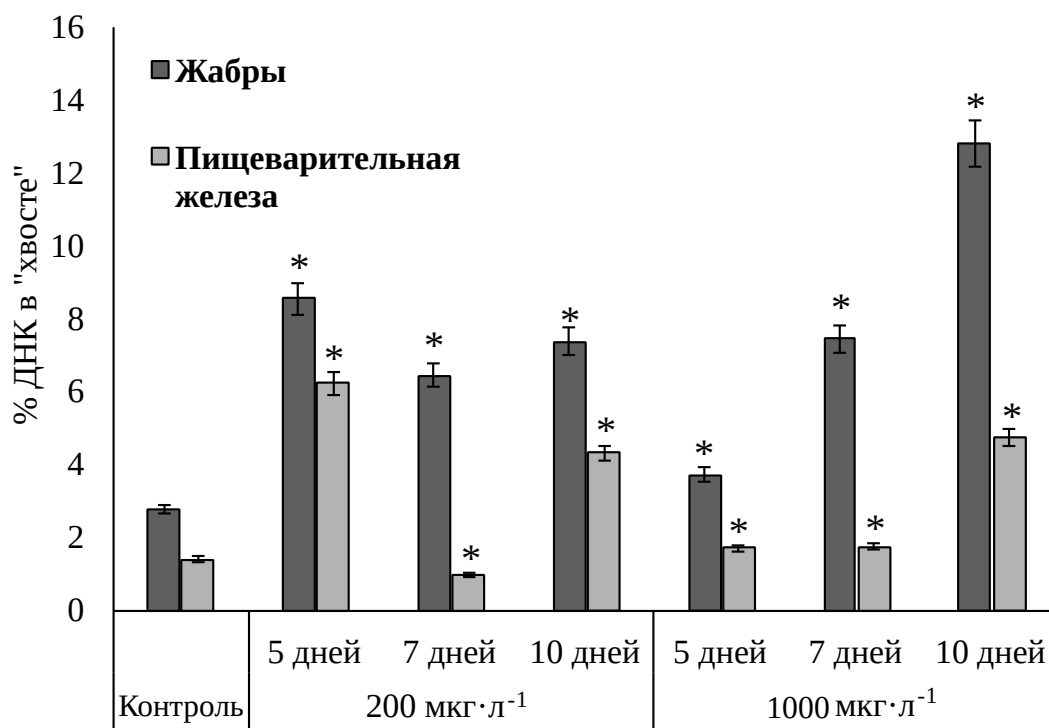


Рис. 1. Процент повреждения ДНК в тканях *M. trossulus* после воздействия НЧ TiO_2 . Знаком (*) отмечено достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$)

Fig. 1. DNA damage percentage in *M. trossulus* tissues after NP TiO_2 exposure. Mark (*) means significant difference from control ($p < 0.05$)

Известно, что жабры являются чувствительным органом-мишенью при воздействии растворённых форм тяжёлых металлов (медь, кадмий, цинк и др.). Однако при воздействии НЧ в нашем эксперименте существенного роста концентрации титана в клетках жабр не наблюдалось, в то время как его содержание в клетках пищеварительной железы возросло. Сходные данные были получены ранее в экспериментах с НЧ оксида меди [8]. Факт сходства результатов можно объяснить тем, что на поверхности жабр происходит селекция по размеру пищевых частиц, которые либо прижимаются реснитчатым эпителием моллюска к ротовой полости, либо отбрасываются. Часть НЧ, попавших на поверхность жабр, задерживается, вероятно, покрывающим их слоем слизи и остаётся снаружи. В клетках пищеварительной железы, в свою очередь, идёт поглощение НЧ, даже если они образуют крупные агрегаты, за счёт активного процесса эндоцитоза, интенсивность которого существенно влияет на аккумуляцию НЧ живыми системами [35].

Вопрос о биохимических механизмах генотоксичности НЧ для различных организмов вызывает повышенный интерес: негативное влияние НЧ TiO_2 ранее отмечалось у рыб [29, 36], многощетинковых червей [11], брюхоногих [3] и двустворчатых моллюсков [6, 12, 20].

Большинство исследователей, характеризуя повреждения в молекуле ДНК, заключают, что они могут быть вызваны как прямыми, так и непрямыми механизмами. К механизмам первого рода следует отнести способность наночастиц связываться непосредственно с молекулой ДНК [31].

Непрямыми механизмами являются воздействие НЧ на различные структуры клетки, в том числе на белки системы репарации ДНК, а также образование на поверхности частиц свободных радикалов, повреждающих ДНК [19, 24]. Отмечено что наночастицы TiO_2 способны нарушать работу репарационной системы клетки [15]. Более того, к возможным опосредованным механизмам причисляют воздействие сорбированных на поверхности частиц загрязняющих веществ различной природы, которые могли содержаться в природных водах, используемых в ходе эксперимента [6, 10, 34].

Рост числа повреждений в структуре ДНК клеток жабр, выявленных в ходе экспериментов, не может быть следствием прямого взаимодействия НЧ TiO_2 ни с элементами генетического аппарата, ни с какими-либо внутриклеточными биоструктурами, так как нами не было отмечено их накопления в клетках ткани. Наиболее вероятно, что это эффект непрямого воздействия наночастиц TiO_2 , находящихся с внешней стороны клеток жабр. Рост числа повреждений ДНК после воздействия НЧ TiO_2 при отсутствии поступления самих частиц внутрь клеток ткани уже отмечался у полихеты *Arenicola marina* [11]. В недавних работах также показано, что НЧ вызывают цито- и генотоксический эффект в клетках гемолимфы моллюсков [3, 12, 13]. Обнаруженное в результате этих исследований повреждение фагоцитарных клеток свидетельствует, вероятно, о воспалительных процессах в организме, возникающих в результате воздействия НЧ [9, 19], и одним из их проявлений может быть интенсивная деструкция генома клеток соматических тканей, в частности жабр. Хотя это объяснение носит гипотетический характер, оно должно быть упомянуто, поскольку может помочь в решении недостаточно изученного вопроса, касающегося механизмов генотоксичности.

Большинство исследователей, описывая механизмы генотоксичности НЧ, делают вывод о том, что повреждения молекулы ДНК являются следствием генерации активных форм кислорода (далее — АФК) и развития процессов окислительного стресса [7, 21]. По имеющимся данным, наночастицы оксидов металлов, в частности НЧ TiO_2 [15], за счёт своих химических и поверхностных характеристик способствуют интенсивному образованию АФК, которые вызывают окислительное повреждение ДНК через окисление азотистых оснований (пуриновых и пиримидиновых) и дезоксирибозного скелета, а также через формирование ДНК-белковых сшивок. Когда уровень АФК, образующихся вследствие воздействия НЧ, превышает защитный потенциал антиоксидантной и репарационной систем, они начинают повреждать различные биоструктуры клетки (белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды). На организменном уровне это может привести к фиброзу, апоптозу отдельных клеток, мутагенезу и канцерогенезу [7, 33].

Очевидно, что в результате воздействия НЧ на *M. trossulus* уровень генерации АФК превысил темпы их утилизации антиоксидантной системой, о чём свидетельствует увеличение уровня МДА. Данное явление указывает на то, что даже малое присутствие наночастиц в клетке приводит к образованию АФК, вызывающих деструктивные изменения. Повышение уровня МДА также связано, вероятно, с подавлением антиоксидантной системы клетки [19].

Отличительная особенность полученных нами результатов состоит в том, что, несмотря на отсутствие аккумуляции титана в жабрах, степень деструкции ДНК в данных клетках была выше, чем в клетках пищеварительной железы. Из этого следует, что клетки пищеварительной железы более склонны к накоплению НЧ, в то время как жабры более чувствительны к генотоксическому воздействию наночастиц. В поисках объяснения полученных результатов следует учитывать уникальные физико-химические свойства НЧ TiO_2 , определяющие их поведение в морской среде при взаимодействии с биологическими системами, в частности их способность к генерации АФК без проникновения непосредственно в живую клетку [11, 23]. Как показали итальянские исследователи [23], НЧ TiO_2 , несмотря на быструю агрегацию, активно связывались с белками внеклеточного биополимера, покрывающего клетки микроводоросли *Dunaliella tertiolecta*, и резко стимулировали образование АФК. Авторы подчёркивают, что основное количество радикалов кислорода генерировалось вне клетки, при этом отклик на описанное воздействие у популяции микроводоросли выражался в увеличении активности каталазы.

Заключение. Проведённое исследование показало, что НЧ TiO_2 вызывают окислительный стресс, который проявляется повышением уровня перекисного окисления липидов и деструкцией ДНК в клетках пищеварительной железы и жабр двустворчатого моллюска *M. trossulus*. Биохимические механизмы, лежащие в основе генотоксичности и реализации последствий повреждения ДНК, в целом сходны для различных групп гидробионтов, а значит, масштабное поступление НЧ оксидов металлов в морскую среду может привести к негативным последствиям на экосистемном уровне.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Слободскова В. В., Кукла С. П., Челомин В. П. Анализ качества морской среды на основе определения генотоксичности ДНК клеток жабр приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1856) // *Биология моря*. 2015. Т. 41, № 6. С. 457–460. [Slobodskova V. V., Kukla S. P., Chelomin V. P. An analysis of the quality of the marine environment based on determination of the genotoxicity of DNA in the gill cells of the Yesso Scallop, *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1856). *Biologiya morya*, 2015, vol. 41, no. 6, pp. 457–460. (in Russ.)].
2. Харламов А. И., Кириллова Н. В., Скрипниченко А. В., Губарени Н. И., Фоменко В. В. Нанохимические особенности наноструктур, нанофаз и наночастиц // *Доповіді Національної академії наук України*. 2010. № 4. С. 157–163. [Kharlamov A. I., Kirillova N. V., Skripnichenko A. V., Gubareni N. I., Fomenko V. V. Nanokhimicheskie osobennosti nanostruktur, nanofaz i nanochastits. *Dopovidi Natsionalnoi akademii nauk Ukrainy*, 2010, no. 4, pp. 157–163. (in Russ.)].
3. Ali D., Ali H., Alarifi S., Kumar S., Serajuddin M., Mashih A. P., Ahmed M., Khan M., Adil S. F., Shaik M. R., Ansari A. A. Impairment of DNA in a freshwater gastropod (*Lymnea luteola* L.) after exposure to titanium dioxide nanoparticles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2015, vol. 68, iss. 3, pp. 543–552. <https://doi.org/10.1007/s00244-015-0132-0>.
4. Buege J. A., Aust S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 1978, vol. 52, pp. 302–310. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6).
5. Canesi L., Ciacci C., Fabbri R., Marcomini A., Pojana G., Gallo G. Bivalve mollusks as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Marine Environmental Research*, 2012, vol. 76, pp. 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.06.005>.
6. Canesi L., Frenzilli G., Balbi T., Bernareschi M., Ciacci C., Corsolini S., Torre C. D., Rabbri R., Faleri C., Focardi S., Guidi P., Kocan A., Marcomini A., Mariotti M., Nigro M., Pozo-Gallardo K., Rocco L., Scarcelli V., Smerilli A., Corsi L. Interactive effects of *n-TiO₂* and 2,3,7,8-TCDD on the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 2014, vol. 153, pp. 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.002>.
7. Chen Z., Wang Y., Ba T., Li Y., Pu J., Chen T., Song Y., Gu Y., Qian Q., Yang J., Jia G. Genotoxic evaluation of titanium dioxide nanoparticles *in vivo* and *in vitro*. *Toxicology Letters*, 2014, vol. 226, iss. 3, pp. 314–319. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.02.020>.
8. Chelomin V. P., Slobodskova V. V., Zakhartsev M., Kukla S. Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in the bivalve mollusk *Mytilus trossulus*. *Journal of Ocean University of China*, 2017, vol. 16, iss. 2, pp. 339–345. <https://doi.org/10.1007/s11802-017-3133-y>.
9. Donaldson K., Poland K. A., Schins L. P. F. Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: Criteria for improved test strategies. *Nanotoxicology*, 2010, vol. 4, iss. 4, pp. 414–420. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.482751>.
10. Fang Q., Shi X., Zhang L., Wang Q., Wang X., Guo Y., Zhou B. Effect of titanium dioxide nanoparticles on the bioavailability, metabolism, and toxicity of pentachlorophenol in zebrafish larvae. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, vol. 283, pp. 897–904. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.039>.
11. Galloway T., Lewis C., Dolciotti I., Johnston B. D., Moger J., Regoli F. Sublethal toxicity of nanotitanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. *Environmental Pollution*, 2010, vol. 158, pp. 1748–1755. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.11.013>.
12. Girardello F., Custódio Leite C., Vianna Villela I., da Silva Machado M., Luiz Mendes Juchem A., Roesch-Ely M., Neves Fernandes A., Salvador M., Pêgas Henriques A. J. Titanium dioxide

- nanoparticles induce genotoxicity but not mutagenicity in golden mussel *Limnoperna fortunei*. *Aquatic Toxicology*, 2016, vol. 170, pp. 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.030>.
13. Gomes T., Araujo O., Pereira R., Almeida A. C., Cravo A., Bebianno M. J. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 2013, vol. 84, pp. 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.11.009>.
 14. Gottschalk F., Sun T. Y., Nowack B. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies. *Environmental Pollution*, 2013, vol. 181, pp. 287–300. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.06.003>.
 15. Jugan M. L., Barillet S., Simon-Deckers A., Herlin-Boime N., Sauvaigo S., Douki T., Carriere M. Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. *Nanotoxicology*, 2012, vol. 6, iss. 5, pp. 501–513. <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.587903>.
 16. Kaegi R., Ulrich A., Sinnet B., Vonbank R., Wichser A., Zuleeg S., Simmler H., Brunner S., Vonmont H., Burkhardt M., Bollner M. Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environmental Pollution*, 2008, vol. 156, iss. 2, pp. 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.08.004>.
 17. Keller A. A., Wang H., Zhou D., Lenihan H. S., Cherr G., Cardinale D. J., Miller R., Ji Z. Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. *Environmental Science & Technology*, 2010, vol. 44, iss. 6, pp. 1962–1967. <https://doi.org/10.1021/es902987d>.
 18. Kiser M. A., Westerhoff P., Benn T., Wang Y., Perez-Rivera J., Hrisovski K. Titanium nanomaterial removal and release from wastewater treatment plants. *Environmental Science & Technology*, 2009, vol. 43, iss. 17, pp. 6757–6763. <https://doi.org/10.1021/es901102n>.
 19. Magdolenova Z., Collins A., Kumar A., Dhawan A., Stone V., Dusinka M. Mechanisms of genotoxicity. A review of *in vitro* and *in vivo* studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*, 2014, vol. 8, iss. 3, pp. 233–278. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.773464>.
 20. Mahaye N., Thwala M., Cowan D. A., Musee N. Genotoxicity of metal based engineered nanoparticles in aquatic organisms: A review. *Mutation Research / Reviews in Mutation Research*, 2017, vol. 773, pp. 134–160. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.05.004>.
 21. Manke A., Wang L., Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed Research International*, 2013, vol. 2013, article ID 942916 (15 p.). <https://dx.doi.org/10.1155/2013/942916>.
 22. Matranga V., Corsi I. Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: Model organisms and molecular approaches. *Marine Environmental Research*, 2012, vol. 76, pp. 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.01.006>.
 23. Moore M. N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International*, 2006, vol. 32, iss. 8, pp. 967–976. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.06.014>.
 24. Morelli E., Gabellieri E., Bonomini A., Tognotti D., Grassi G., Corsi I. TiO₂ nanoparticles in seawater: Aggregation and interactions with the green alga *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, vol. 148, pp. 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.024>.
 25. Mueller N., Nowack B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science & Technology*, 2008, vol. 42, iss. 12, pp. 4447–4453. <https://doi.org/10.1021/es7029637>.
 26. Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 2005, vol. 113, iss. 7, pp. 823–839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>.
 27. Piccinno F., Gottschalk F., Seeger S., Nowack B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticles Research*, 2012, vol. 14, article ID 1109 (11 p.). <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1109-9>.
 28. Rim K. T., Song S. W., Kim H. Y. Oxidative DNA damage from nanoparticle exposure and its application to workers' health: A literature review. *Safety and Health at Work*, 2013, vol. 4, iss. 4, pp. 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.shaw.2013.07.006>.
 29. Rocco L., Santonastaso M., Mottola F., Castagliola D., Suero T., Pacifico S., Stingo V. Genotoxicity assessment of TiO₂ nanoparticles in the teleost *Danio rerio*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, vol. 113, pp. 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.012>.
 30. Robichaud C. O., Uyar A. E., Darbym R., Zucker L. G., Wiesner M. R. Estimates of upper

- bounds and trends in nano-TiO₂ production as a basis for exposure assessment. *Environmental Science & Technology*, 2009, vol. 43, iss. 12, pp. 4227–4233. <https://doi.org/10.1021/es8032549>.
31. Singh N., Manshian B., Jenkins G. J. S., Griffiths S. M., Williams P. M., Maffei T. G. G., Wright C. J., Doak S. H. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 2009, vol. 30, iss. 23–24, pp. 3891–3914. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.009>.
 32. Sun T. Y., Bornhöft N. A., Hungerbühler K., Nowack B. Dynamic probabilistic modeling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environmental Science & Technology*, 2016, vol. 50, iss. 9, pp. 4701–4711. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05828>.
 33. Suh W. H., Suslick K. S., Stucky Y. D., Suh Y.-H. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Progress in Neurobiology*, 2009, vol. 87, iss. 3, pp. 133–170. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.09.009>.
 34. Tian S., Zhang Y., Song C., Zhu X., Xing B. Titanium dioxide nanoparticles as carrier facilitate bioaccumulation of phenanthrene in marine bivalve, ark shell (*Scapharca subcrenata*). *Environmental Pollution*, 2014, vol. 192, pp. 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.05.010>.
 35. Torres-Duarte C., Ramos-Torres K. M., Rahimoff R., Cherr G. N. Stage specific effects of soluble copper and copper oxide nanoparticles during sea urchin embryo development and their relation to intracellular copper uptake. *Aquatic Toxicology*, 2017, vol. 189, pp. 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.05.008>.
 36. Vignardia C. P., Hasue F. M., Sartório P. V., Cardoso C. M., Machado A. S. D., Passos M. J. A. C. R., Santos T. C. A., Nucci J. M., Hewerd T. L. R., Watanabe L., Gomes V., Phan N. V. Genotoxicity, potential cytotoxicity and cell uptake of titanium dioxide nanoparticles in the marine fish *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766). *Aquatic Toxicology*, 2015, vol. 158, pp. 218–229. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.008>.
 37. Ward J. E., Kach D. J. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Marine Environmental Research*, 2009, vol. 68, iss. 3, pp. 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.05.002>.

GENOTOXIC IMPACT OF TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES ON MOLLUSK *MYTILUS TROSSULUS* (GOULD, 1850) IN MARINE ENVIRONMENT

S. P. Kukla, V. V. Slobodskova, V. P. Chelomin

V. I. Ilichev Pacific Oceanological Institute of the Far Eastern Branch of RAS, Vladivostok, Russian Federation
E-mail: kukla.sp@mail.ru

An increase in the input of titanium dioxide nanoparticles (NP TiO₂) into the marine environment can cause unpredictable consequences and create a potential danger to organisms of different trophic levels. Impact of NP TiO₂ on the bivalve *Mytilus trossulus* (Gould, 1850) was studied using the DNA comet method, and the levels of DNA damage were assessed. Shown that 10-day exposure to NP TiO₂ at concentrations of 200 and 1000 µg·l⁻¹ leads to destructive changes in the DNA of the gills and of the digestive gland of the mollusks. Difference between DNA damage in two examined tissues was noted. Furthermore, the elevation of titanium content and malondialdehyde content in digestive gland of mollusks was noted.

Keywords: nanoparticles, genotoxicity, titanium dioxide TiO₂, bivalves, comet assay