

УДК 546.302:574.64:597.2/.5

ВПЛИВ НАНОАКВАЦИТРАТИВ ПЕРЕХІДНИХ МЕТАЛІВ НА ЕМБРІОНАЛЬНИЙ РОЗВИТОК *Danio rerio*

О.О. Кравченко*, асистент

І.А. Злацький**, кандидат біологічних наук

В.Ф. Коваленко**, кандидат біологічних наук

В.І.Максін*, доктор хімічних наук

*Національний університет біоресурсів і природокористування України

**Інститут колоїдної хімії та хімії води ім. А.В. Думанського НАН України

Обґрунтовано вибір ембріонів *Danio rerio* для оцінки токсичності препаратів, отриманих методами нанотехнологій. Проаналізовано вплив різних концентрацій наноаквацитратів на ембріони та появу в них летальних та сублетальних ефектів. Оцінено можливість безпечного використання препаратів у практичних цілях.

Вступ. Серед водних організмів найрозповсюдженішим тест-об'єктом є риби. Широке використання *D. rerio* (в англomовній літературі "zebrafish") як модельного об'єкту в біології, медицині та екології [9,11,14] обумовлене такими властивостями: стрімкий розвиток; значна відтворюваність; швидка тривалість експерименту; висока чутливість; легкість маніпуляцій з геномом [12].

У країнах Західної Європи та Північної Америки великої популярності набув ембріотест [8]. Аналіз зміни розвитку на ранніх стадіях щодо дії токсикантів дає змогу прослідкувати та спрогнозувати зміни, які можуть відбуватися на рівні статевозрілих представників. Крім цього, досліді на дорослих особинах в багатьох країнах заборонено, тому ембріотест є одним з альтернативних варіантів.

D. rerio може продукувати ікру вже на 3–6 місяці життя. Нерест стимулюється різкими змінами освітлення, наявністю рослинності та пом'якшенням води. Опти-

мальними умовами є: температура води 25–28°C, dH до 10°, рН 6–7. Яйця доволі великі, до 1 мм у діаметрі. Продуктивність самок 50–200 ікринок за один нерест, а інтервали між двома нерестами складають в середньому 6–10 діб. Вивчено зміни на різних стадіях розвитку ембріонів, які призводять до невідворотних порушень та подальшої загибелі. Отже, використання ембріонів *D. rerio* завдяки вже згадуваним перевагам, а також відомій стадійності розвитку є рекомендованим і стандартизованим біотестом в біологічних та хімічних дослідженнях [13].

В Україні великого розповсюдження набули сполуки, отримані методами нанотехнологій, які мають назву — наноаквахелати, а у випадку використання лимонної кислоти — наноаквацитрати. Доведено, що вони мають унікальну властивість — проникнення через шкіру, шлунковий, плацентарний, гемато-енцефалітний бар'єр [3]. Тому їх токсичність та безпечність широкомасштабного вико-

ристання залишаються недостатньо вивченими.

Мета нашої роботи — оцінка ступеню токсичності наноаквацитратів металів для ембріонів *D. rerio* та аналіз безпечності їх використання для практичних потреб.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проводили на базі лабораторії біомаркерів та біотестування вод Інституту колоїдної хімії та хімії води ім. А.В. Думанського НАН України.

Для оцінювання токсичності та перевірки безпечності в рибицтві речовин, отриманих методами нанотехнологій, використовували різні концентрації наноаквацитратів срібла, заліза, цинку, суміші срібла та міді. Синтез їх здійснювали в два етапи. Спочатку шляхом диспергування високочистих гранул відповідних металів імпульсами електричного струму в деіонізованій воді отримували водний колоїдний розчин наночасток мікроекLEMENTів. На другому етапі одержували власне цитрати біогенних металів за реакцією прямої взаємодії високо хімічно-активних наночасток з харчою лимонною кислотою.

Оскільки до числа реагентів не входили інші речовини, а наночастки повністю брали участь в хімічній реакції утворення солей карбонових кислот, в результаті утворювалися продукти високої хімічної чистоти.

Отримання ембріонів відбувалося за наступною схемою: використовували групу статевозрілих особин *D. rerio*, яких утримували в скляних акваріумах з постійною аерацією та фільтрацією води за температури 26°C. Годували рибу стандартними сухими кормами із додаванням живих. Відношення світлової до темної фази 12:12. Для дослідів відбирали групи самців і самок у співвідношенні 2:1 в невеликому скляному акваріумі з аерацією не менше 80 %, температурою 26°C за стандартною методикою [10].

З метою стимуляції нересту до акваріуму додавали штучні рослини. Чергування світлової та темної фази відбувалося шляхом накривання темним ковпаком на 12 год. Нерест та запліднення відбувалися протягом 30–60 хв після стимулювання його світлом, потім риб відловлювали й виймали чашки з ікрою. Розвиток яйця відбувався через 15 хв після запліднення. Дроблення починалося після акумулювання на анімальному полюсі цитоплазми, де вона огортає яйце зиготи. Процес проходив тільки в бластодиску з утворенням 2–32 клітинних бластотомів. На цих стадіях було легко відрізнити запліднену ікру від незаплідненої, яка не може бути використана для експерименту (незапліднена ікра буде більш темною, а потім каламутно-білою). Для проведення досліду кількість заплідненої ікри не могла бути меншою ніж 50%. Її розміщали в 10 мм чашки Петрі з додаванням розчинів наноаквацитратів з концентрацією 0,01 та 0,02 мг/дм³, приготуваних на контрольній воді, якою слугувала штучна вода середньої твердості (до дистильованої води додавали солі натрію, калію, кальцію та магнію), що за своїм складом відповідала ідеальній питній. Результати вважалися дійсними, якщо в контролі загинуло не більше 10% ембріонів.

Кожне розведення тестували на 10 ембріонах за 72-годинного інкубування. На кожен ембріон відбирали по 2 мл відповідного досліджуваного розчину.

На рис. 1–2 наведено приклади оптимального розвитку, а також сублетальних та летальних порушень: коагуляція, відсутність серцебиття на другу добу і відділення хвоста ембріону. Також помітними проявами сублетальних ефектів є відсутність пігментації та порушення розвитку очного яблука. Спостереження здійснювали за допомогою бінокулярного мікроскопа, записували дані або фо-

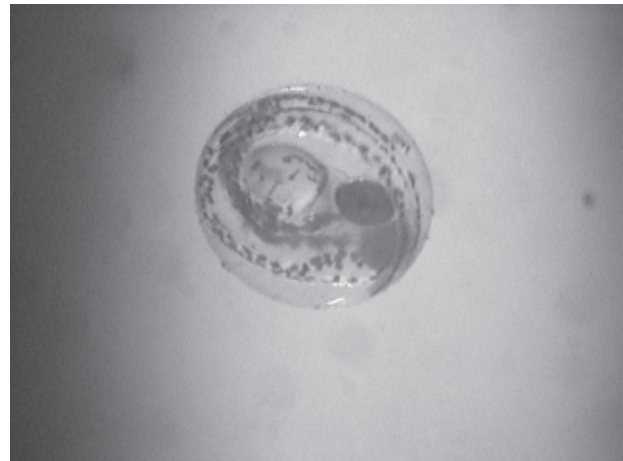
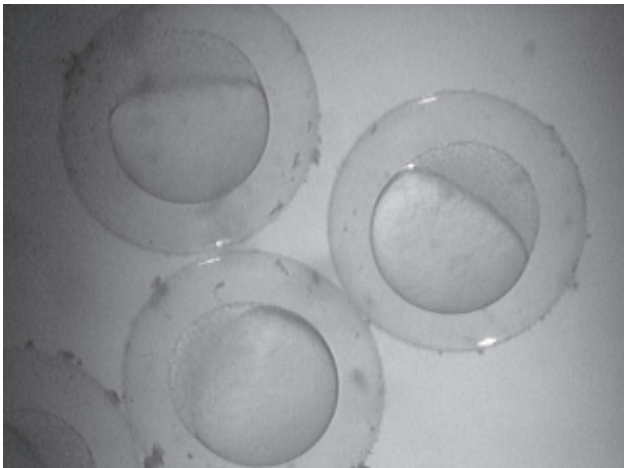


Рис. 1. Оптимальний розвиток ембріону *D. rerio* на стадії дроблення (ліворуч) та через 48 год після початку експерименту (праворуч)

тографували цифровою веб-камерою. Статистичну обробку проводили за допомогою програми MS Excel.

Результати дослідження та їх обговорення. Концентрації від 0,01 до 0,02 мг/дм³ було вибрано, оскільки вони чинять антибактеріальну дію, але не є токсичними для дорослих особин на клітинному та організмовому рівнях [5]. На рис. 3–6 наведено дані щодо рівня виживаності й появи сублетальних ефектів на ембріонах *D. rerio* за умови впливу обраних концентрацій наноаквацитратів металів у порівнянні з контролем.

Експериментальні дані виражені у вигляді залежності відсотку виживаності

особин (рис. 3,5) або відсотку здорових особин (рис. 4,6) від тривалості експерименту.

Як видно з рис. 3–6, найбільше виживання спостерігали в контролі, де смертність ембріонів не перевищувала 10%. Відсоток смертності ембріонів в інших варіантах зростає із підвищенням концентрації наноаквацитратів і тривалості експозиції. Таке явище спостерігалось дослідниками в експериментах з йонними формами перехідних металів та гідробіонтами різних трофічних рівнів [2,6,7]. Підвищення загибелі ембріонів частіше відбувається у часовому інтервалі від 24 до 48 год. У той же час, аналізу-

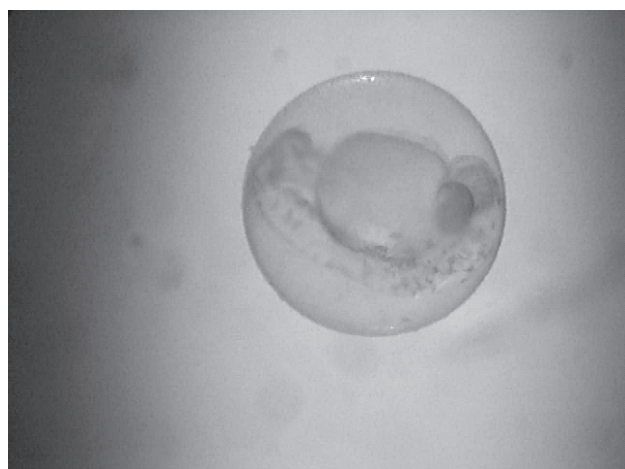
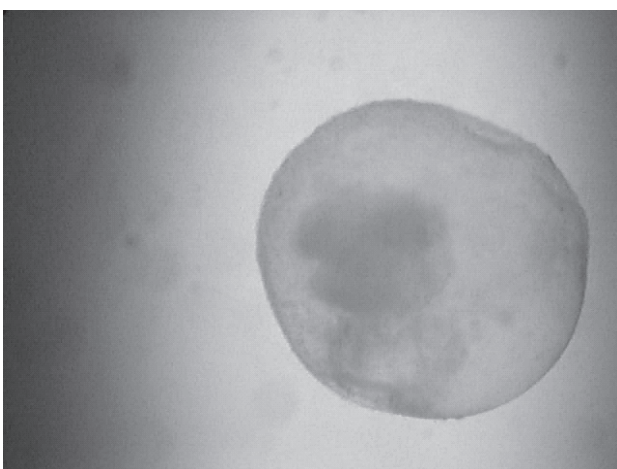


Рис. 2 Сублетальні та летальні порушення розвитку: коагуляція та загибель ембріону (ліворуч); відсутність відходження хвоста (праворуч)

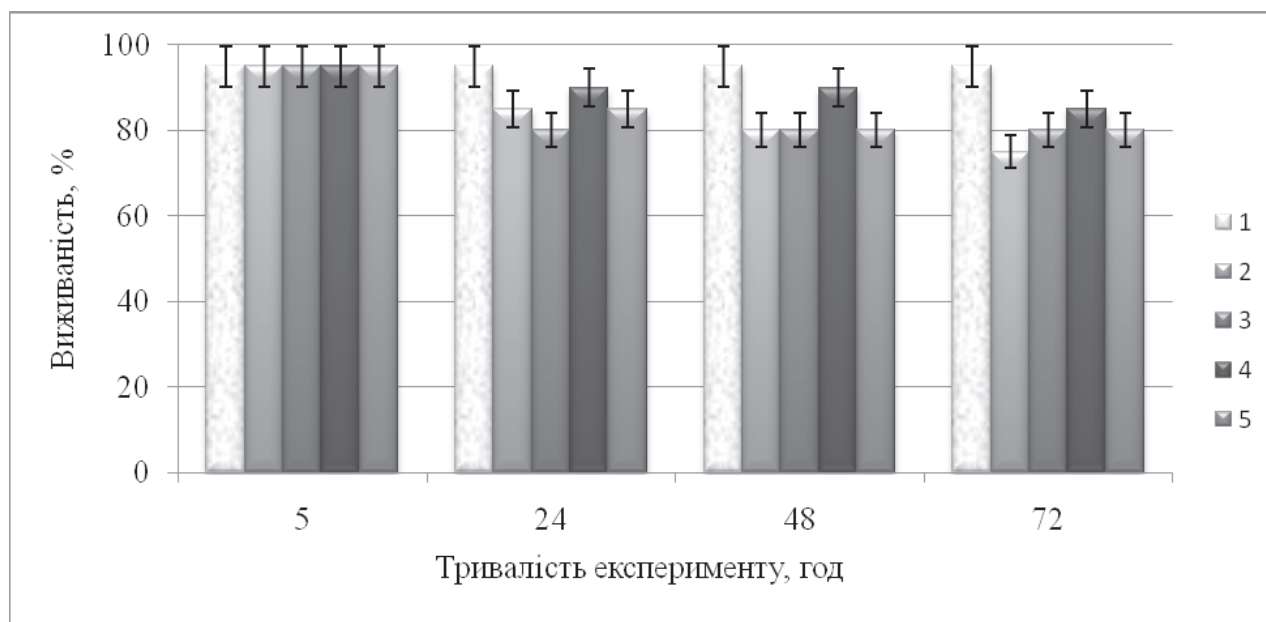


Рис. 3. Дія досліджуваних концентрацій наноаквацитратів срібла і суміші сріблі та міді на ембріони *D. rerio*: №1 - контроль, №2 - 0,01 мг/дм³ Ag; №3- 0,02 мг/дм³ Ag; №4 - 0,01 мг/дм³ Ag, Cu; №5 - 0,02 мг/дм³ Ag, Cu ($p < 0,05$)

ючи діаграми, необхідно зазначити, що летальний ефект у варіантах з наноаквацитратами металів є майже однаковим. В усіх групах ембріонів через 72 год експозиції залишалися живими близько 80–90% особин.

У цілому вивчені наноаквацитрати можна розташувати в такому порядку зменшення їх токсичності для ембріонів *D. rerio*: срібло > залізо > цинк.

Отже, ембріони є більш стійкими до дії наноаквацитратів цинку в порівнянні

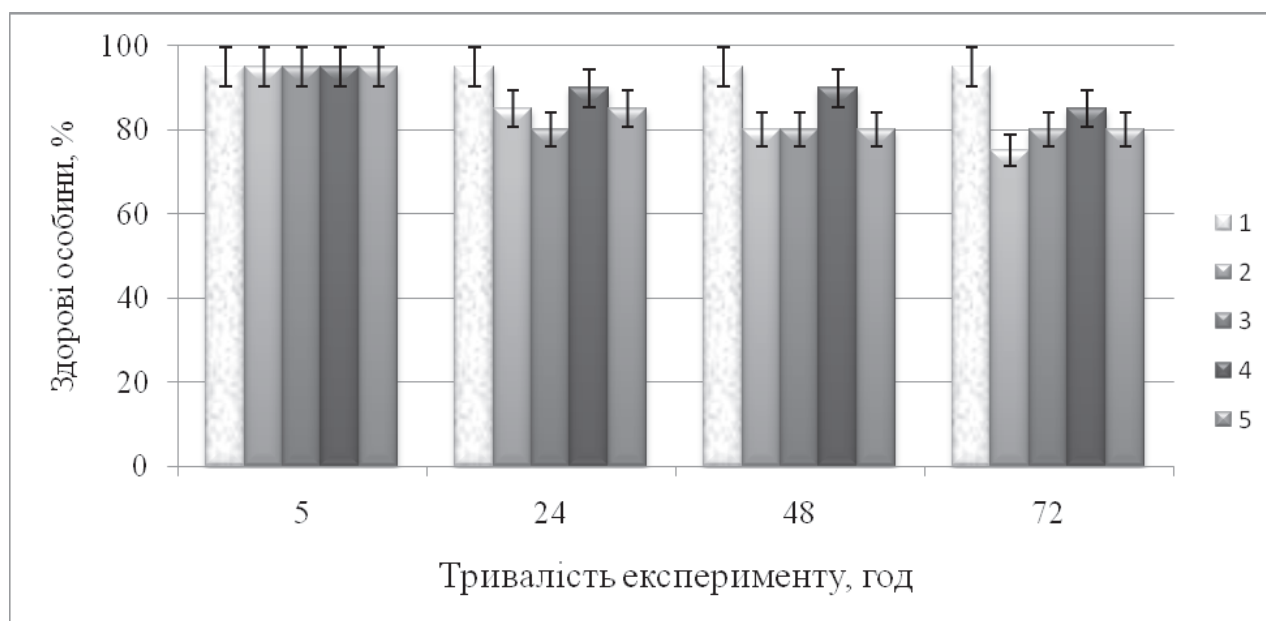


Рис. 4. Утворення сублетальних ефектів при впливі різних концентрацій наноаквацитратів срібла та суміші сріблі і міді на ембріони *Danio rerio*: №1- контроль №2 - 0,01 мг/дм³ Ag; №2- 0,02 мг/дм³ Ag; №3 - 0,01 мг/дм³ Ag, Cu; №4 - 0,02 мг/дм³ Ag, Cu ($p < 0,05$)

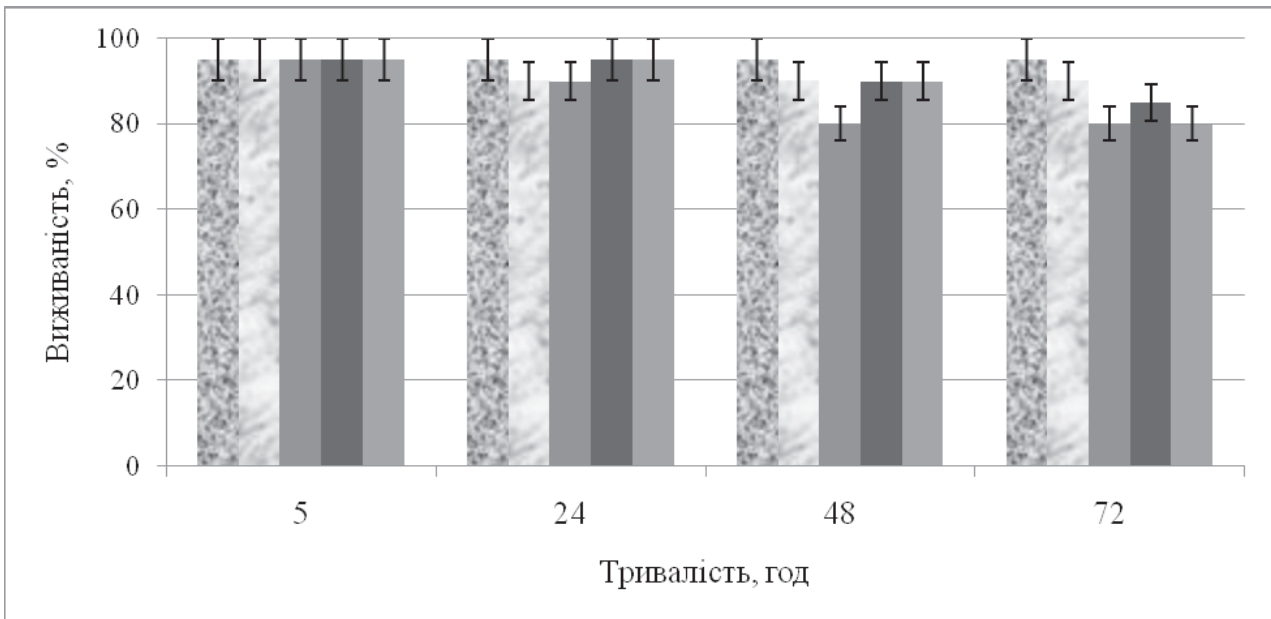


Рис. 5. Дія різних концентрацій наноаквацитратів заліза та цинку на ембріони *Danio rerio*: №1 - 0,01 мг/дм³ Fe; №2- 0,02 мг/дм³ Fe; №3 -0,01 мг/дм³ Zn; №4 - 0,02 мг/дм³ Zn ($p < 0,05$)

з іншими перехідними металами, що співвідноситься з працями [7], де досліджували дію металів на *Trachurus trachurus*, *Clupea*, *Tillapia mossambica* та ін.

Відзначено, що за експозиції в суміші срібла та міді з концентрацією 0,01мг/дм³

(рис. 3, №4), відсоток виживаності особин майже не відрізнявся від контрольного варіанту. Очевидно має місце стимулюючий та синергічний вплив сполук срібла та міді, що узгоджується з працями інших авторів [3]. Хоча слід зазначити, що на всіх стадіях

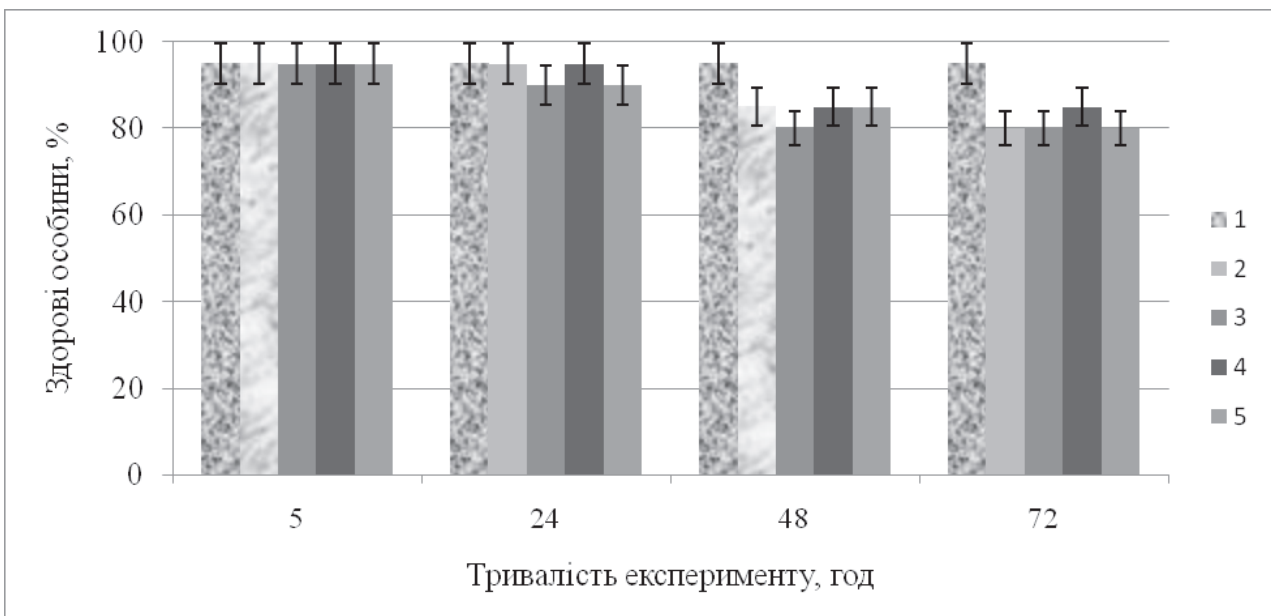


Рис. 6. Утворення сублетальних ефектів при впливі різних концентрацій наноаквацитратів заліза та цинку на ембріони *Danio rerio*: №1 - контроль; №2 - 0,01 мг/дм³ Fe; №2- 0,02 мг/дм³ Fe; №3 -0,01 мг/дм³ Zn; №4 - 0,02 мг/дм³ Zn. ($p < 0,05$)

у 10-15% живих ембріонів спостерігали відхилення від нормального розвитку.

Сублетальні ефекти почали виявлятися у часовому інтервалі від 12 до 24 год за концентрацій 0,02 мг/дм³ для всіх варіативних груп. У той же час при розведенні 0,01 мг/дм³ аномальні порушення розвитку почали відзначати тільки через 48 год. Сублетальні ефекти відрізнялися в залежності від варіативних груп. Найбільш вираженими за дії цинку, срібла, та міді були порушення пігментації тіла, водночас вплив заліза виявлявся в порушенні розвитку очного яблука.

На відміну від фізичних та хімічних підходів до оцінки забруднення, біотестування має прогностичний вплив і здатне передбачити зміни, які очікують біоту. Наприклад, вплив сублетальних концентрацій на ранніх стадіях розвитку

риб може призвести до суттєвих змін в особин, які знаходилися під дією токсиканту і вижили [1,2]. У подальшому це виявляється у зниженні імунітету, порушенні роботи різних життєво важливих систем та збільшенні смертності серед дорослих особин у популяціях та угрупованнях риби [1,4].

Висновки

Рівні концентрації 0,01–0,02 мг/дм³ наноаквацитратів срібла, суміші срібла з міддю, цинку та заліза не викликають ембріотоксичності, але в 10–15% ембріонів *Danio rerio* порушуються пігментація та розвиток очного яблука.

Кількість особин, у котрих виявляється сублетальний ефект, є незначною, що свідчить про можливість безпечного практичного використання наноаквацитратів у риборицтві.

Література

1. Алимов А.Ф. Исследование биотических балансов экосистем пресноводных водоемов СССР // Гидробиол. журн. — 1988. — 23, №6. — С. 3–9.
2. Черкашин С. А. Биотестирование: терминология, задачи, основные требования и применение в рыбохозяйственной токсикологии // Известия Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра: Биология, состояние запасов и условия обитания промысловых гидробионтов ДВ морей. — Владивосток, 2001. — 128, ч. 3. — С.1020–1035.
3. Наномікронутрієнти, питання безпечності та біоетичності при виробництві харчових продуктів / М.П. Гуліч, Н.Л. Ємченко, О.В. Ященко та інші // Етика нанотехнологій та нанобезпека: Міжнародний семінар (13 жовтня 2011 р., Київ). — К., 2011. — С. 35–37.
4. Злацький І.А. Особливості впливу іонів Cu²⁺, Pb²⁺, Ni²⁺, Cd²⁺ на продукційні показники окремих гідробіонтів та їх популяцій: Автореф. дис. ...канд. біол. наук: 03.00.16 / Ін-т колоїд. хімії та хімії води ім. А. В. Думанського. — К., 2012. — 19 с.
5. Кравченко О.О., Верголяс М.Р., Максін В.І. Оцінка цитотоксичності наноаквацитратів срібла та міді за допомогою мікроядерного тесту на клітинах риби *Danio Rerio* // Біоресурси і природокористування. — 2013. — №1–2. — С. 31–36.
6. Оценка влияния кадмия, цинка и свинца на выживаемость предличинок морских рыб [Электр. ресурс] / Никифоров М.В., Черкашин С.А. // Электронный журнал "Исследовано в России" — 2004. Режим доступа до журн. :<http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2004/040.pdf427>
7. Патин С.А. Влияние загрязнения на биологические ресурсы и продуктивность Мирового океана. — М.: Пищ. пром-сть, 1979. — 304 с.
8. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. / Driever W. et al. // Development. — 1996. — № 123. — P. 37–46.



9. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio* / Haffter P, Granato M, Brand M. et al. // Development. – 1996. – № 123. – P. 1–36.
10. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity / A. Hill, J. Teraoka, H. Heideman, W. Peterson // Toxicological Sciences. – 2005. – **86**. – P. 6–19.
11. R. Nagel. DarT: the embryo test with the zebrafish *Danio rerio* a general model in ecotoxicology and toxicology // ALTEX – 2002. – № 19. – P. 38–48.
12. Scott G.R., Sloman K.A. The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity // Aquat. Toxicol. – 2004. – **68**. – P. 382–392.
13. Stages of embryonic development of the zebrafish / C.B. Kimmel, W.W. Ballard, S.R. Kimmel et al. // Dev. Dynam. – 1995. – **203**. – P. 253–310.
14. Water quality – Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*): ISO/FDIS 15088:2007. - ISO/FDIS 15088:2007 – Switzerland, 2007 – 12 p. (International standard).

АННОТАЦІЯ

Кравченко О.А., Злацький І.А., Коваленко В.Ф., Максін В.І. Влияние наноаквацитратов переходных металлов на эмбриональное развитие *Danio rerio* // Биоресурсы и природопользование. – 2014. – **6**, № 1–2. – С. 19–25.

Обоснован вибор ембріонів *Danio rerio* для оцінки токсичності препаратів, отриманих методами нанотехнологій. Проаналізовано вплив різних концентрацій наноаквацитратів на ембріонів і появу у них летальних і сублетальних ефектів. Дана оцінка можливості використання препаратів в практичних цілях.

SUMMARY

O. Kravchenko, I. Zlatski, V. Kovalenko, V. Maksin. The effect of transition metals nanoaquacitrates on embryonic development of *Danio rerio* // Biological Resources and Nature Management. – 2013. – **6**, № 1–2. – P. 19–25.

The choice of *Danio rerio* embryos to assess the toxicity of drugs obtained by the methods of nanotechnology has been justified. The influence of different concentrations of nanoaquacitrates on embryos and the cause of their lethal and sublethal effects have been analyzed. The possibility of using nanoaquacitrates for practical purposes has been assessed.