

УДК 594. 124

DOI: 10.18384/2310-7189-2017-3-14-26

## ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА МЕДИ (II) И ИОНА CU НА ХОЛИНЭСТЕРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ГЕМОЛИМФЫ МИДИИ ГРЕЯ *CRENOMYTILUS GRAYANUS* (DUNKER, 1853) (BIVALVIA: MYTILIDAE) В УСЛОВИЯХ ЛАБОРАТОРНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

**Ковалев Н.Н.<sup>1</sup>, Михеев Е.В.<sup>1</sup>, Кавун В.Я.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет  
690087, г. Владивосток, ул. Луговая, 52б

<sup>2</sup> Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН  
690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского 17

**Аннотация.** Проведено исследование влияния содержания наночастиц оксида меди (НЧ CuO) и ионов Cu<sup>2+</sup> в среде, на их накопление в гемолимфе мидии *Crenomytilus grayanus*. Оценено влияние наночастиц оксида меди и ионной формы металла (Cu<sup>2+</sup>) на активность холинэстеразы в гемолимфе мидии. Показано разнонаправленное воздействие наночастиц CuO и иона Cu<sup>2+</sup> на содержание меди и активность холинэстеразы в гемолимфе мидии. На начальном этапе эксперимента в случае ионной формы меди холинэстеразная активность снижалась, в случае наночастиц меди активность увеличивалась. На завершающей стадии эксперимента наблюдалась обратная зависимость для рассмотренных форм меди.

**Ключевые слова:** холинэстераза, гемолимфа, наночастицы, оксид меди, *Crenomytilus grayanus*.

## INFLUENCE OF COPPER OXIDE (II) NANOPARTICLES AND CU ION ON CHOLINESTERASE ACTIVITY OF HEMOLIMPH MUSSELS *CRENOMYTILUS GRAYANUS* (DUNKER, 1853) (BIVALVIA: MYTILIDAE) IN THE CONDITIONS OF A LABORATORY EXPERIMENT

**N. Kovalev<sup>1</sup>, E. Mikheev<sup>1</sup>, V. Kavun<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Far Eastern State Technical Fisheries University  
ul. Lugovaya 52b, Vladivostok, 690087, Russian Federation

<sup>2</sup> National Scientific Centre of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences  
ul. Pal'chevskogo 17, Vladivostok, 690041, Russian Federation

**Abstract.** The influence of the content of copper oxide nanoparticles (NP CuO) and Cu<sup>2+</sup> ions in the medium on their accumulation in the hemolymph of the mussel *Crenomytilus grayanus* is studied. The effect of copper oxide nanoparticles and metal ion (Cu<sup>2+</sup>) on cholinesterase activity in hemolymph of mussels is estimated. Multidirectional effects of CuO and Cu<sup>2+</sup> nanoparticles

on the copper content and cholinesterase activity in hemolymph are demonstrated. At the initial stage of the experiment, cholinesterase activity is shown to decrease in the case of the ionic form of copper, and in the case of copper nanoparticles, the activity increases. At the final stage of the experiment, an opposite situation for the considered forms of copper is observed.

**Key words:** cholinesterase, hemolymph, nanoparticles, copper oxide, *Crenomytilus grayanus*.

Наноматериалы привлекают все большее внимание из-за их новых свойств, в том числе большой удельной поверхности и высокой реакционной активности [26; 7]. В связи с бурным развитием нанотехнологий, промышленно производятся наноматериалы с различными формами и диаметрами для использования в ряде промышленных продуктов и товаров [17; 15; 23].

В настоящее время механизмы завуалированного проявления биологической активности (в том числе токсичности) наночастиц (НЧ) неясны, хотя важность исследований в этом направлении не вызывает сомнений, если учитывать огромные масштабы производства и поступления наночастиц в биосферу.

Недавно было показано негативное влияние на рост и выживание организмов, а также на окружающую среду, наночастиц оксида меди (CuO) и оксида цинка (ZnO) [21; 10]. Установлено, что наночастицы CuO вызывают эффекты окислительного стресса, апоптоза и протеолиза. Ионная форма меди вызывала экспрессию генов белков адгезии, подвижности и проколлагена D. Результаты исследования четко показали, что токсичность наночастиц CuO определяется не только её переходом в ионную форму ( $\text{Cu}^{2+}$ ), но и может модулироваться сигнальными каскадами клетки, что приводит к апоптозу [18; 24].

Также НЧ сами по себе могут служить причиной образования активных радикалов, которые, взаимодействуя с органическими молекулами: липидами, белками, нуклеиновыми кислотами, что приводит к развитию окислительного стресса [13].

Кроме того, показано, что индикатором различий в механизмах токсического действия наночастиц CuO и иона  $\text{Cu}^{2+}$  является различная экспрессия белков в жабрах и пищеварительной железе [5].

На сегодняшний день существуют отдельные немногочисленные работы, которые показывают негативное влияние НЧ на такие организмы, как рыбы [12], земноводные [9], человек [27]. Однако работ, посвященных влиянию НЧ на двустворчатых моллюсков, которые представляют интерес как индикаторы загрязнения окружающей среды [14; 25], не много.

В целом к настоящему времени накоплено мало информации о том, что происходит с НЧ металлов при попадании в водную среду, а также об их биоаккумуляции в органах и тканях морских организмов, о биодоступности при хроническом воздействии. Поэтому целью нашей работы являлось сравнение биодоступности НЧ CuO и ионной формы  $\text{Cu}^{2+}$ , а также оценка их влияния на активность ХЭ гемолимфы мидии Грея (*Crenomytilus grayanus*) в лабораторном эксперименте.

## Материалы и методы

Моллюски *C. grayanus* (Dunker, 1853) примерно равного размера ( $13,18 \pm 0,62$  см) были отобраны из акватории о-ва Рейнеке (фоновый район, залив Петра Великого, Японское море) [22]. Исходную группу мидий выдержали в аквариуме в воде из фонового района в течение двух дней после отбора. Затем часть моллюсков препарировали для отбора гемолимфы. Другую часть помещали на 7 сут. в аквариумы с морской водой для акклиматизации. Далее животных разделяли на 2 группы и перемещали в 100-литровые аквариумы, наполненные морской водой из аквариальной установки Национального научного центра морской биологии ДВО РАН из расчета 2 л на 1 экз.

Далее группы по 44 экз. помещали в два аквариума, один – с НЧ CuO (20 мкг/л), другой – с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  (12 мкг/л). Выбранные нами концентрации двух форм Cu, широко используются в экотоксикологических исследованиях для изучения генотоксичности данного элемента [20].

Длительность эксперимента составляла 60 сут. Воду в аквариумах меняли через каждые 24 ч. В течение первых 30 сут. для получения необходимой концентрации НЧ CuO и  $\text{Cu}^{2+}$  в аквариумы вносили по 20 мл соответствующих растворов. В течение следующих 30 сут. длился период «очистки». Для подготовки рабочих растворов в 100 мл дистиллированной воды растворяли 0,0125 г порошка CuO (<50 нм,  $29 \text{ м}^2/\text{г}$ , “Sigma-Aldrich”) и 0,0251 г  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (квалификация – ЧДА). Перед каждым внесением в аквариум растворы перемешивали на ультразвуковой бане (44 кГц) в течение 20 мин. В ходе экспери-

мента каждые 10 сут. отбирали по 5 мидий из каждого аквариума. Мидий препарировали для забора гемолимфы.

В ходе эксперимента измеряли показатели солёности ( $32,11 \pm 1,1\text{‰}$ ), температуры ( $17 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) и pH ( $7,97 \pm 0,32$ ). Также определяли содержание Cu в воде из района сбора моллюсков (о-в Рейнеке,  $0,19 \pm 0,05$  мкг/л) и в месте водозабора для аквариальной ( $0,36 \pm 0,07$  мкг/л). Смертность животных в ходе эксперимента не зафиксирована.

Скорость холинэстеразного гидролиза ацетилтиохолина определяли калориметрическим методом Элмана [11] на спектрофотометре Shimadzu UV-1800PC. Метод основан на реакции взаимодействия реактива Элмана (ДТНБ – 5,5'-дителиобис(2-нитробензойная кислота)), который с продуктом гидролиза субстрата – тиохолином – образует растворимое соединение – тионитробензоатхолин и стехиометрические количества тионитробензоатдианиона (интенсивная желтая окраска с максимумом поглощения при  $\lambda = 412$  нм). Метод позволяет определять скорость ХЭ-гидролиза тиохолиновых эфиров в интервале концентраций субстрата  $10^{-6}$ – $10^{-2}$  М.

Последовательность определения скорости гидролиза включает следующие стадии: к 0,75 мл фосфатного буфера с добавлением ДТНБ в концентрации 1 мМ прибавляют объем субстрата 0,4 мл в концентрации  $2 \cdot 10^{-2}$  мМ. Далее добавляли воду до общего объема пробы 2,4 мл. Прибавляли 0,6 мл фермента и инкубировали в течение 60 с. По истечении указанного времени измеряли оптическую плотность растворов на спектрофотометре при  $\lambda = 412$  нм. Измерения проводили против контрольной пробы.

Контрольная проба: к 0,75 мл фосфатного буфера с концентрацией ДТНБ 1 мМ добавляют воду до общего объема пробы 3 мл. За единицу активности принимали количество гидролизованного субстрата за одну минуту, выраженное на миллиграмм белка в гемолимфе.

Определение содержания белка в гемолимфе проводили по методу Лоури [19].

Концентрацию металлов определяли методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии на приборах Shimadzu-6800F и Shimadzu-6800G. Контроль качества определений включал измерение концентраций металлов в используемых кислотах, дубликатах проб и сертифицированных образцах моллюсков (NBS SRM 1566a и ERM-CE278k). Среднее отклонение для Cu от паспортных данных стандартных образцов составляло 5%. Средние значения концентраций металла и стандартное отклонение определяли с помощью пакета программ Excel. Достоверность различий между выборками определяли по t-критерию Стьюдента с использованием пакета программ Statistica.

### Результаты и обсуждение

Двустворчатый моллюск *C. grayanus* широко используется как в лабораторных, так и в полевых исследованиях, связанных с биоаккумуляцией тяжёлых металлов, хлорорганических пестицидов и радионуклидов, а также при изучении механизмов токсического действия комплексного загрязнения [1; 8; 4; 2; 3].

Ранее в опубликованной работе по материалам данного эксперимента было показано, что в контрольной группе мидий достоверные разнонаправленные

изменения концентрации Cu были выявлены в жабрах (снижение на 10-е сут.) и пищеварительной железе (ПЖ) (повышение на 30-е сут.). Однако в почках контрольных моллюсков содержание этого металла оставалось стабильным в течение всего эксперимента [6].

У мидий из аквариума с ионной формой меди содержание этого металла в жабрах и почках существенно увеличилось на 10-е сут. эксперимента (в 2 и 3 раза соответственно). На 30-е сут. достоверное повышение концентрации металла в жабрах не было скомпенсировано его выведением почками, что привело к достоверному повышению уровня меди в ПЖ. Изменения содержания Cu в органах моллюсков из аквариума с НЧ меди были схожими с контрольной группой [6].

Перераспределение металла между органами и тканями организма происходит через проводящую систему, которая представлена у моллюсков гемолимфой.

Концентрация меди в гемолимфе моллюсков контрольной группы в течение 30-ти суток имела тенденцию к снижению, что, по-видимому, связано с её перераспределением в другие ткани (прежде всего в ПЖ), где отмечено достоверное повышение концентрации этого металла на данной стадии эксперимента [6], очевидно, вызванное значительным повышением содержания растворённой меди в районе забора воды для аквариальной (с 0,26 до 0,46 мкг/л в среднем) на второй стадии эксперимента. Это повышение уровня меди на стадии очистки могло существенно повлиять на накопление исследуемого металла в гемолимфе не только моллюсков контрольной группы, но и двух других. В последующие 30 суток

эксперимента отмечается 6-кратное (на 50-е сутки) увеличение концентрации меди в гемолимфе моллюсков из контрольной группы. Данный факт можно объяснить ещё и запуском механизмов активной регуляции, и, как следствие, увеличением концентрации металла в

гемолимфе при его активном выведении из других тканей.

Эксперимент с использованием наноформы меди показал, что в гемолимфе моллюска концентрация этого металла имеет два выраженных пика на 20-е и 40-е сутки (рис. 1).

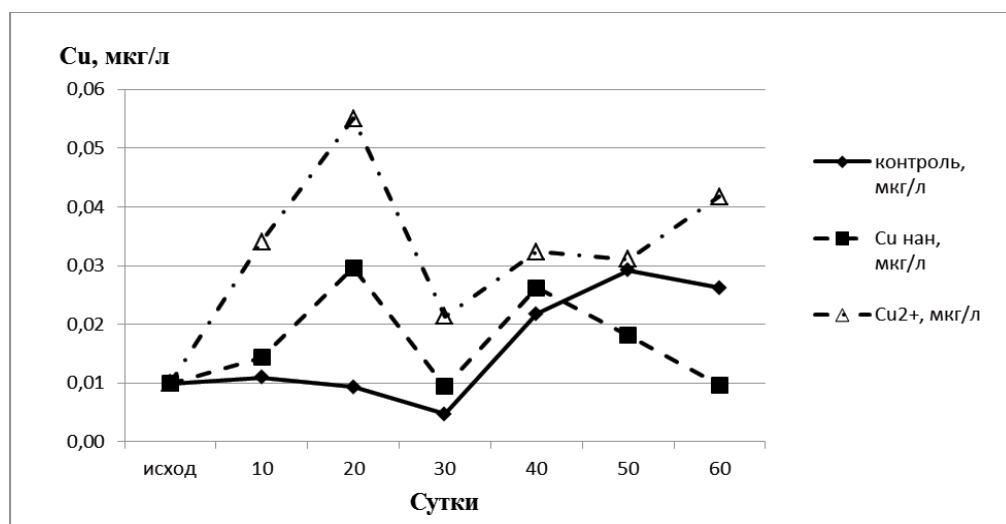


Рис. 1. Динамика изменения концентрации меди в гемолимфе мидии

Полученные данные свидетельствуют о накоплении меди в гемолимфе с её последующим перераспределением по другим органам. Следует отметить, что в данном эксперименте накопления меди в жабрах не отмечалось, но сопровождалось резким увеличением концентрации малонового диальдегида (МДА) в этих органах мидии [5].

На этапе «очистки» (40-е и 50-е сут.), отмечается снижение концентрации меди в гемолимфе (рис. 1), что, по-видимому, связано с её активным выведением после снятия экспериментальной нагрузки. На этот период приходилось и увеличение уровня МДА в 2–2,5 раза в жабрах мидий [5].

Динамика изменений концентрации меди в гемолимфе при использовании в

эксперименте ионной формы металла в целом похожа на таковую для НЧ. К 20-му дню эксперимента отмечается рост концентрации меди в гемолимфе в 6,1 раза. К 30-м суткам эксперимента концентрация меди снижается до 0,0213 мкг/л (в 2,6 раза, по сравнению с 20-м днем эксперимента) (рис. 1). Следует отметить, что в течение первых 30-ти суток эксперимента с ионной формой меди отмечается увеличение концентрации металла в жабрах, при этом содержание меди в пищеварительной железе существенно не повышалось [5].

На этапе «очистки» (40-е и 50-е сутки), отмечается увеличение концентрации меди в гемолимфе, что свидетельствует об активации процессов её выведения (рис. 1).

Введение на протяжении 30 сут. двух форм меди в аквариумы с моллюсками позволило сравнить их биодоступность. Сопоставление динамики концентрации микроэлемента в гемолимфе мидий из аквариума с НЧ CuO и контрольной группой свидетельствует об отсутствии существенного накопления этой формы меди в гемолимфе мидий. Эта закономерность отмечена и для других органов моллюска (жабры, ПЖ и почки) [6]. Такое явление может быть связано с рядом причин, например, с низкой биодоступностью, обусловленной свойствами исследованных нами НЧ меди. В то же время за тот же период в гемолимфе мидии отмечено увеличение концентрации меди в 2,4 раза, что свидетельствует о её активном транспорте через жабры.

Процесс «очистки» в экспериментальных группах также протекал разнонаправленно. К 60-м суткам эксперимента концентрация меди в гемолимфе группы моллюсков, находив-

шихся под действием НЧ, была в 2,7 раза ниже, чем в контрольной группе (рис. 1). В эксперименте с ионной формой концентрация меди к окончанию эксперимента была в 1,6 раза выше, чем в контрольной группе. Данный факт можно объяснить более высокими концентрациями накопленного металла в различных органах мидии и динамикой (скоростью) его выведения.

Динамика изменения холинэстеразной активности у контрольной группы в первые 20 суток эксперимента изменений не претерпевала. При этом отмечается резкое падение активности фермента на 30-е сутки эксперимента, которое происходит на фоне снижения концентрации меди в гемолимфе мидии. В дальнейшем, при увеличении уровня содержания металла в гемолимфе на 40–50-е сутки эксперимента, активность холинэстеразы возвращалась к исходному уровню (рис. 2).

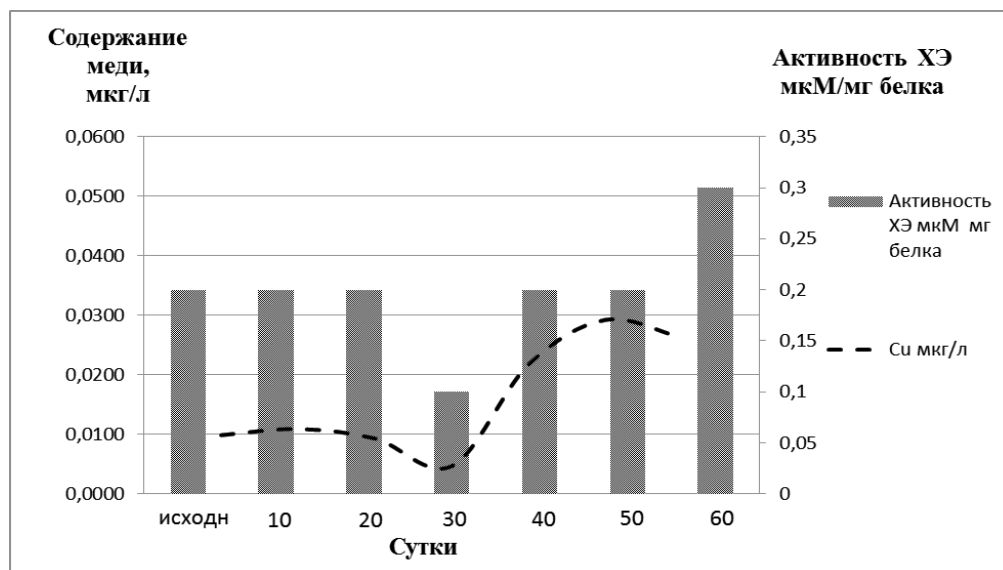


Рис. 2. Динамика изменения концентрации меди и активности ХЭ в гемолимфе мидии (контроль)

На время окончания эксперимента (60-е сутки) активность фермента в гемолимфе увеличивалась на 50% по сравнению с исходной, на фоне некоторого снижения содержания меди. Данную динамику активности холинэстеразы, вероятно, можно объяснить значительными колебаниями содержания меди в гемолимфе контрольной группы моллюсков на второй стадии эксперимента (коэффициент вариации более 50%) (рис. 1). Так, ранее было показано, что различные концентрации металлов (в том числе меди) могут разнонаправленно влиять на активность холинэстеразы в тканях моллюсков [16].

Обычно активирующее действие катионов связывают с возможностью образования тройного комплекса «фермент – металл – субстрат», обеспечивающего конформационно наиболее благоприятные условия для протекания ферментативной реакции. В то же

время ингибирующий эффект линейно связан с концентрацией эффектора. В случае же активации этот процесс имеет более сложную зависимость от концентрации ионов металлов. Прежде всего, увеличение каталитической активности наблюдается в небольшом интервале концентраций. Отклонение концентрации от оптимальной приводит к уменьшению каталитической активности фермента, вплоть до уровня контрольного опыта. При больших концентрациях солей активный центр молекулы может быть занят ионами металла и окажется недоступным для катионов субстрата. Вследствие этого может снижаться каталитическая активность нативной ХЭ.

У мидий из аквариума с ионной формой меди содержание этого металла в гемолимфе увеличивалось и достигало максимума на 20-е сут. эксперимента, что в 5 раз превышало его исходный уровень (рис. 3).

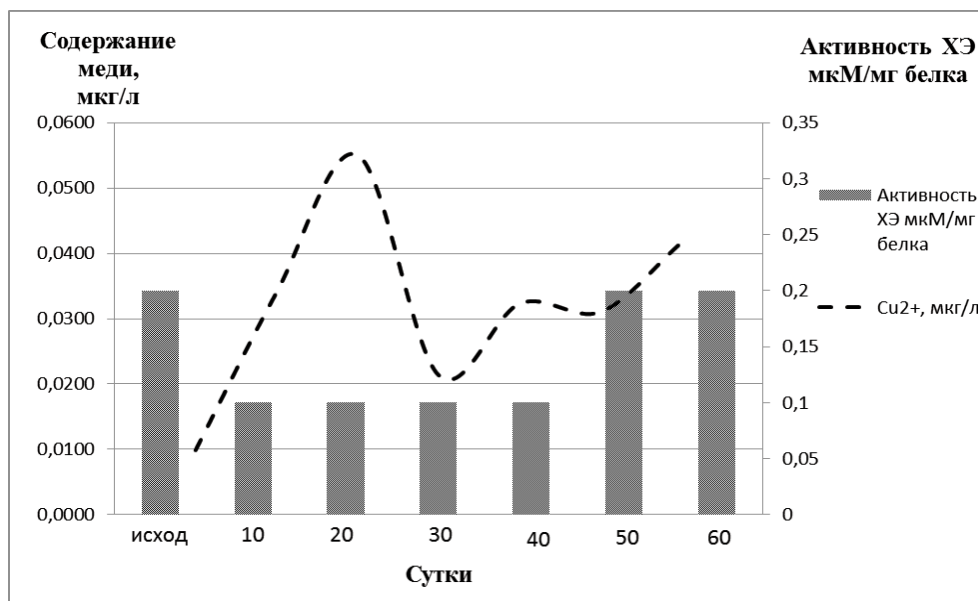


Рис. 3. Динамика изменения концентрации меди и активности ХЭ в гемолимфе мидии (ионная форма меди)

Концентрация меди, используемая в лабораторном эксперименте, в 2,4 раза превышала её содержание в среде натурального эксперимента. Такое различие концентраций не привело к большому накоплению этого металла в органах экспериментальной группы моллюсков, по сравнению с мидиями из натурального эксперимента [5].

Увеличение концентрации ионной формы меди на данном этапе нашего эксперимента приводило к снижению активности холинэстеразы в гемолимфе мидий по сравнению с исходным значением. На 30-е сутки эксперимента количество меди в гемолимфе резко сокращалось, что не приводило к существенному изменению уровня холинэстеразной активности. В то же время на 30-е сутки отмечалось достоверное повышение уровня меди в ПЖ [5]. На этапе «очистки» (40-е и 60-е сутки), отмечается увеличение концентрации

меди и последовавший (на 50-е сутки) рост активности ХЭ в гемолимфе. Возможно, это связано с токсичным воздействием иона на организм в целом в первые 30 суток эксперимента (период «нагрузки»), что привело к снижению активности холинэстеразы в гемолимфе (рис. 3). В дальнейшем, при прекращении введения иона меди в среду обитания моллюска, несмотря на повышение концентрации меди в гемолимфе, уровень активности холинэстеразы увеличивался до исходного, что, по-видимому, связано со снижением токсичного влияния иона меди на организм в целом.

У моллюсков из аквариума с НЧ меди наибольшая величина холинэстеразной активности наблюдалась на 20-е сутки эксперимента, что совпадало с наибольшей концентрацией меди в гемолимфе моллюска (рис. 4). При этом величина активности фермента

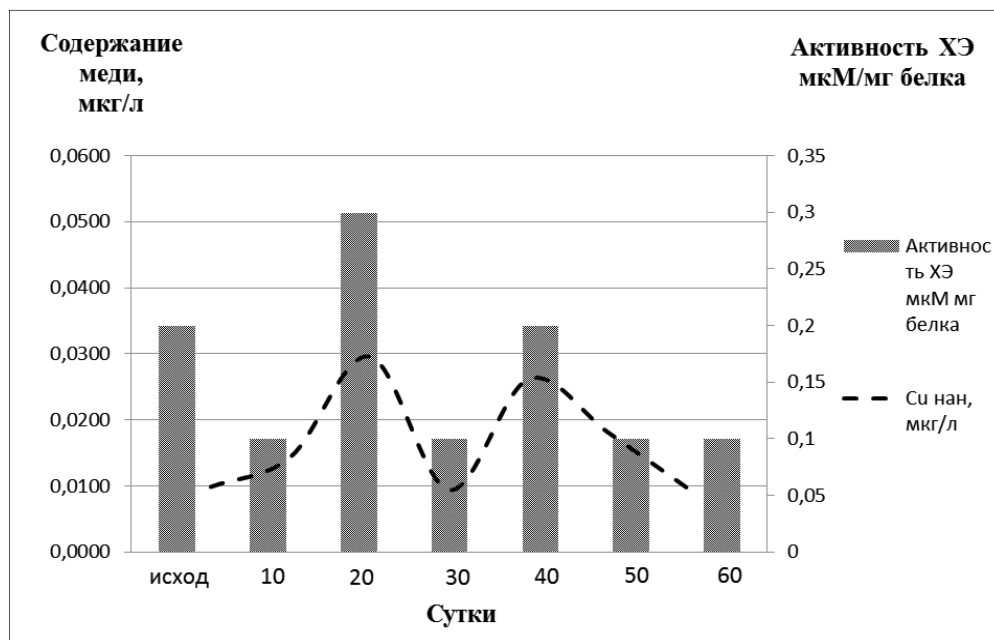


Рис 4. Динамика изменения концентрации меди и активности ХЭ в гемолимфе мидии (нано форма меди)



была почти на 30% выше по сравнению с исходной. На 30-е сутки эксперимента наблюдается снижение концентрации меди в гемолимфе моллюсков до исходного уровня, а также падение активности холинэстеразы в 2 раза по сравнению с исходным значением. На стадии «очистки» на 40-е сутки наблюдается увеличение концентрации меди и повышение активности холинэстеразы в гемолимфе мидии. В целом следует отметить, что повышение концентрации меди четко коррелирует со всплесками активности фермента в гемолимфе моллюска. В дальнейшем период «очистки» сопровождался снижением концентрации меди и уменьшением активности ХЭ в гемолимфе (рис. 4). Активирующее действие наночастиц оксида меди, по-видимому, связано с аллостерическим влиянием частиц на продуктивную конформацию фермента.

Таким образом, показано, что в начальный период эксперимента («нагрузка») динамика изменения активности ХЭ в гемолимфе зависела от использованной в эксперименте формы меди. В случае ионной формы отмечено снижение активности ХЭ при повышении концентрации меди в гемолимфе. В случае НЧ меди отмечается обратная зависимость.

Динамика изменения активности ХЭ в период «очистки» гемолимфы также зависела от формы меди: в случае ионной формы активность ХЭ возрастала при увеличении концентрации меди в гемолимфе; в случае НЧ меди отмечено снижение обоих показателей в данный период.

Следует отметить, что в ходе эксперимента с наночастицами CuO в конце эксперимента холинэстеразная активность в гемолимфе мидии не восстанавливалась до исходных значений, и была в 2 раза ниже исходного уровня.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кавун В.Я., Шулькин В.М. Изменение микроэлементного состава органов и тканей двустворчатого моллюска *Crenomytilus grayanus* при акклиматизации в биотопе, хронически загрязненном тяжелыми металлами // Биология моря. 2005. Т. 31. № 2. С. 123–128.
2. Ковалев Н.Н. Адаптивная роль холинэстеразы гемолимфы двустворчатых моллюсков // Известия ТИНРО. 2003. Т. 133. С. 97–103.
3. Ковалев Н.Н., Кавун В.Я., Костецкий Э.Я., Михеев Е.В., Подгурская О.В. Холинэстеразная активность гемолимфы мидии *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) (Bivalvia: Mytilidae), обитающей в импактных природных и антропогенных условиях // Биология моря. 2016. Т. 42. № 1. С. 41–47.
4. Подгурская О.В., Кавун В.Я. Оценка адаптационно-защитного потенциала двустворчатых моллюсков *Modiolus modiolus* (Linnaeus, 1758) и *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) в условиях повышенного содержания тяжелых металлов в среде // Биология моря. 2012. Т. 38. № 2. С. 174–182.
5. Фадеева Ю.И., Слободскова В.В., Кавун В.Я., Челомин В.П. Влияние наночастиц оксида меди (II) и иона Cu на образование продуктов перекисного окисления липидов в жабрах мидии Грея *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) (Bivalvia: Mytilidae) в условиях лабораторного эксперимента // Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки. 2016. № 3. С. 74–83.
6. Фадеева Ю.И., Кавун В.Я., Слободскова В.В., Челомин В.П. Влияние оксида меди (II)

- и иона Cu на изменение микроэлементного состава органов мидии Грея *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) (Bivalvia: Mytilidae) в условиях лабораторного и натурального экспериментов // Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки. 2016. № 3. С. 84–97.
7. Amelia M., Lincheneau C., Silvi S., Credi A. Electrochemical properties of CdSe and CdTe quantum dots // Chem. Soc. Rev. 2012. Vol. 41, no 17. P. 5728–5743.
  8. Belcheva N.N., Zakhartsev M.V., Dovzhenko N.V., Zhukovskaya A.F., Kavun V.Ya., Chelomin V.P. Anthropogenic pollution stimulates oxidative stress in soft tissues of mussel *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) // Ocean Sci. J. 2011. Vol. 46, no 2. P. 85–94.
  9. Canesi L., Ciacci C., Fabbri R. [et. al]. Bivalve mollusks as a unique target group for nanotoxicity // Mar. Environ. Res. 2012. Vol. 76. P. 16–21.
  10. Chang Y.N., Zhang M., Lin X., Zhang J., Gengmei X. The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles // Materials. 2012. Vol. 5. P. 2850–2871.
  11. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // Biochem. Pharmacol. 1961. Vol. 7, no 1. P. 88–95.
  12. Federici G., Shaw B.J., Handy R.D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects // Aquat. Toxicol. 2007. Vol. 87. P. 415–430.
  13. Gomes T., Pinheiro J.P., Cancio I. et al. Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis* // Environ. Sci. Technol. 2011. Vol. 45, no. 21. P. 9356–9362.
  14. Gorbi S., Lamberti C.V., Notti A. et al. An ecotoxicological protocol with caquet mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic Sea // Mar. Environ. Res. 2008. Vol. 65, no. 1. P. 34–49.
  15. Joh D.Y.; Kinder J.; Herman L.H.; Ju S.Y.; Segal M.A.; Johnson J.N.; Chan G. K.L.; Park J. Single-walled carbon nanotubes as excitonic optical wires // Nat. Nanotechnol. 2011. Vol. 6. P. 51–56.
  16. Kopecka-Pilarczyk J., In vitro effects of pesticides and metals on the activity of acetylcholinesterase (AChE) from different tissues of the blue mussel, *Mytilus trossulus* L. // Journal of Environmental Science and Health. Part B. 2010. Vol. 45. P. 46–56.
  17. Laurent S.; Forge D.; Port M.; Roch A.; Robic C.; van der Elst L.; Muller R.N. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications // Chem. Rev. 2008. Vol. 108. P. 2064–2110.
  18. Lopez, J.L. Role of proteomics in taxonomy: the *Mytilus* complex as a model of study // J.Chromatogr. 2005. Vol. 815. P. 261–274.
  19. Lowry O., Rosenbrougt N., Parr A., Randall R. Protein measurement with the Folinphenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, no 1. P. 265–276.
  20. Moore M.N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? // Environ. Int. 2006. Vol 32. P. 967–976.
  21. Nations S., Wages M., Canas J.E., Maul J., Theodorakis C., Cobb G.P. Acute effects of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnO and CuO nanomaterials on *Xenopus laevis* // Chemosphere. 2011. Vol. 83. P. 1053–1061.
  22. Shulkin V.M., Presley B.J., Kavun V.Ya. Metal concentration in mussel *Crenomytilus grayanus* and oyster *Crassostera gigas* in relation to contamination of ambient sediments // Environ. Int. 2003. Vol. 29, no. 4. P. 493–502.
  23. Tang F., Li L., Chen D. Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug delivery // Adv. Mater. 2012. Vol. 24. P. 1504–1534.
  24. Thompson E.L., Taylor D.A., Nair S.V., Birch G., Haynes P.A., Raftos D.A. Proteomic discovery

- of biomarkers of metal contamination in Sydney Rock oysters (*Saccostrea glomerata*) // *Aquat. Toxicol.* 2012. Vol. 109. P. 202–212.
25. Tsangaris C., Kormas K., Stroglyoudi E. [et al]. Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline // *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 2010. Vol. 151, no. 3. P. 369–378.
26. Yan L., Zheng Y.B., Zhao F., Li S., Gao X., Xu B., Weiss P.S., Zhao Y. Chemistry and physics of a single atomic layer: Strategies and challenges for functionalization of graphene and graphene-based materials // *Chem. Soc. Rev.* 2012. Vol. 41. P. 97–114.
27. Wang Z., Li N., Zhao J. [et. al]. CuO Nanoparticles Interaction with Human Epithelial Cells: Cellular Uptake, Location, Export, and Genotoxicology // *Chem. Res. Toxicol.* 2012. Vol. 25. P. 1512–1521.

#### REFERENCES

1. Kavun V.Ya., Shul'kin V.M. Izmenenie mikroelementnogo sostava organov i tkanei dvustvorchatogo mollyuska *Crenomytilus grayanus* pri akklimatizatsii v biotope, khronicheski zagryaznennom tyazhelymi metallami [Change of microelement composition of organs and tissues of the bivalve mollusc *Crenomytilus grayanus* during the acclimatization in the biotope, chronically polluted with heavy metals]. *Biol. morya*, 2005, vol. 31, no. 2, pp. 123–128.
2. Kovalev N.N. Adaptivnaya rol' kholinesterazy gemolimfy dvustvorchatykh mollyuskov [The adaptive role of cholinesterase hemolymph of bivalves]. *Izv. TINRO [Izv. TINRO]*. 2003, no. 133, pp. 97–103.
3. Kholinesteraznaya aktivnost' gemolimfy midii *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) (Bivalvia: Mytilidae), obitayushchei v impaktnykh prirodnykh i antropogennykh usloviyakh [Cholinesterase activity of the hemolymph of the mussel *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) (Bivalvia: Mytilidae) living under the impact of natural and anthropogenic conditions], Kovalev N.N., Kavun V.Ya., Kostetskii E.Ya., Mikheev E.V., Podgurskaya O.V. *Biol. morya*, 2016, vol. 42, no. 1, pp. 41–47.
4. Podgurskaya O.V., Kavun V.Ya. Otsenka adaptatsionno-zashchitnogo potentsiala dvustvorchatykh mollyuskov *Modiolus modiolus* (Linnaeus, 1758) i *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) v usloviyakh povyshennogo soderzhaniya tyazhelykh metallov v srede [Evaluation of adaptive-protective potential of bivalve molluscs *Modiolus modiolus* (Linnaeus, 1758) and *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) in conditions of a high content of heavy metals in the environment]. *Biol. morya*, 2012, vol. 38, no. 2, pp. 174–182.
5. Fadeeva Yu.I., Slobodskova V.V., Kavun V.Ya., Chelomin V.P. Vliyanie nanochastits oksida medi (II) i iona Cu na obrazovanie produktov perekisnogo okisleniya lipidov v zhabrakh midii *Greya Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) (Bivalvia: Mytilidae) v usloviyakh laboratornogo eksperimenta [Slobodskoy V.V., Kavun V.Ya., Chelomin V.P. Effect of nanoparticles of copper oxide (II) and Cu ion on the formation of products of lipid peroxidation in the gills of the mussel *Crenomytilus gray grayanus* (Dunker, 1853) (Bivalvia: Mytilidae) in conditions of a laboratory experiment]. *Vestnik Moskovskogo gosudarstvennogo oblastnogo universiteta*. Seriya: Estestvennye nauki, 2016, no. 3, pp. 74–83.
6. Vliyanie oksida medi (II) i iona Cu na izmenenie mikroelementnogo sostava organov midii *Greya Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) (Bivalvia: Mytilidae) v usloviyakh laboratornogo i naturnogo eksperimentov [The effect of copper oxide (II) and Cu ion on the change in trace element composition of the organs of mussels *Crenomytilus gray grayanus* (Dunker, 1853) (Bivalvia: Mytilidae) under laboratory and field experiments], Fadeeva Yu.I., Kavun V.Ya., Slobodskova V.V., Chelomin V.P. *Vestnik Moskovskogo gosudarstvennogo oblastnogo universiteta*. Seriya: Estestvennye nauki, 2016, no. 3, pp. 84–97.
7. Amelia M., Lincheneau C., Silvi S., Credi A. Electrochemical properties of CdSe and CdTe

- quantum dots. *Chem. Soc. Rev.*, 2012, vol. 41, no 17, pp. 5728–5743.
8. Belcheva N.N., Zakhartsev M.V., Dovzhenko N.V., Zhukovskaya A.F., Kavun V.Ya., Chelomin V.P. Anthropogenic pollution stimulates oxidative stress in soft tissues of mussel *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853). *Ocean Sci. J.*, 2011, vol. 46, no 2, pp. 85–94.
  9. Canesi L., Ciacci C., Fabbri R. et al. Bivalve mollusks as a unique target group for nanotoxicity. *Mar. Environ. Res.*, 2012, vol. 76, pp. 16–21.
  10. Chang Y.N., Zhang M., Lin X., Zhang J., Gengmei X. The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. *Materials*, 2012, vol. 5, pp. 2850–2871.
  11. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 1961, vol. 7, no 1, pp. 88–95.
  12. Federici G., Shaw B.J., Handy R.D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.*, 2007, vol. 87, pp. 415–430.
  13. Gomes T., Pinheiro J.P., Cancio I. et al. Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environ. Sci. Technol.*, 2011, vol. 45, no. 21, pp. 9356–9362.
  14. Gorbi S., Lamberti C.V., Notti A. et al. An ecotoxicological protocol with caquet mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic Sea. *Mar. Environ. Res.*, 2008, vol. 65, no. 1, pp. 34–49.
  15. Joh D.Y., Kinder J., Herman L.H., Ju S.Y., Segal M.A., Johnson J.N., Chan G.K.L., Park J. Single-walled carbon nanotubes as excitonic optical wires. *Nat. Nanotechnol.*, 2011, vol. 6, pp. 51–56.
  16. Kopecka-Pilarczyk J., In vitro effects of pesticides and metals on the activity of acetylcholinesterase (AChE) from different tissues of the blue mussel, *Mytilus trossulus* L. *Journal of Environmental Science and Health*, part B, 2010, vol. 45, pp. 46–56.
  17. Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., van der Elst L., Muller R.N. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem. Rev.*, 2008, vol. 108, pp. 2064–2110.
  18. Lopez J.L. Role of proteomics in taxonomy: the *Mytilus* complex as a model of study. *J. Chromatogr.*, 2005, vol. 815, pp. 261–274.
  19. Lowry O., Rosenbrougt N., Parr A., Randall R. Protein measurement with the Folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, no 1, pp. 265–276.
  20. Moore M.N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ. Int.*, 2006, vol. 32, pp. 967–976.
  21. Nations S., Wages M., Canas J.E., Maul J., Theodorakis C., Cobb G.P. Acute effects of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnO and CuO nanomaterials on *Xenopus laevis*. *Chemosphere*, 2011, vol. 83, pp. 1053–1061.
  22. Shulkin V.M., Presley B.J., Kavun V.Ya. Metal concentration in mussel *Crenomytilus grayanus* and oyster *Crassostera gigas* in relation to contamination of ambient sediments. *Environ. Int.*, 2003, vol. 29, no. 4, pp. 493–502.
  23. Tang F., Li L., Chen D. Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Adv. Mater.*, 2012, vol. 24, pp. 1504–1534.
  24. Thompson E.L., Taylor D.A., Nair S.V., Birch G., Haynes P.A., Raftos D.A. Proteomic discovery of biomarkers of metal contamination in Sydney Rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Aquat. Toxicol.*, 2012, vol. 109, pp. 202–212.
  25. Tsangaris C., Kormas K., Stroglyoudi E. et al. Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.*, 2010, vol. 151, no. 3, pp. 369–378.
  26. Yan L., Zheng Y.B., Zhao F., Li S., Gao X., Xu B., Weiss P.S., Zhao Y. Chemistry and phys-

- ics of a single atomic layer: Strategies and challenges for functionalization of graphene and graphene-based materials. *Chem. Soc. Rev.*, 2012, vol. 41, pp. 97–114.
27. Wang Z., Li N., Zhao J. et. al. CuO Nanoparticles Interaction with Human Epithelial Cells: Cellular Uptake, Location, Export, and Genotoxicology. *Chem. Res. Toxicol.*, 2012, vol. 25, pp. 1512–1521.
- 

#### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

*Ковалев Николай Николаевич* – доктор биологических наук, проректор по научной и инновационной работе; профессор кафедры пищевой биотехнологии Дальневосточного государственного технического рыбохозяйственного университета;  
e-mail: kovalevnn61@yandex.ru

*Михеев Евгений Валерьевич* – кандидат технических наук, старший научный сотрудник НИЦ «Морские биотехнологии» Дальневосточного государственного технического рыбохозяйственного университета;  
e-mail: eugene2279@mail.ru

*Кавун Виктор Яковлевич* – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии Национального научного центра морской биологии ДВО РАН;  
e-mail: Vkavun11@mail.ru

#### INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

*Nikolaj N. Kovalev* – Doctor of Biological Sciences, Vice-Rector for Scientific and Innovation Affairs, professor of the Department of Food Biotechnology at the *Far Eastern State Technical Fisheries University*;  
e-mail: kovalevnn61@yandex.ru

*Eugene V. Ya. Mikheev* – PhD in Technical Sciences, senior researcher of the Scientific Research Center of Marine Biotechnology at the *Far Eastern State Technical Fisheries University*;  
e-mail: eugene2279@mail.ru

*Victor Kavun* – PhD in Biological Sciences, senior researcher of the Physiology Laboratory at the National Scientific Center of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences;  
e-mail: Vkavun11@mail.ru

#### ПРАВИЛЬНАЯ ССЫЛКА НА СТАТЬЮ

Ковалев Н.Н., Михеев Е.В., Кавун В.Я. Влияние наночастиц оксида меди (Ii) и иона Cu на холинэстеразную активность гемолимфы мидии Грея *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) (Bivalvia: mytilidae) в условиях лабораторного эксперимента // Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки. 2017. № 3. С. 14–26.

DOI: 10.18384/2310-7189-2017-3-14-26

#### THE CORRECT REFERENCE TO ARTICLE

N. Kovalev, E. Mikheev, V. Kavun. Influence of Copper Oxide (Ii) Nanoparticles and Cu Ion on Cholinesterase Activity of Hemolymph Mussels *Crenomytilus Grayanus* (Dunker, 1853) (Bivalvia: Mytilidae) in the Conditions of a Laboratory Experiment. In: *Bulletin of Moscow Region State University*. Series: Natural Sciences, 2017, no. 3, pp. 14–26.

DOI: 10.18384/2310-7189-2017-3-14-26