

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

На правах рукописи

Саидов Даниял Магомедович

**КРИТЕРИЙ ТОКСИЧНОСТИ ЭМБРИОНАЛЬНО-ЛИЧИНОЧНОГО
ТЕСТИРОВАНИЯ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ**

1.5.16 – Гидробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена на кафедре общей экологии и гидробиологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель: **Косевич Игорь Арнольдович**,
кандидат биологических наук, доцент кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Официальные оппоненты: **Буяновский Алексей Ильич**,
доктор биологических наук, главный научный сотрудник отдела гидробионтов прибрежных экосистем Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии»

Мокиевский Вадим Олегович,
доктор биологических наук, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории экологии прибрежных донных сообществ отдела экологии морей и океанов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт океанологии им. П.П. Ширшова Российской академии наук»

Стрелков Петр Петрович,
кандидат биологических наук, доцент кафедры ихтиологии и гидробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Защита диссертации состоится «19» мая 2023 г. в 17 ч 30 м на заседании диссертационного совета МГУ.015.6 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, аудитория 389

e-mail: dissovet_00155@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.6/2485>

Автореферат разослан « » апреля 2023 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Д.М. Гершкович

Общая характеристика работы

1.1. Актуальность и степень разработанности темы исследования

Глобальные изменения климата, усиливающиеся антропогенным воздействием на окружающую среду, ставят перед человечеством множество серьезных задач. Среди них – необходимость оценки и прогнозирования результатов длительного и кратковременного воздействия на экосистемы, включая биоразнообразие. Во многих случаях решение этих задач затрудняется недостаточностью инструментария для проведения оценочных мероприятий и отсутствием обоснованных критериев оценки негативного воздействия. В большинстве случаев оценка негативного антропогенного воздействия на окружающую среду основана на методах биотестирования, результаты которых зачастую не позволяют обосновывать долгосрочные прогнозы.

Эмбрионально-личиночное тестирование с использованием двустворчатых моллюсков на сегодняшний день является одним из наиболее часто используемых методов биотестирования для оценки негативного воздействия окружающей среды (Courtright et al. 1971; Brenko et al. 1977; Boukadida et al. 2016), воздействия химических веществ (Martin et al. 1981; Malakhov and Medvedeva 1991; Nadella et al. 2009) и даже влияния закисления океана вследствие увеличения выбросов углекислого газа в атмосферу (Gazeau et al. 2007; Kurihara et al. 2007, 2008; Andersen et al. 2013). Данный тест рекомендован как общепринятый протокол тестирования при оценке воздействия на морские экосистемы (ASTM 2012; USEPA 2016).

Показателями негативного воздействия при проведении тестирования являются как низкая выживаемость личиночных стадий во время теста, так и высокая доля особей, развивающихся с морфологическими отклонениями (His et al. 1999; ASTM 2012). Если низкая выживаемость достаточно однозначно демонстрирует эффект негативного воздействия, то доля особей, развивающихся с морфологическими отклонениями, может значительно варьировать в зависимости от принятых критериев оценки отклонений. Согласно общепринятой классификации, личинок, сформировавшихся во время проведения эмбрионально-личиночного биотестирования и зафиксированных по его окончании, принято делить на шесть морфологических классов (в дальнейшем - морфотипов): D-велигер (типичная личинка двустворчатого моллюска, развивающаяся без негативного воздействия), велигер с выемкой на краю раковины, велигер с выступающей мантией, велигер с седловидным замком раковины, трохофорная личинка и личинка с несформированной раковинкой. Авторы, придерживающиеся наиболее строгих критериев оценки отклонений (His et al, 1997, Krassoi et al., 1996), считают, что в качестве нормальной

личинки по окончании можно рассматривать только D-велигер с полностью развитой, идеально симметричной раковиной и парусом мягких тканей. Любые визуальные морфологические отклонения мягких тканей или асимметричность раковины необходимо расценивать как отклонение. Сторонники менее строгих критериев допускают наличие морфологических отклонений в строении D-велигера по окончании тестирования, в особенности в форме раковины или её размеров, принимая за ключевую характеристику наличие полностью сформированной D-образной раковины (ASTM 2012; USEPA 2016). Современные методики и протоколы придерживаются как более, так и менее строгих критериев, и вопрос выбора между данными критериями остаётся открытым (ASTM 2012; Leverett and Thain 2013). Учитывая особенности подсчета результатов (фиксированный материал), использование различных критериев оценки морфологических отклонений от "нормы" будет оказывать огромное влияние на конечный результат эмбрионально-личиночного тестирования с использованием двустворчатых моллюсков.

Сложность выбора между строгими и менее строгими критериями оценки морфологических отклонений личинок двустворчатых моллюсков можно объяснить по крайней мере двумя причинами. Во-первых, до сих пор не изучено тонкое строение личинок, сформировавшихся во время проведения эмбрионально-личиночного биотестирования и характеризующихся наличием морфологических отклонений. Это затрудняет сравнение анатомии таких личинок с таковой типичных D-велигеров, и не позволяет различать реальные патологии развития и особенности фиксации. Во-вторых, не известна дальнейшая судьба личинок после окончания кратковременного воздействия. Вполне вероятно, что некоторые типы личинок с морфологическими отклонениями обладают способностью к дальнейшему развитию с восстановлением нормального строения. Следовательно, дополнительные исследования в этих двух направлениях помогут решить вопрос о разделении личинок, сформировавшихся во время тестирования, на особей с остановкой развития и особей с задержкой в развитии, что сделает результаты тестирования более точными и обоснованными. Кроме того, использование уточненного критерия негативного воздействия увеличит обоснованность и достоверность долгосрочных прогнозов кратковременных воздействий на окружающую среду.

1.2. Цель и задачи исследования

Целью данной работы было обоснование критерия токсического воздействия в эмбрионально-личиночном тесте *Mytilus edulis* [Linnaeus, 1758] с учетом способности личинок к восстановлению после негативного воздействия.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Проведение эмбрионально-личиночного тестирования для комплексной оценки токсического воздействия ряда концентраций модельного токсиканта $K_2Cr_2O_7$ на раннее эмбриональное развитие *M. edulis*.
2. Анализ морфологических особенностей личинок *M. edulis*, развивавшихся при различных уровнях негативного воздействия в ходе эмбрионально-личиночного тестирования с применением модельного токсиканта.
3. Оценка выживаемости и способности личинок с морфологическими отклонениями, полученных в результате токсического воздействия при проведении эмбрионально-личиночного тестирования, к восстановлению типичной D-образной формы раковины.
4. Изучение тонкого строения и особенностей анатомии личинок с выявленными морфологическими отклонениями.
5. Разработка и обоснование критерия токсичности, который учитывает особенности строения и способность к восстановлению личинок *M. edulis*.

1.3. Положения, выносимые на защиту

1. При различных уровнях негативного воздействия соотношения долей нормальных велигеров и личинок с различными вариантами морфологических отклонений различны и тесно связаны с уровнем негативного воздействия.

2. Личинки с морфологическими отклонениями имеют принципиальную возможность для восстановления нормального строения раковины.

3. Значимое повышение уровня личиночной смертности коррелирует с уровнем воздействия, при котором по окончании воздействия полностью отсутствуют личинки со сформированной раковинкой, наличие которой может рассматриваться как маркер обратимости воздействия.

4. Обнаружены следующие особенности тонкого строения личинок с морфологическими отклонениями:

а. личинки с "выступающей мантией" представляют собой прямозамковые велигеры, зафиксированные на различных стадиях ретракции вельюма, а выступающие за пределы раковины ткани являются тканями вельюма;

б. личинки с "седловидным замком" раковины имеют протяженные зияющие участки раковины с передней и задней сторон замкового края, не скрепленные лигаментом, что и обуславливает особенность их морфологии;

в. основной особенностью "асимметричных" личинок является несоответствие степени развития раковины и висцеральной массы; ввиду небольших

размеров раковины и развитой пищеварительной системы личинки имеют недостаточный для полной ретракции вельюма объем мантийной полости.

5. Обоснована необходимость использования критерия оценки воздействия, учитывающего способность личинок после кратковременного негативного воздействия к дальнейшему развитию. Предложенный D-индекс увеличивает качество оценки уровня воздействия, и может быть использован в качестве критерия токсичности при эмбрионально-личиночном тестировании двустворчатых моллюсков.

1.4. Объект и предмет исследования

Объектом исследования является двустворчатый моллюск *Mytilus edulis*. Предмет исследования – влияние кратковременного воздействия модельного токсиканта $K_2Cr_2O_7$ на раннее эмбриональное развитие *M. edulis*. В работе уделяется внимание анализу изменения соотношения долей личинок с морфологическими отклонениями в зависимости от концентрации токсиканта, анализу изменения анатомии личинок под воздействием токсиканта и оценке выживаемости и способности личинок с морфологическими отклонениями к восстановлению типичного строения.

1.5. Научная новизна исследования

Впервые показана фундаментальная способность велигеров двустворчатых моллюсков *M. edulis* к восстановлению строения D-образной раковины после кратковременного негативного воздействия концентраций бихромата калия. Восстановление строения и развития наблюдается даже после воздействия концентраций модельного токсиканта, превышающего EC_{50} . На основании данных по посттравматической смертности показана прямая корреляция между наличием раковины у личинок с морфологическими отклонениями, сформировавшихся при кратковременном воздействии модельного токсиканта, и значимым уровнем смертности после снятия негативного воздействия. Впервые описано тонкое строение личинок с выраженными морфологическими отклонениями, такими как "выступающая мантия", "седловидный замок" раковины и их комбинации. Предложена модель и обоснован критерий оценки воздействия в эмбрионально-личиночном тестировании двустворчатых моллюсков, увеличивающие точность классификации различных уровней негативного воздействия.

1.6. Теоретическая и практическая значимость исследования

Оценка способности подверженных кратковременному негативному воздействию тест-объектов к восстановлению имеет важный биологический смысл, поскольку

большинство техногенных катастроф приводит к резкому, но непродолжительному негативному воздействию на окружающую среду. Краткосрочные тесты, применяемые в настоящее время в биотестировании, в большинстве своем основаны на использовании критериев, не учитывающих возможность дальнейшего развития подвергшихся негативному воздействию организмов. Вместе с тем, именно возможность восстановления организмов после негативного воздействия может служить мерой его тяжести и позволяет оценить долгосрочные последствия такого воздействия на экосистему.

Все вышеуказанное касается и тестирования на эмбриональных или личиночных этапах развития, негативное воздействие на которые может вызывать как задержку, так и остановку в развитии. Следовательно, оценка возможности восстановления личиночных стадий многоклеточных организмов после различных степеней негативного воздействия позволяет решить целый ряд теоретических и практических вопросов. Изучение тонкого строения подверженных негативному воздействию особей (в особенности с предполагаемыми патологиями) позволяет детальнее разобраться в обоснованности применяемых критериев. Ряд морфологических аномалий может быть обусловлен не столько реальным негативным воздействием, сколько методическими причинами - особенностью фиксации и подсчёта особей в тесте.

Построенные модели и обоснование использования критерия оценки кратковременного воздействия модельного токсиканта на личиночное развитие двустворчатых моллюсков создают основу для дальнейших исследований с целью разработки критериев оценки и долгосрочного моделирования последствий воздействий различного типа на окружающую среду.

Информация об эмбрионально-личиночном тестировании двустворчатых моллюсков и морских ежей, обобщенная в литературном обзоре, может быть использована в качестве методического пособия при проведении курсов лекций и практик для студентов кафедр общей экологии и гидробиологии, зоологии беспозвоночных и эмбриологии.

1.7. Методология диссертационного исследования

Методологической основой настоящего исследования является комплексный подход к анализу кратковременного негативного влияния модельного токсиканта на эмбрионально-личиночное развитие мидии.

Эксперименты проведены с использованием стандартных методов сбора и содержания живого материала, получения половых продуктов и оплодотворения. Постановка токсикологических экспериментов осуществлена с учетом действующих рекомендаций. Первоначальный анализ результатов проведен с применением методов

световой микроскопии и гистологических методов (изучение морфологии личинок, фиксация и заключение объектов, подготовка серий гистологических срезов, анализ серий гистологических срезов), и использования искусственной нейронной сети в анализе и количественной обработке данных биотестирования. Полученные данные проанализированы с применением различных статистических методов анализа и методов математического моделирования.

1.8. Личный вклад автора

Автором диссертации совместно с научным руководителем разработан план исследования и проведен анализ полученных результатов. Автором диссертации получены все данные, представленные в работе. Автором выполнен анализ литературных источников. Автор осуществлял планирование и проведение экспериментов, сбор, подготовку и обработку материала. Исследования морфологии и анатомии личинок и статистическая обработка результатов проведены автором. При подготовке публикаций автором была проведена значительная работа над текстом статей, подготовка иллюстраций, а также переписка с редакторами и рецензентами.

1.9. Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов, полученных в диссертационной работе, обеспечивается корректным использованием современных методов исследования. При постановке экспериментов были соблюдены все основные требования (стандарты) к проведению биотестирования, эксперименты проведены с необходимой повторностью и объемами выборок. Используются стандартные методы гистологических исследований. Фотоизображения и микрофотографии, полученные в ходе исследований, подвергались незначительной корректировке яркости и контрастности, затрагивающей все пиксели изображений. Используются адекватные статистические методы.

Результаты исследования были представлены на всероссийских и международных конференциях:

1. XX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2013", МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, 8-12 апреля 2013;
2. Морские биологические исследования: достижения и перспективы, Севастополь, Россия, 19-24 сентября 2016;
3. Юбилейная конференция в честь 160-летия кафедры зоологии беспозвоночных «ЗООЛОГИЯ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ – НОВЫЙ ВЕК», Москва, Россия, 19-21 декабря 2018;

По результатам исследования опубликовано 3 статьи в научных журналах, индексируемых в международных базах данных Scopus, Web of Science, RSCI, а также 3 тезисов докладов конференций в сборниках, входящий в списки цитирования.

Подготовка к публикации полученных результатов в научных трудах [1, 3] проводилась совместно с соавторами. Вклад автора в научных трудах [3] составляет 1/3. В научных трудах [1] и [2] вклад автора определяющий.

1.10. Структура и объем диссертации

Текст работы изложен на 120 страницах и состоит из введения, четырех глав: обзор литературы, материал и методы, результаты, обсуждение результатов, выводов, списка литературы и приложения. Список литературы включает 100 источников, из которых 5 представлены русскоязычными источниками, а 95 источниками на иностранном языке.

Основное содержание работы

Глава 1. Обзор литературы.

В главе представлен обзор существующей литературы, затрагивающий оценку воздействия токсикантов различной природы и абиотических факторов среды на различные стадии онтогенеза двустворчатых моллюсков, начиная с гамет, заканчивая взрослыми особями. Детально рассмотрено эмбриональное и личиночное развитие *M. edulis*, уделено особое внимание строению жизненных стадий, наблюдаемых при проведении эмбрионально-личинного тестирования. Рассмотрены особенности формирования и тонкое строение личиночных стадий двустворчатых моллюсков.

Подробно разобраны методики проведения эмбрионально-личиночного тестирования с использованием развития двустворчатых моллюсков. Рассмотрены особенности воздействия ряда токсических агентов. Обсуждены ключевые работы, касающиеся эмбрионально-личиночного тестирования, особенностей проведения и проблематики. Рассмотрены основные способы анализа результатов тестирования, применяемые в качестве оценки воздействия, их критерии, проблемы, и возможные способы их решения. Приведены аналогичные работы в сопредельных методиках и протоколах, решающие аналогичные проблемы.

Глава 2. Материалы и методы исследования.

Взрослые особи двустворчатых моллюсков собраны на побережье Великой салмы в окрестностях Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова МГУ в 2016-2021 годах. В работе проведена серия экспериментов по оценке токсического воздействия ряда

концентраций $K_2Cr_2O_7$ на эмбрионально-личиночное развитие *Mytilus edulis* и последующего возможного восстановления. Экспериментальная часть данной работы включает две ключевые серии экспериментов: предварительную (токсическое воздействие) и основную (восстановление после перенесенного негативного воздействия). Стимуляция нереста была проведена введением 0.5М раствора KCl в мантийную полость моллюсков. Оплодотворение проводили в фильтрованной (фильтр 5-10 мкм) морской воде. Для оценки токсического воздействия и получения личинок с морфологическими отклонениями предварительный эксперимент был проведен по общепринятой методике эмбрионально-личиночного теста двустворчатых моллюсков продолжительностью 48 часов (ASTM, 2012; His et al., 1999; USEPA, 2016). Для оценки возможности восстановления нормального строения, личинки после перенесенного негативного воздействия отмывали в чистой морской воде в течении 48 (при оценке возможности восстановления жизнедеятельности и нормального строения) или 96 (при оценке темпов роста) часов. Эксперименты проведены в 6-луночных культуральных планшетах с объемом лунки 8 мл. Все эксперименты проведены при температуре 15 ± 2 °C и солёности 24‰. После окончания эксперимента пробы частично фиксировали и осуществляли подсчёт личинок, а частично использованы в дальнейших экспериментах. Для оценки воздействия в проведенных экспериментах рассчитывали как абсолютную, так и смещенную с поправкой на контроль долю найденных типов личинок. Оценка различий в соотношении морфотипов между сериями экспериментов проведена при помощи критерия согласия Пирсона (χ^2), критерия Кохрана-Ханзеля-Мантеля (КХМ-тест), а также кластерного анализа с использованием модифицированных данных. Для оценки значимости различий в личиночных размерах использован критерий Краскела – Уоллиса с апостериорным тестом Данна для попарных сравнений. Оценка выживаемости и оценка темпов восстановительного роста раковины на протяжении отмывки, включая расчёт полуэффективных и полулетальных концентраций (EC_{50} и LC_{50}), произведен с использованием регрессионного анализа. Для поиска зависимости изменения долей обнаруженных типов личинок и их комбинации при увеличении концентрации токсиканта построены обобщенные линейные модели (GLM). Для выбора оптимального способа оценки токсичности использован сравнительный ROC-анализ. Подсчёт и измерение личинок осуществлен с использованием программного пакета Fiji (Schindelin et al., 2012). При подсчёте личинок и классификации морфологических отклонений были использованы обученные нами ранее свёрточные нейронные сети (Саидов и Саидов, 2016). При анализе результатов оценки токсичности и проведенной отмывки было подсчитано и проанализировано более 5000 особей. Из них: при анализе восстановления строения - 2476 особей; анализе темпов роста при питании - 795 особей;

оценке выживаемости - 2290 особей. Количество повторов каждого эксперимента составляет не менее трёх. Статистический анализ проведен в программной среде R (R Core Team, 2019) с использованием базовых и дополнительных библиотек.

Исследования анатомии личинок. Для анатомических исследований все обнаруженные морфотипы были зафиксированы раствором 2,5% глутаральдегида на 0.1M какодилатном буфере (далее – 2,5%ГА) в течение 24 часов при комнатной температуре. Зафиксированные образцы после двукратной отмывки буфером постфиксировали в растворе 0.1% OsO₄ и обезвоживали путём проведения через серию спиртов с возрастающей концентрацией спирта и ацетона и заключали в эпоксидную смолу. Серии полутонких срезов 0.5-1 мкм получены на ультратоме LKB V (Bromma), окрашены по Twort в модификации Манских (Manskikh and Sheval 2020) и окраской Толуидиновым/Метиленовым синим по Миронову (Миронов, 1994). Всего получено не менее пяти серий полутонких срезов личинки целиком для каждого морфотипа.

Глава 3. Результаты

Оценка токсического воздействия K₂Cr₂O₇. Проведенные эксперименты по оценке воздействия модельного токсиканта (K₂Cr₂O₇) в ряду концентраций от 10 до 50 мг/л позволили выявить личинок с различного рода морфологическими отклонениями, согласно общепринятой классификации (по His et al. 1997, с указанием сокращений): "выступающая мантия" (PM), "седловидный замок" (CH), "трохофора" (T) и "несформированная раковина" (ISH) (рис. 1). Дополнительно нами были обнаружены личинки небольшого размера (в среднем 68.91±1.05 мкм по сравнению с 95.52±0.85 мкм у D-велигера) с асимметричной раковиной с выступающими за её пределы мягкими тканями и названные "асимметричными" (A).

Согласно полученным данным, повышение концентрации K₂Cr₂O₇ в ряду от 0 до 50 мг/л значимо влияет на раннее развитие *M. edulis*, изменяя соотношение морфотипов личинок, что подтверждается тестом хи-квадрат Пирсона ($\chi^2 = 1014.16$, $p < 0.01$, рис. 2). Одним из основных проявлений негативного воздействия по мере увеличения концентрации токсиканта является снижение доли D-велигеров, составляющих 98.25±4.79% в контроле до 4.76±16.1% при 30 мг/л и полного отсутствия при больших концентрациях токсиканта (рис. 2). Впервые обнаруженные в данной работе "асимметричные" личинки преимущественно обнаружены при концентрации 20 мг/л, составляя до 77.9±16.49% среди общего числа личинок.

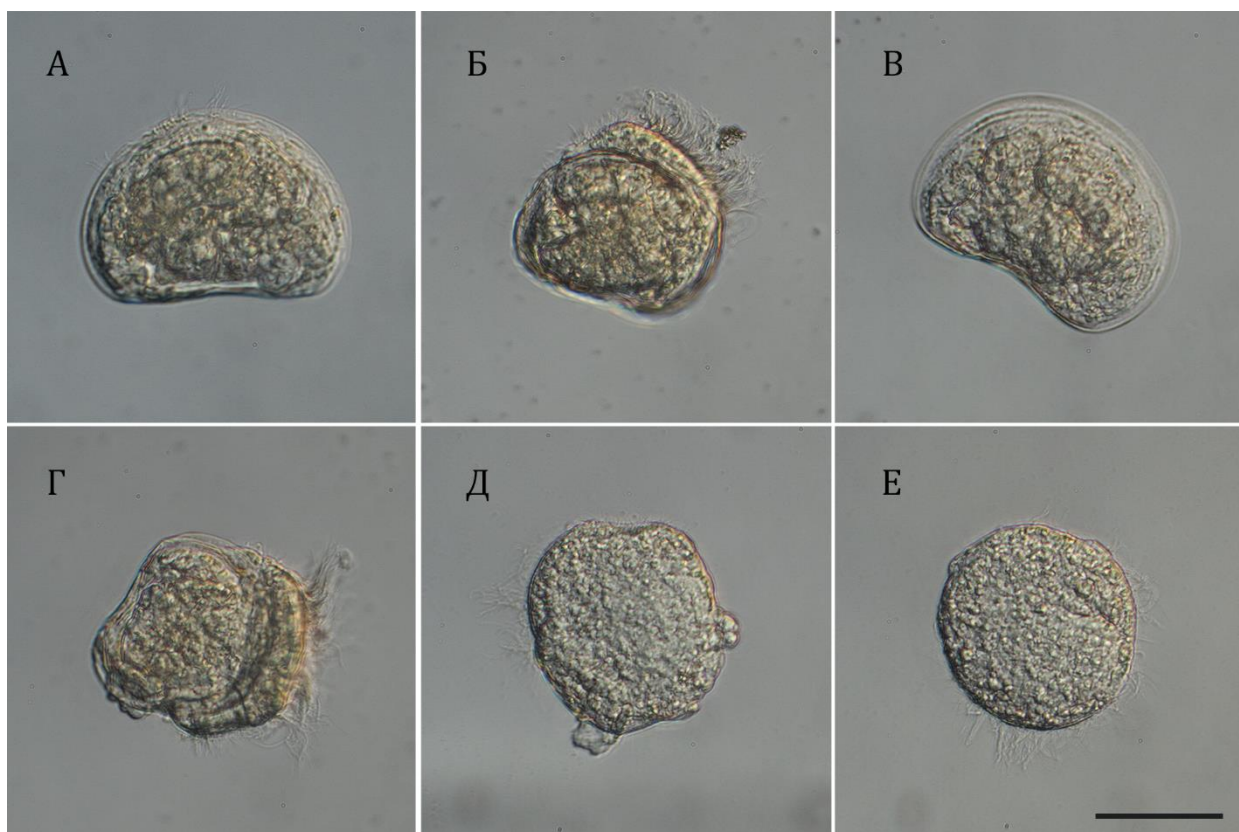


Рисунок 1. Морфотипы личинок, обнаруженные при различных концентрациях после окончания эксперимента по оценке токсического воздействия $K_2Cr_2O_7$. А – D-велигер, Б – велигер с "выступающей мантией", В – велигер с "седловидным замком", Г – "асимметричный" велигер, Д – личинка с "несформированной раковиной", Е – "трохофорная" личинка.

При использовании классического критерия токсичности (His et al. 1997; ASTM 2012) расчётное значение $EC_{50} = 11.25 \pm 0.48$ мг/л. Проведенный на основе соотношения морфотипов личинок иерархический кластерный анализ разделяет пробы, полученные после окончания токсического воздействия $K_2Cr_2O_7$, на четыре кластера (рис. 3). Два кластера, характеризующихся преобладанием D-велигеров, включают в себя пробы из контроля (N1) и раствора токсиканта в концентрации 10 мг/л (N2), а два других, характеризующихся отсутствием D-велигеров, пробы из растворов токсиканта в концентрации 20 мг/л (A2) и более (A1). Таким образом, кластерный анализ разделяет полученные пробы по степени воздействия на четыре группы: без воздействия (N1), слабое (N2), среднее (A2) и сильное воздействие (A1).

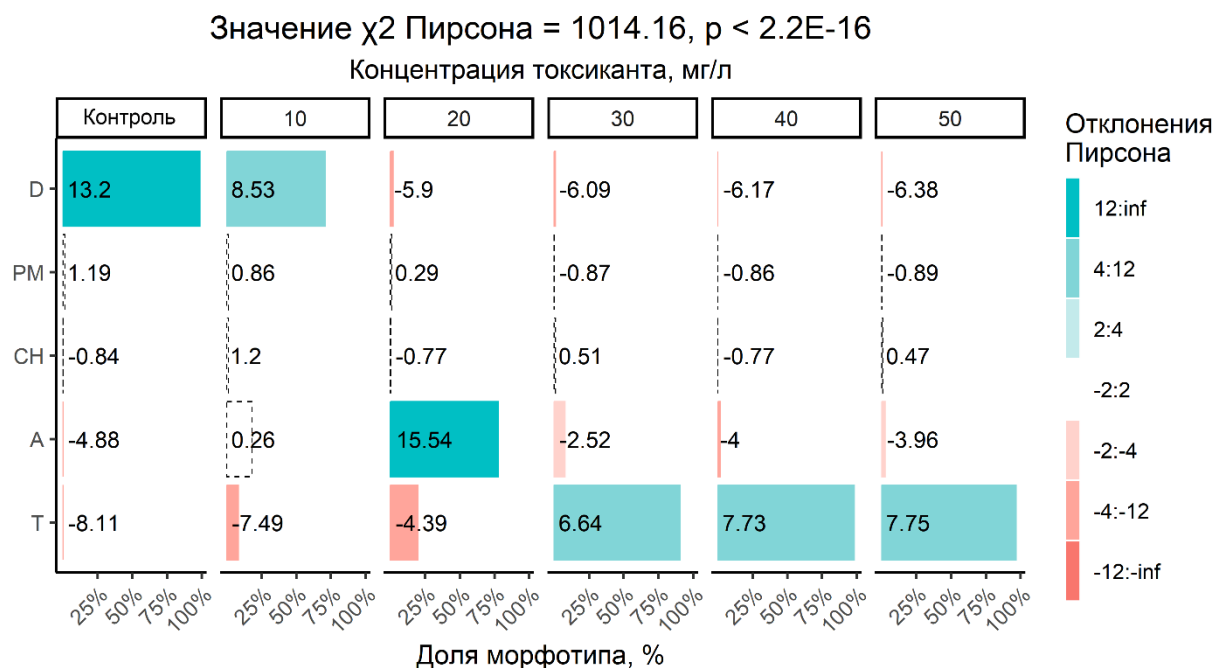


Рисунок 2. Распределение морфотипов личинок по данным эксперимента по оценке токсического воздействия $K_2Cr_2O_7$. Морфотипы личинок обозначены в виде сокращений по оси ординат: D – D-велигер, PM – "выступающая мантия", CH – "седловидный замок", A – "асимметрия", T – "трохофора"; доля каждого морфотипа – по оси абсцисс. Цветом, согласно шкале, обозначены доли имеющие высокие значения отклонений Пирсона, указанных на каждом столбце.

Тонкое строение изученных морфотипов. Согласно проведенному исследованию, рассмотренные морфотипы имеют ряд особенностей тонкого строения (рис. 4). Основной чертой всех рассмотренных особей с "**выступающей мантией**" является то, что часть тканей у фиксированных образцов выступает за край раковины. Это и приводит к видимости протрузии тканей края мантии. При рассмотрении серий срезов данного морфотипа было выяснено, что выступающие ткани представляют собой ткани велюма (рис. 4Б, Д). Степень выворачивания велюма варьирует между исследованными особями от практически полной (рис. 4Б) до незначительной, при которой ткани немного выступают за край раковины (рис. 4Д). Отличительной особенностью строения личинки с "**седловидным замком**" раковины является строение замкового края. В отличие от строения замкового края типичного D-велигера, краевые части замкового края имеют протяжённые (в среднем 18 мкм) зияющие участки (рис. 4А). Скрепленный лигаментом замковый край начинается от уровня мускулов аддукторов и далее, тогда как у прямозамкового велигера типичного строения створки раковины практически сразу скреплены лигаментом (рис. 4Б). Характерными для всех рассмотренных

"асимметричных" личинок является наличие частично вывернутого вельюма при одновременно углубленном апикальном поле, свидетельствующим о сокращении ретракторов вельюма (рис. 4В). Пространство внутри раковины при этом выглядит полностью заполненным, даже при широко раскрытых створках. Основную часть пространства между створок такой личинки занимает крупный желудок с проксимальным выростом (рис 4В).

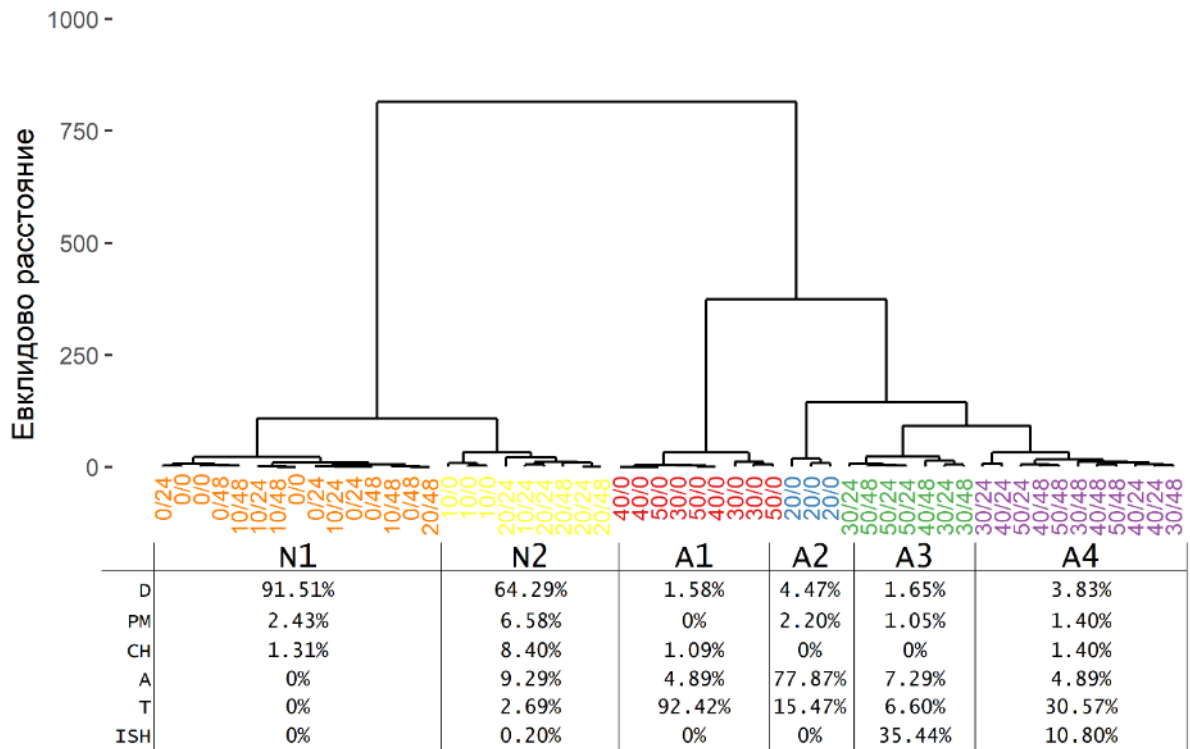


Рисунок 3. Иерархическая кластеризация, построенная на основании распределения морфотипов личинок, полученных как в ходе эксперимента по оценке токсического воздействия $K_2Cr_2O_7$, так и проведенной реабилитации в чистой морской воде. Единицей кластеризации являются данные по соотношению морфотипов при условиях, записанных в виде "концентрации/времени отмытки". Характерные для выделенных групп средние доли морфотипов личинок (и их соотношения) указаны в таблице под выделенными кластерами. Морфотипы личинок обозначены в виде сокращений: D – D-велигер, PM – "выступающая мантия", CH – "седловидный замок", A – "асимметрия", T – "трохофора", ISH – "несформированная раковина".

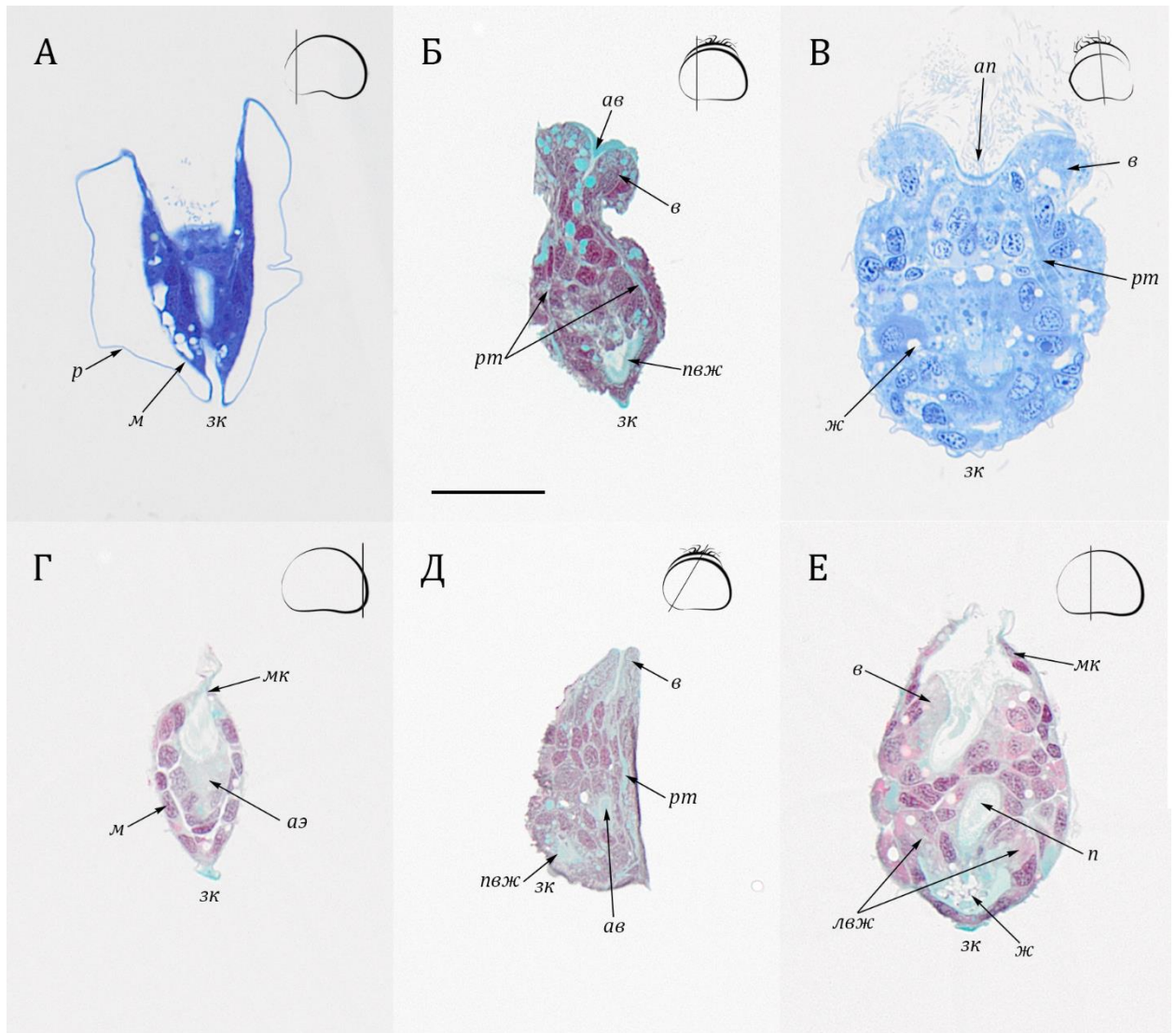


Рисунок 4. Поперечные срезы морфотипов личинок *Mytilus edulis* на различных уровнях с отмеченными характерными особенностями тонкого строения. А – велигер с "седловидным замком" раковины после 48 часов отмытки от токсиканта в концентрации 20 мг/л, срез на уровне края раковины; Б – велигер с "выступающей мантией" после 24 часов отмытки от токсиканта в концентрации 20 мг/л, срез через сильно выступающий велюм; В – "асимметричная" личинка через 48 часов отмытки от токсиканта в концентрации 30 мг/л, срез через среднюю часть; Г – D-велигер из контроля после 24 часов отмытки, срез на уровне края раковины; Д – косой срез велигера с выступающей мантией после 24 часов отмытки от токсиканта в концентрации 10 мг/л, через велюм; Е – D-велигер из контроля после 24 часов отмытки, срез через велюм на уровне основания пищевода. Условные обозначения: ав – апикальная впадина; ао – анальное отверстие, аэ – абдоминальный эпителий; в – велюм; ж – желудок; жг – жгутики; зк – замковый край; к – кишечник; лвж – латеральные выросты желудка; м – мантия; МК – мантийный край; п – пищевод; пвж –

проксимальный вырост желудка; *p* – раковина; *pt* – ретрактор. Пиктограммы в верхнем правом углу отображают плоскость среза. Шкала 20 мкм.

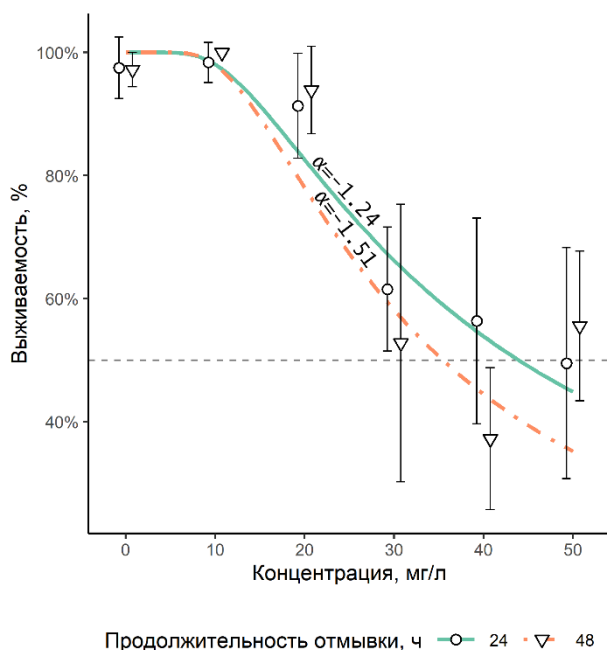


Рисунок 5. Регрессионные модели выживаемости личинок (указана по оси ординат), пересаженных на отмывку после негативного воздействия концентраций $K_2Cr_2O_7$ (по оси абсцисс). Средние значения даны с учётом 95% доверительных интервалов. Коэффициент α модели показан на каждой кривой для сравнения угла наклона касательной в зоне свала.

←

Выживаемость во время отмывки. Результаты оценки смертности на протяжении отмывки показали, что пороговой концентрацией токсиканта, ведущей к повышению смертности во время отмывки, является 20 мг/л (КХМ-тест, $M^2=19.2$, $p<0.05$), в ходе отмывки от которой выживаемость личинок снижается до 91.34 ± 13.57 %. При отмывке от токсиканта в концентрации 30 мг/л наблюдается уже значительное снижение выживаемости до 61.56 ± 16.04 % за первые сутки отмывки. Важно, что при отмывке от токсиканта в концентрации 30 мг/л выживаемость продолжает снижаться, достигая 52.78 ± 35.87 % на вторые сутки. Похожая ситуация наблюдается при отмывке от токсиканта в концентрации 40 мг/л. Полученные расчётные уровни LC_{50} (рис. 5) для каждой из продолжительностей отмывок составляют 43.93 ± 8.12 мг/л (для 24 часов отмывки) и 35.47 ± 6.64 мг/л (для 48 ч отмывки) соответственно.

Реабилитация во время отмывки. Полученные результаты свидетельствуют о выраженном положительном эффекте проведенной отмывки: соотношение морфотипов личинок значимо меняется на протяжении отмывки от токсиканта в концентрациях от 10 до 30 мг/л (тест хи-квадрат Пирсона, $p < 0.01$). Так, доля D-велигеров при отмывке от $K_2Cr_2O_7$ в концентрации 10 мг/л возрастает с 69.4 ± 14.51 % до 90.58 ± 6.93 % уже через сутки отмывки, достигая за двое суток 95.05 ± 6.74 %. Одновременно с этим доля "асимметричных" личинок уже через сутки отмывки снижается с 21.11 ± 12.85 % до нуля (рис 6). При отмывке личинок от $K_2Cr_2O_7$ в концентрации 20 мг/л наибольший вклад в изменение соотношения

вносит резкое снижение доли "асимметричных" личинок за первые сутки отмывки с $77.9 \pm 16.49\%$ до $2.5 \pm 4.94\%$ и одновременное повышение с $4.44 \pm 10.64\%$ до $66 \pm 13.92\%$ доли D-велигеров. При этом на протяжении отмывки доля D-велигеров продолжает расти, достигая на вторые сутки $81.64 \pm 12.56\%$. Реабилитация после воздействия $K_2Cr_2O_7$ в концентрации 30 мг/л оказывается не столь успешной и приводит к появлению $18.86 \pm 15.86\%$ D-велигеров лишь на вторые сутки.

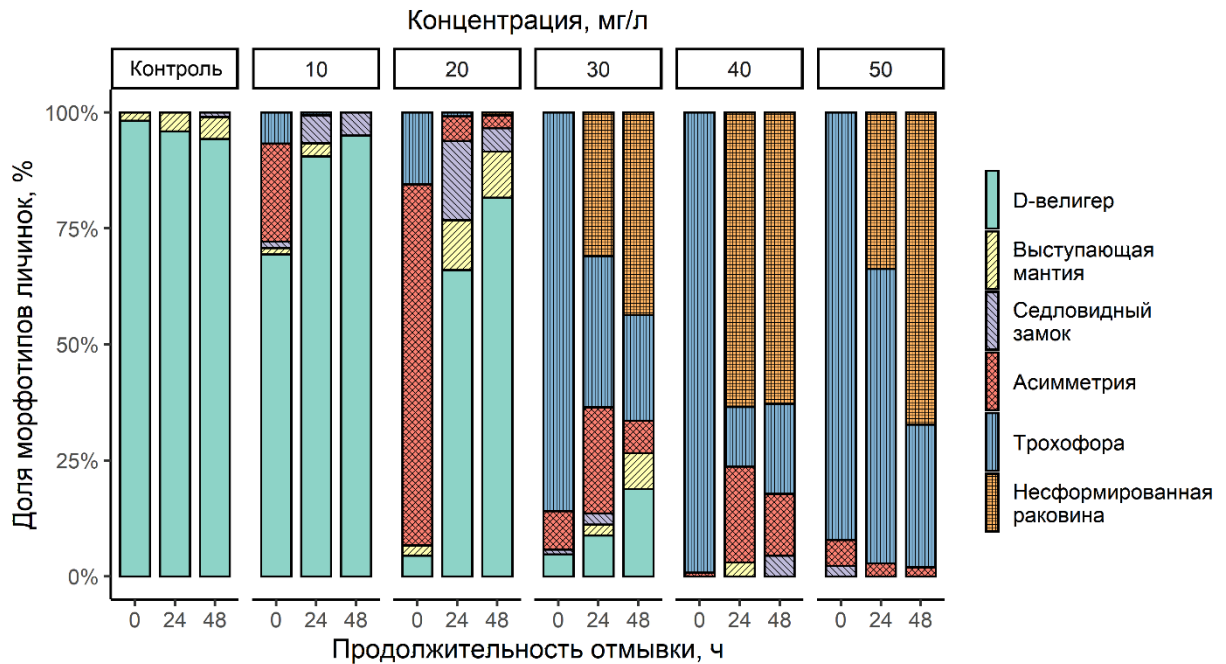


Рисунок 6. Распределение морфотипов личинок по данным эксперимента по оценке токсического воздействия $K_2Cr_2O_7$ и проведенной реабилитации в чистой морской воде. По оси абсцисс - продолжительность отмывки ("0" – перед пересадкой на отмывку). По оси ординат – средняя доля каждого морфотипа. Соотношения разделены по группам, соответствующим концентрациям.

Динамика роста и размеров во время отмывки. Одновременно с восстановлением строения раковины, во время отмывки D-велигеры продолжают дальнейший рост и развитие. При этом, восстановленные D-велигеры демонстрируют скорость роста, сопоставимую или даже выше чем в контроле (рис. 7). Так, согласно углу наклона линейной регрессии приращения размеров в первые сутки отмывки, D-велигеры, сформированные после пересадки личинок из токсиканта в концентрации 10 мг/л, имеют скорость роста несколько выше, чем контрольные D-велигеры (коэф.±ст.откл., $\alpha=0.50 \pm 0.03$ и 0.34 ± 0.03 , рис 7). Прирост личинок, перенесенных из токсиканта в концентрации 20 мг/л, меньше ($\alpha=0.11 \pm 0.04$) и смещен во времени на 24 часа по сравнению с велигерами из контроля и отмываемых от токсиканта в концентрации 10 мг/л (рис. 7А). Динамика размеров личинок,

питающихся микроводорослями *Dunaliella salina*, показала сходные с короткой отмывкой параметры. Модели асимптотического роста показывают схожие темпы роста D-велигеров из контроля и при отмывке от токсиканта в концентрации 10 мг/л, тогда как D-велигеры, сформированные при отмывке от концентрации 20 мг/л, растут значительно медленнее (рис. 7Б).

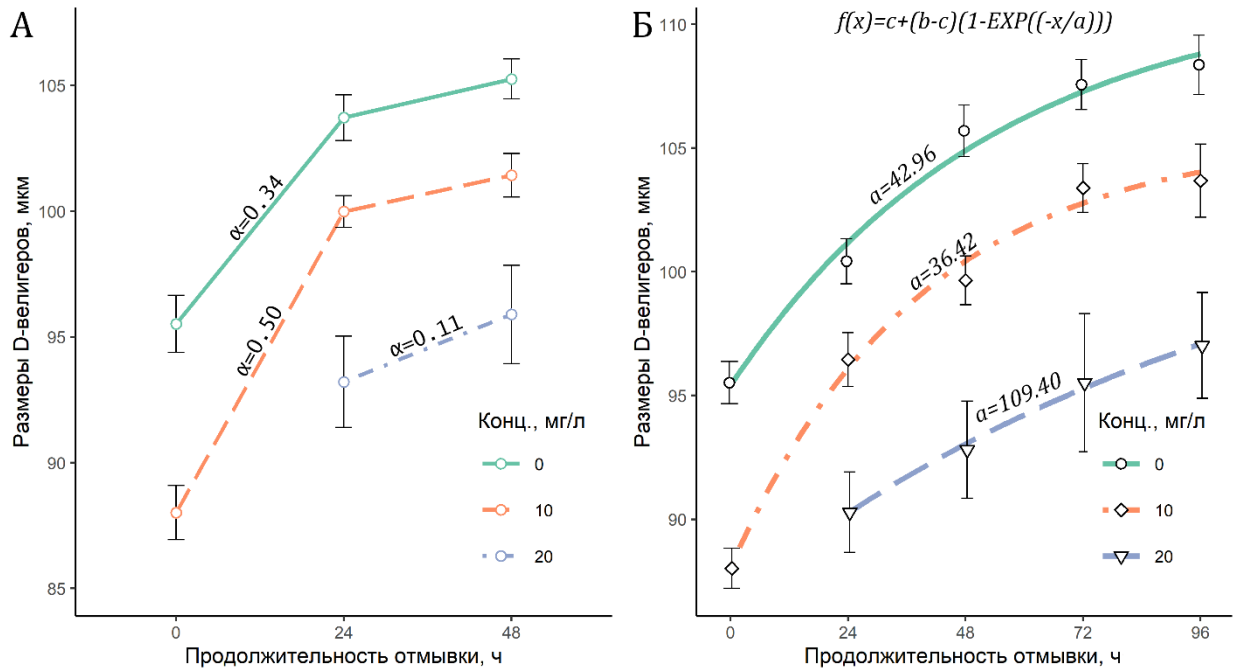


Рисунок 7. А - Динамика прироста D-велигеров, пересаженных из контроля и токсиканта в концентрациях 10 и 20 мг/л, на протяжении 48 ч отмывки; Б – Регрессионные модели темпов роста D-велигеров, питающихся микроводорослями *D. salina* на протяжении четырех суток отмывки от негативного влияния токсиканта в концентрациях 10 и 20 мг/л. Средние размеры представлены с учётом 95% доверительных интервалов

Глава 4. Обсуждение результатов

Особенности токсического воздействия $K_2Cr_2O_7$. Результаты оценки токсического воздействия $K_2Cr_2O_7$, полученные в данной работе, в целом соответствуют данным, полученными другими авторами (Martin и др., 1981; Resgalla, 2016; Sung, Kim, Lee, 2006). Однако показатели токсичности ($EC_{50} = 11.25 \pm 0.48$ мг/л) несколько выше данных, представленных в литературе, что может быть обусловлено как меньшей солёностью Белого моря (24‰), так и особенностями популяции мидии Великой Салмы. Обнаруженные при проведении оценки токсического воздействия $K_2Cr_2O_7$ особи с морфологическим отклонениями в строении в целом соответствуют ранее описанным (His et al. 1997), за исключением личинок асимметричного строения. Похожего строения личинки были обнаружены при оценке негативного воздействия закисления мирового океана вследствие

повышенного парциального давления CO_2 (Gazeau et al., 2007; Kurihara et al. 2007, 2008 etc.) и характеризованы авторами как личинки с "выступающей мантией" и "седловидным замком" вместе. Кроме того, похожие личинки также были обнаружены и при оценке токсического воздействия $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Resgalla, 2016), однако авторы не уделяли этому внимания, описывая их как недоразвитые или деформированные.

Наблюдаемое снижение доли D-велигеров и увеличение долей других личиночных морфотипов, характеризующихся различными личиночными деформациями, отмечается и в литературе. Например, в работах по оценке негативного воздействия закисления мирового океана (Andersen et al., 2013; Kapsenberg et al., 2018) авторы отмечают изменение соотношения морфотипов личинок, аналогичное обнаруженному в настоящей работе. Небольшое повышение $p\text{CO}_2$ приводит к появлению личинок с "выступающей мантией", большее - к появлению личинок с "седловидным замком", а при максимальном авторы наблюдают личинок, имеющих одновременно обе эти деформации. Похожие результаты получены и при оценке воздействия ионов тяжелых металлов или факторов среды на раннее развитие двустворчатых моллюсков (Moreira et al., 2018). Более того, изменения соотношений морфотипов личинок при возрастании негативного воздействия отмечены и в работах, посвященных ЭЛТ с использованием морских ежей (Carballeira et al., 2012; Kobayashi, 1985, 1990; Morroni et al., 2016). Значимое увеличение доли особей с морфологическими отклонениями при увеличении концентрации действующего вещества показано нами ранее и как побочный эффект при химической индукции стробилиации сцифистом (Мостовщикова и др., 2022). Таким образом, выявленное в данной работе распределение морфотипов личинок *M. edulis* можно представить в рамках закономерности, согласно которой бóльшее негативное воздействие приводит к большим задержкам в развитии или остановке на более ранних стадиях (Kobayashi, 1985). Тогда о наименьшей задержке будут свидетельствовать появление личинок с незначительными деформациями ("выступающая мантия" и "выемка на краю раковины"), о средней – личинок со значительной деформацией раковины ("седловидный замок" раковины или комбинация нескольких типов деформаций), а отсутствие раковины будет свидетельствовать о самой сильной задержке. Проведенный в настоящей работе кластерный анализ экспериментальных проб косвенно подтверждает данную тезу (рис. 3). Чем меньше в общем соотношении экспериментальная проба имеет раковинных личинок, тем дальше при кластеризации она располагается от контроля. Принимая во внимание подтверждающую данное высказывание распределение морфотипов (рис. 5), можно представить их градацию, основанную на увеличении степени негативного воздействия среды, в виде ряда

D-велигер > "выступающая мантия" > "седловидный замок" > "асимметрия" > "трохофора"/"несформированная раковина".

Восстановление строения. Результаты, полученные в данной работе при оценке возможности восстановления строения и жизнедеятельности при снятии негативного воздействия, подтверждают обратимость негативного влияния на эмбриональные стадии развития токсикантов в низких концентрациях, показанную другими авторами (Ярославцева, Сергеева, 2005; Morroni et al, 2018). Уже после 24 часов отмывки от токсиканта в концентрации 20 мг/л подавляющее большинство личинок ($66 \pm 13.92\%$) сформировало раковину, характерную для D-велигеров, а еще через 24 часа – D-велигеры появились среди личинок с деформациями, развивавшихся при концентрации токсиканта 30 мг/л. Важно, что формирование D-раковин наблюдается при отмывке личинок из концентраций, превышающих EC_{50} для $K_2Cr_2O_7$ – 20 и 30 мг/л. Похожие результаты получены при оценке обратимости воздействий тяжелых металлов с использованием эмбриональных стадий морского ежа *P. lividus* (Morroni et al., 2018). Авторы показали, что после суток экспозиции в растворах тяжелых металлов и последующей отмывки в течение 48 часов в чистой морской воде, доля аномальных личинок падает даже для концентраций, значительно превышающих EC_{50} . Проведенный в настоящей работе кластерный анализ подтверждает реабилитацию личинок на протяжении отмывки. Так, пробы из растворов токсиканта в концентрации 20 мг/л до пересадки на отмывку ("20/0") представлены в кластере A2 ("среднее воздействие"), а уже через 24 часа отмывки ("20/24") группируются совместно с пробами из растворов токсиканта в концентрации 10 мг/л ("10/0") в кластер N2 ("слабое воздействие").

Впервые исследованный в данной работе уровень личиночной смертности после снятия негативного воздействия позволил сопоставить параметры реабилитации и смертности во время отмывки. Высокий уровень смертности отмечен именно при отмывке от токсиканта в концентрациях (30 мг/л и более), при которых не наблюдали развитие раковины в течении первых 48 часов. Рассчитанный коэффициент корреляции (ϕ) между выживаемостью при проведении отмывки и количеством личинок, сформировавших раковину после проведения отмывки в течении первых 48, часов близок к 1 и составляет 0.876 (0.732 – 0.946, $p < 0.01$). Ключевое значение имеет не строение, а наличие раковины, при отсутствии которой смертность, даже при снятии негативного воздействия, остаётся высокой и продолжает расти на протяжении отмывки.

Несмотря на высокие темпы реабилитации, все сформированные D-велигеры уступают контрольным в размерах (рис. 7), но демонстрируют положительную динамику роста. Так, согласно углу наклона линейной регрессии приращения размеров в первые

сутки отмывки, D-велигеры, сформированные после пересадки личинок из раствора токсиканта в концентрации 10 мг/л, имеют скорость роста даже выше, чем контрольные D-велигеры (рис. 7А), но так и не догоняют их в размерах. Большое воздействие приводит к еще большему замедлению роста, добавляя к замедлению темпов роста D-велигеров, сформированных во время отмывки от токсиканта в концентрации 20 мг/л, смещение момента роста на сутки (рис. 7). Таким образом, личинки, подвергшиеся незначительному воздействию, имеют возможность за краткосрочную отмывку (до 48 часов) восстановить скорость роста после снятия негативного воздействия, но не могут полностью компенсировать разницу в размерах по сравнению с контролем. Более того, разница в размерах все еще четко указывает на уровень негативного воздействия токсиканта до отмывки.

Особенности строения морфотипов. Проанализированные серии срезов различных особей с "**выступающей мантией**" во многом различались между собой по визуальной степени выступа тканей. Сопоставляя полученные срезы со схемой, представленной в работе Крагга (Cragg, 1985), можно заключить, что все рассмотренные особи являются типичными по строению D-велигерами, находящимися на различных стадиях ретракции велюма во время фиксации. Несмотря на меньшие размеры раковины, в разнообразии рассмотренных особей прослеживается весь ряд ретракции, описанный Краггом. Все рассмотренные личинки имели неотличимые от нормально развивающихся прямозамковых велигеров строение, включая строение раковины, велюма, пищеварительной системы и мускулатуры. Выступающие ткани не являются тканями мантии, как предполагали ранее (His et al., 1999), а представляют собой велюм с различной степенью ретракции.

Основной особенностью строения личинок с "**седловидным замком**" раковины, помимо деформации зоны замкового края, является наличие не скрепленных лигаментом участков краев раковины. Резкое увеличение доли таких личинок совпадает с периодом пикового роста и восстановления велигеров (первые сутки отмывки), при котором наблюдается снижение доли "асимметричных" личинок и увеличение доли D-велигеров. В то же время, согласно литературным данным (Kapsenberg et al., 2018), одной из предполагаемых причин деформации замкового края является нарушение кальцификации зоны "продиссоконха" I. Вполне возможно, что появление личинок с "седловидным замком" раковины связано именно с активным ростом раковин у личинок, имеющих похожую деформацию раковины.

Впервые описанные в данной работе "**асимметричные**" личинки имеют ряд особенностей строения. Как и у велигеров с "выступающей мантией", "асимметричные" личинки имеют частично выступающий за край раковины велюм. Однако при этом все

особи асимметричных личинок зафиксированы на одной, самой ранней стадии ретракции, которая начинается с раскрытия створок и втягивания зоны апикального поля вследствие сокращения ретракторов под ним (Cragg, 1985). Ткани частично ввернутого велюма занимают всё свободное внутреннее пространство пространства между створками раковины и в то же время значительно выдаются наружу. При этом, обнаруженные в настоящей работе "асимметричные" личинки имеют в среднем на 23-30 % меньшие линейные размеры раковин, по сравнению с D-велигерами аналогичного возраста. Большую часть мантийной полости раковины занимают мягкие ткани личинки, и для полной ретракции велюма просто не остаётся свободного пространства. Несмотря на визуальное сходство с личинками с "выступающей мантией", "асимметричные" личинки явно показывают несоответствие развития раковины и мягких тканей, занимающих всё внутреннее пространство и делающих невозможным полную ретракцию велюма.

Оценка критериев токсического воздействия и их пересмотр. Согласно проведенному сравнительному ROC-анализу способов оценки токсического воздействия, наибольшую точность классификации степени негативного воздействия имеет GLM модель, учитывающая долю как D-велигеров, так и "асимметричных" личинок (рис 8).

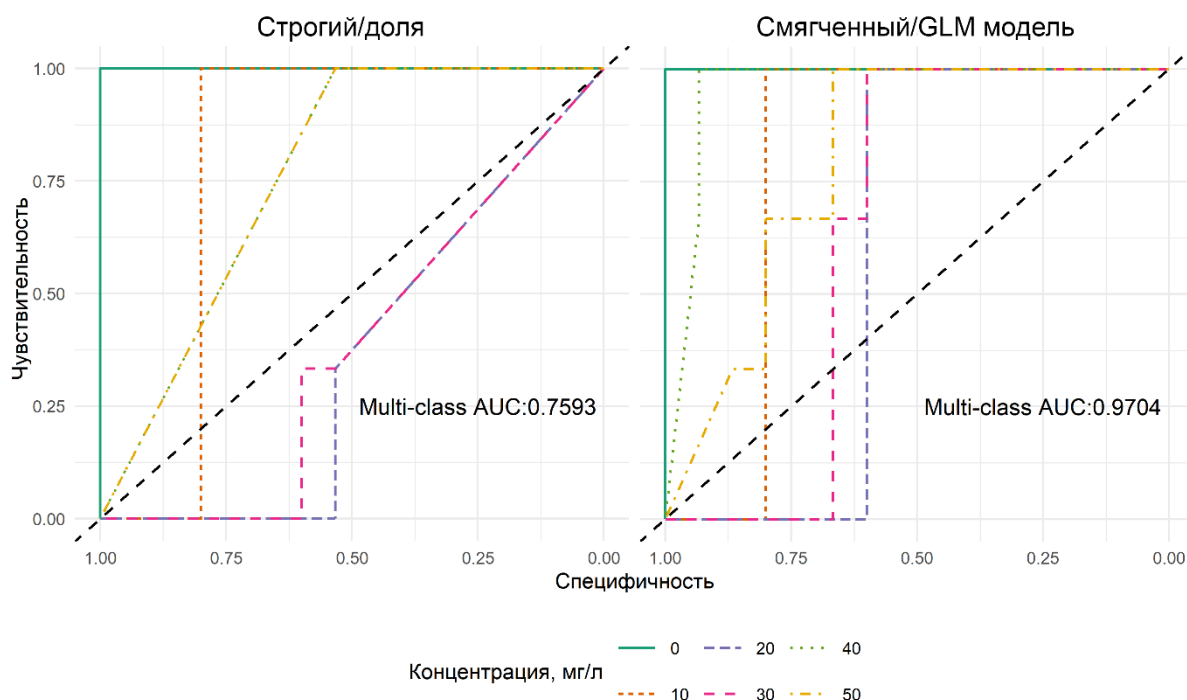


Рисунок 8. Проведенный ROC-анализ качества разделения уровней токсического эффекта (соответствующим концентрациям $K_2Cr_2O_7$) с использованием различных критериев "нормальности" строения велигера и способов оценки токсического воздействия. И использованные комбинации указаны через дробь, в названии каждого графика. Для каждой исследованной концентрации построена уникальная ROC-кривая (легенда в нижней

части рисунка); для каждого выбранного способа классификации рассчитана площадь под мультиклассовой ROC-кривой (Multi-class AUC).

Использование в качестве критерия оценки токсичности обобщенной модели по сравнению с классическим критерием (доля D-велигеров) повышает качество классификации (AUC) вплоть до 21%. Одновременно с этим, использование смягченного критерия "нормальности" (учёт личинок с "выступающей мантией" и "седловидным замком" наравне с D-велигерами) незначительно увеличивает точность как классической оценки (с 0.759 до 0.833), так и оценки с использованием обобщенной модели (с 0.944 до 0.970). Таким образом, ключевую роль в повышении точности играет именно использование GLM-модели в качестве классификатора. Проведенное в работе имитационное моделирование свидетельствует об отсутствии необходимости самостоятельного (отдельного) учёта редко встречаемых морфотипов (таких как "выступающая мантия" и "седловидный замок").

Ввиду того, что построение обобщенных линейных моделей не всегда является удобным, а также значимого вклада как доли D-велигеров, так и личинок с морфологическими отклонениями ("асимметричных" личинок) в общую оценку эффекта воздействия, в работе предложен способ оценки токсичности, опирающийся на индекс, схожий с предложенным Моррони с соавторами (Morroni et al., 2016):

$$D_{index} = \sum_{i=m}^n (\beta_i \times p_i)$$

где:

i – порядковый номер морфотипа личинок;

n – общее количество обнаруженных морфотипов с деформациями раковины;

β_i – коэффициент, рассчитываемый с учётом параметров модели;

p_i – частота встречаемости данного морфотипа.

Используя рассчитанный таким способом D-индекс в качестве классификатора уровней негативного воздействия $K_2Cr_2O_7$, можно достичь точности на уровне GLM-модели, что ощутимо выше по сравнению с использованием исключительно доли D-велигеров. Так, сравнивая доли D-велигеров с D-индексом при оценке воздействия $K_2Cr_2O_7$ в ряду концентраций от 10 до 50 мг/л, можно отметить, что при использовании доли D-велигеров эффект воздействия от 20 до 50 мг/л неразличим. В то же время использование D-индекса позволяет в данном случае однозначно отделить 20 мг/л и отчасти разделить более высокие концентрации (рис. 9).

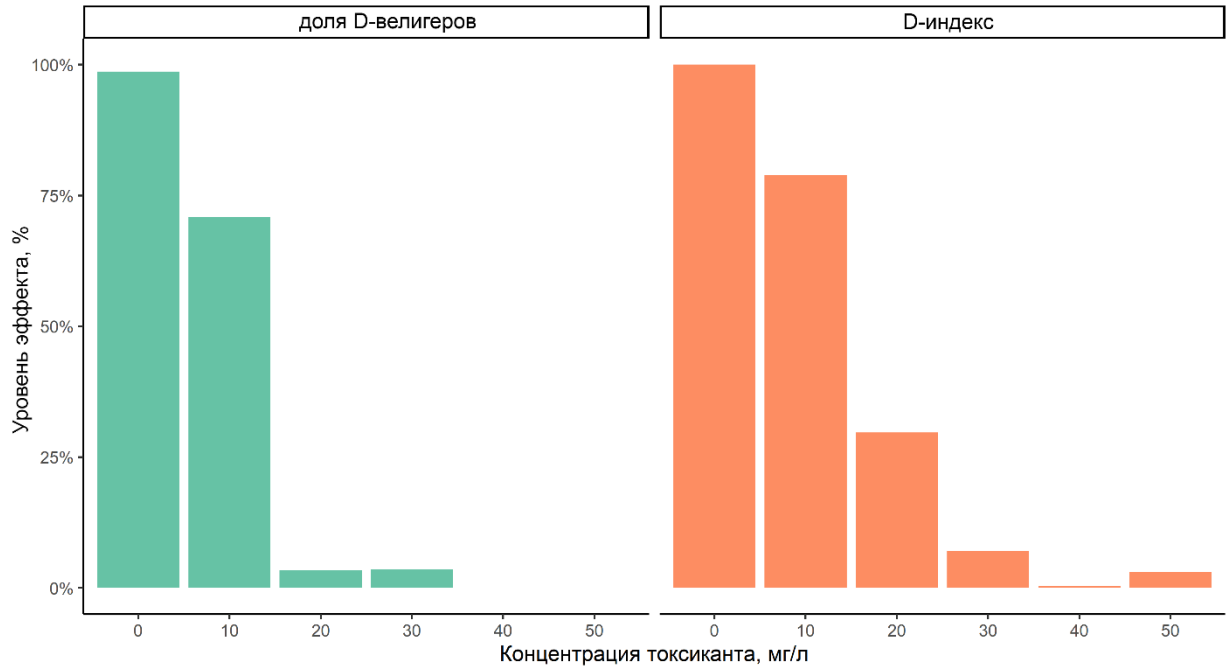


Рисунок 9. Сравнение оценки эффекта воздействия $K_2Cr_2O_7$ в ряду концентраций от 10 до 50 мг/л при использовании в качестве критерия токсичности ЭЛТ двустворчатых моллюсков доли "идеальных" D-велигеров и предложенного D-индекса.

Заключение. В настоящей работе сделана попытка обосновать использование критерия оценки негативного воздействия, основанного на выявленной способности личинок к восстановлению после кратковременного воздействия модельного токсиканта. Полученные результаты показали, что по мере роста концентрации токсиканта увеличивается доля личинок с морфологическими отклонениями. Однако даже при кратковременном воздействии токсиканта в концентрациях, превышающих EC_{50} , возможно восстановление развития и дальнейший рост личинок. Определяющим фактором является развитие личиночной раковины во время воздействия: личинки, не сформировавшие раковину, не способны к восстановлению развития после окончания негативного воздействия. На основании анализа полученных данных предложена модель и обоснован критерий оценки воздействия в эмбрионально-личиночном тестировании двустворчатых моллюсков, увеличивающие точность классификации различных уровней негативного воздействия. Дальнейшие исследования с различными вариантами кратковременного негативного воздействия на различных модельных объектах позволят подтвердить возможность использования предложенного критерия оценки воздействия и D-индекса в биотестировании с целью повышения качества оценки уровня воздействия и моделирования долгосрочных последствий негативных воздействий на экосистемы.

Выводы

1. Бихромат калия ($K_2Cr_2O_7$) оказывает значимое воздействие на раннее развитие *M. edulis*, вызывая развитие личинок с выраженными морфологическими отклонениями, доля которых при увеличении концентрации токсиканта растёт. При концентрациях токсиканта до 30 мг/л преобладают личинки с деформациями раковины; при более высоких концентрациях (более 30 мг/л) формирование раковины не происходит.

2. Показана принципиальная возможность восстановления нормального строения раковины личинками с деформациями раковины, полученными вследствие краткосрочного воздействия концентраций $K_2Cr_2O_7$ вплоть до 20 мг/л. По ходу реабилитации негативный эффект воздействия токсиканта сохраняется в виде разницы в размерах личиночной раковины и/или темпов её роста по сравнению с контрольными.

3. Наличие сформированной раковины у личинок *M. edulis* по завершении эмбрионально-личиночного тестирования служит важным маркёром при оценке токсичности. Высокий уровень смертности (более 50%) во время отмывки характерен для проб из концентраций токсиканта более 30 мг/л, при которых подавляющее большинство личинок не имели раковину после окончания экспериментов по оценке токсического воздействия.

4. Анализ строения личинок с отклонениями подтверждает, что негативное воздействие токсиканта выражается в нарушении развития раковин, что приводит к появлению морфологических деформаций:

- а. личинки с "выступающей мантией" представляют вариации нормальных прямозамковых велигеров, зафиксированных на различных стадиях ретракции вельюма;
- б. личинки с "седловидным замком" имеют значительные участки замкового края раковины, нескрепленные лигаментом, что и обуславливает выявляемую деформацию раковины;
- в. особенностью "асимметричных" личинок является несоответствие степени развития раковины и мягких тканей. Ввиду небольших размеров раковины объем мантийной полости оказывается недостаточным для полной ретракции вельюма.

5. Предложен критерий токсичности, учитывающий способность личинок к восстановлению, который позволяет с большей точностью разделять уровни негативного воздействия. Это возможно благодаря учёту всех личинок, развивших раковину по

окончании эмбрионально-личиночного тестирования, с введением поправочных коэффициентов в зависимости от типа деформации раковины.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в научных журналах, индексируемых в базах данных Scopus, WoS, RSCI

1. **Саидов Д. М.**, Косевич И. А. Влияние тяжелых металлов (Cu, Co, Cd) на раннее развитие *Mytilus edulis* (Mollusca; Bivalvia) // Экология. — 2019. — № 1. — С. 55–61.
Saidov D. M., Kosevich I. A. Effect of heavy metals (Cu, Co, Cd) on the early development of *Mytilus edulis* (Mollusca; Bivalvia) // Russian Journal of Ecology. — 2019. — Vol. 50, no. 1. — P. 58–64.
2. **Saidov D. M.**, Kosevich I. A. Rehabilitation of *Mytilus edulis* larvae abnormalities induced by $K_2Cr_2O_7$ in short-term experiments // Ecotoxicology. — 2021. — Vol. 30, no. 6. — P. 1242–1250.
3. Мостовщикова П. С., **Саидов Д. М.**, Косевич И. А. Отклонения в строении эфир при химической индукции стробилиации у *Aurelia aurita* (Scyphozoa, Cnidaria) // Онтогенез. — 2022. — Т. 53, № 2. — С. 1–18.
Mostovshchikova P. S., **Saidov D. M.**, Kosevich I. A. Morphological deviations in ephyrae after chemical induction of strobilation in *Aurelia aurita* (Scyphozoa, Cnidaria) // Russian Journal of Developmental Biology. — 2022. — Vol. 53, no. 2. — P. 82–98.

Прочие публикации

1. Саидов Д. М. Влияние солей тяжелых металлов на раннее развитие двустворчатых моллюсков (Mollusca, Bivalvia) // Материалы Международного молодежного научного форума ЛОМОНОСОВ-2013 / Под ред. А. Андреев, А. В. Андриянов, Е. А. Антипов, М. Чистякова. — Москва: Москва, 2013. — С. 127–128.
2. Саидов Д. М., Косевич И. А. Особенности раннего развития *Mytilus edulis* (Mollusca, Bivalvia) в применении к биотестированию // Зоология беспозвоночных – Новый Век: материалы конференции, посвященной 160-летию кафедры зоологии беспозвоночных Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (19-21 декабря 2018 г.) / Под ред. И. И. Гордеев. — Москва, 2018. — С. 109.
3. Саидов Д. М., Саидов Г. М. Использование искусственной нейронной сети в анализе и количественной обработке данных биотестирования // Морские биологические исследования: достижения и перспективы: в 3-х т.: сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, приуроченной к 145-летию Севастопольской биологической станции. — Т. 1. — ЭКОСИ-Гидрофизика Севастополь, 2016. — С. 279–281.