

Водные биоресурсы и среда обитания

2022, том 5, номер 3, с. 60–68

<http://journal.azniirkh.ru>, www.azniirkh.ru

doi: 10.47921/2619-1024_2022_5_3_60

ISSN 2618-8147 print, ISSN 2619-1024 online



Aquatic Bioresources & Environment

2022, vol. 5, no. 3, pp. 60–68

<http://journal.azniirkh.ru>, www.azniirkh.ru

doi: 10.47921/2619-1024_2022_5_3_60

ISSN 2618-8147 print, ISSN 2619-1024 online

УДК 594.124-111.3:661.744.224

ВЛИЯНИЕ ЭФИРА ДИ(2-ЭТИЛГЕКСИЛ)ФТАЛАТА НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ГЕМОЛИМФЫ СРЕДИЗЕМНОМОРСКОЙ МИДИИ (*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*)

© 2022 А. А. Ткачук, М. С. Подольская, А. Ю. Андреева, Е. С. Кладченко

ФГБУН Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей
имени А.О. Ковалевского РАН» (ФИЦ ИнБЮМ), Севастополь 299011, Россия

E-mail: aatkachuk86@gmail.com

Аннотация. Ди(2-этилгексил)фталат (ДЕНП) является наиболее распространенным эфиром фталевой кислоты при производстве пластиковой продукции, которая повсеместно загрязняет воды Мирового океана. На сегодняшний день мало изучены механизмы воздействия токсичных продуктов распада пластика на живые организмы. В настоящей работе проводилось исследование влияния ДЕНП в различных концентрациях (0,4 и 4,0 мг/л) на клеточный состав гемолимфы, а также функциональные параметры гемоцитов средиземноморской мидии (*Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)). Пробы снимали спустя 24 и 48 часов инкубирования моллюсков в воде с различным содержанием ДЕНП. Изменение клеточного состава гемолимфы мидий, а также способность продукции активных форм кислорода гемоцитами анализировали с помощью методов проточной цитометрии и оптической микроскопии. Показано, что в гемолимфе происходило увеличение доли гранулоцитов (с $4,0 \pm 0,5$ до $38,4 \pm 7,3$ %) уже спустя 24 часа экспериментального периода. Кроме этого, отмечалось снижение содержания активных форм кислорода (АФК) в гемоцитах, причем более существенные изменения проявлялись под воздействием меньшей концентрации ДЕНП (0,4 мг/л). Результаты исследования могут свидетельствовать о токсическом воздействии ДЕНП на иммунные функции клеток гемолимфы.

Ключевые слова: ди(2-этилгексил)фталат, средиземноморская мидия (*Mytilus galloprovincialis*), гемоциты, АФК

EFFECT OF THE DI(2-ETHYLHEXYL)PHTHALATE ESTER ON THE FUNCTIONAL PARAMETERS OF THE HEMOLYMPH OF THE MEDITERRANEAN MUSSEL (*MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*)

A. A. Tkachuk, M. S. Podolskaya, A. Yu. Andreeva, E. S. Kladchenko

*FSBIS Federal Research Center "A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS" (FRC IBSS), Sevastopol 299011, Russia
E-mail: aatkachuk86@gmail.com*

Abstract. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) is the most common phthalic acid ester used in plastic matter ubiquitously polluting the World Ocean. To date, the mechanisms of the toxic effect of plastic degradation products on aquatic living organisms have been poorly studied. In this work, we investigated the effect of DEHP at various concentrations (0.4 and 4.0 mg/L) on the hemolymph cellular composition and functional parameters of the hemocytes of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)). Hemolymph samples were taken following 24- and 48-hour incubation of the molluscs in the water containing different concentrations of DEHP. Changes in the cellular composition of the mussel hemolymph and in the levels of reactive oxygen species production by hemocytes have been analyzed using flow cytometry and light microscopy. After 24 hours of experimental exposure to DEHP, an increase in the granulocyte number (from 4.0 ± 0.5 to 38.4 ± 7.3 %) was already observed. Additionally, a decrease in intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) in hemocytes was recorded, and the most considerable changes occurred at the lower concentration of DEHP (0.4 mg/L). The results of this study may be indicative of a toxic effect of DEHP on the immune functions of mussel hemolymph cells.

Keywords: di(2-ethylhexyl)phthalate, Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*), hemocytes, ROS

ВВЕДЕНИЕ

Мировое производство пластмасс непрерывно растет. Изделия из пластика получили широкое применение практически во всех сферах деятельности человека из-за простоты их обработки, долговечности и относительно низкой стоимости [1]. В 2019 г. количество произведенного пластика составило 368 млн т за год [2]. Такое количество пластмасс привело к новой экологической проблеме — загрязнению Мирового океана пластиковыми отходами. По некоторым оценкам, в 2010 г. в Мировой океан попало от 4,8 до 12,7 млн т пластиковых отходов и, исходя из прогнозов экспертов, его количество увеличится и к 2025 г. составит примерно 17,5 млн метрических тонн пластика в год [3, 4].

Значительная часть пластиковых отходов состоит из поливинилхлорида (ПВХ) [5]. Для придания гибкости, прочности и прозрачности изделиям из ПВХ при его производстве используются пластификаторы — эфиры фталевой кислоты (фталаты) [6]. Фталаты химически не связаны с матрицей пластика, поэтому способны легко выделяться в окружающую среду, становясь доступными для морской флоры и

фауны и воздействуя непосредственно на водные организмы [7].

В водах Мирового океана концентрация фталатов варьируется от нескольких пг/л до 10 мкг/л [8]. Помимо водной толщи, фталаты способны накапливаться в донных отложениях. Так, например, в исследовании Klamer et al. (2005) [9] фталаты были обнаружены в отложениях Северного моря, а ди(2-этилгексил)фталат (DEHP) являлся преобладающим типом пластификаторов с концентрацией от 170 до 3390 мкг/кг. При изучении донных отложений Каспийского моря содержание фталатов составило 2300 мкг/кг, а средняя концентрация DEHP — 863 мкг/кг [10]. Высокое содержание в водной среде ди(2-этилгексил)фталата относительно других видов эфиров фталевой кислоты обусловлено тем, что DEHP является наиболее часто используемым пластификатором в рецептурах ПВХ [11]. Фталаты могут вызывать нарушения в эндокринной системе, оказывая иммунотоксический и нейротоксический эффект, а также приводя к развитию окислительного стресса у морских организмов, в т. ч. двустворчатых моллюсков [12]. Так, установлено снижение жизнеспособности линии эмбриональных клеток

европейского морского окуня *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) в результате инкубации с ДЕНР [13]. Также воздействие ДЕНР приводило к нарушению метаболических функций и липидного обмена у рыб *Oryzias melastigma* (McClelland, 1839) [14]. У моллюска венеры *Ruditapes philippinarum* (A. Adams & Reeve, 1850) были отмечены негативные изменения в иммунной системе: увеличение уровня экспрессии генов, связанных с иммунитетом, и продукции активных форм кислорода (АФК) в гемоцитах [15].

Для оценки состояния морских организмов широкое применение нашли методы биоиндикации и биотестирования [16]. Двустворчатые моллюски считаются одними из лучших биоиндикаторов для исследования состояния среды. Моллюски ведут прикрепленный образ жизни, являются фильтраторами и способны накапливать химические соединения в десятки раз большей степени, чем другие виды [17]. Прикрепленный образ жизни и, следовательно, непрерывный контакт с токсикантами, присутствующими в окружающей среде, делает двустворчатых моллюсков практичными и информативными тест-объектами [18]. В настоящее время одним из распространенных методов оценки состояния моллюсков является анализ маркерных показателей клеток гемолимфы — гемоцитов. Это обусловлено широкой физиологической ролью гемоцитов в организме моллюсков. Клетки гемолимфы осуществляют фагоцитоз чужеродных микроорганизмов, способны к генерации окислительного взрыва при контакте с инфекционными агентами различной природы путем продукции АФК, выделяют неспецифические цитотоксические молекулы, реализуют трофическую и дыхательную функции и др. [19].

К настоящему моменту механизмы токсического воздействия ДЕНР на иммунную систему двустворчатых моллюсков остаются слабо исследованными, поэтому целью работы является оценка влияния различной концентрации ДЕНР на клеточный состав гемолимфы и функциональные показатели гемоцитов средиземноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были средиземноморские мидии *M. galloprovincialis* весом $12,9 \pm 2,3$ г и размером $57,8 \pm 1,8$ мм, отобранные на мидийно-устричной ферме в Севастопольской бухте. После

транспортировки мидий размещали в стеклянных аквариумах емкостью 20 л, оборудованных системой аэрации и протока воды. Температура воды в аквариумах соответствовала сезонной температуре воды в Черном море и составляла $+8$ °С. Период акклиматизации к лабораторным условиям составлял не менее 3 дней.

Моллюски были распределены случайным образом в аэрируемых аквариумах емкостью 20 л. Объем выборки для каждой точки составлял не менее 14 особей. В работе анализировали воздействие ДЕНР (аналитическая чистота $>99,0$ %) на организм моллюсков в концентрации 0,4 и 4,0 мг/л в течение 24 и 48 ч. Концентрация ДЕНР в 0,4 мг/л — это зафиксированная концентрация загрязнения в естественной среде, в то время как концентрация в 4,0 мг/л — гипотетическая концентрация, которая может возникнуть при устойчивых тенденциях загрязнения пластиковым мусором Мирового океана [15]. ДЕНР был первично растворен в 96 %-ном этиловом спирте в концентрации 1 мг/мл. Контрольная группа мидий ($n=14$) содержалась в 20-литровом стеклянном аквариуме, оборудованном системой аэрации. Каждые 24 часа в аквариумах производили замену воды с сохранением исходной концентрации ДЕНР для избежания интоксикации моллюсков продуктами метаболизма. Отбор проб гемолимфы производился по трем точкам (контрольная группа; группа, содержащаяся в воде с добавлением ДЕНР в концентрации 0,4 мг/л; группа, содержащаяся в воде с добавлением ДЕНР в концентрации 4,0 мг/л) спустя 24 часа и спустя 48 часов инкубации мидий в воде, содержащей ДЕНР.

Гемолимфу моллюсков отбирали стерильным шприцем из аддуктора и трижды отмывали в стерильной морской воде путем центрифугирования (500 g, 5 мин). Для анализа использовались пробы гемолимфы, объединенные из 2 особей. Все работы по подготовке клеток для анализа проводились при температуре $+4$ °С для предотвращения слипания клеток.

Анализ образцов гемолимфы проводился на проточном цитометре FC500 (Beckman Coulter, USA), оборудованном 1 лазером (488 нм), 5 детекторами флуоресценции (FL1–FL5), детектором светорассеивания в боковом (SS) и прямом (FS) направлениях. Готовые суспензии гемоцитов разводили стерильной морской водой (концентрация клеток $1-2 \cdot 10^6$ на 1 мл) и окрашивали

ДНК-специфичным красителем SYBR Green I (финальная концентрация в пробах 10 мкМ, инкубация 40 минут в темноте). Идентификацию клеток гемолимфы проводили на основании оценки размеров и гранулярности гемоцитов на двухпараметрических гистограммах распределения клеток по параметрам прямого (FS) и бокового (SS) светорассеяния, соответственно. Дискриминация клеточных агрегатов проводилась на основании анализа распределения интенсивности флуоресценции красителя в канале FL2 по амплитуде сигнала. В анализе учитывались только частицы, входящие в пик флуоресценции красителя SYBR Green I. Способность гемоцитов к спонтанной продукции активных форм кислорода (АФК) оценивали при помощи окрашивания клеток флуоресцентным зондом диацетат флуоресцеина (DCF-DA) (1 мл суспензии гемоцитов инкубировали с 10 мкл раствора DCF-DA в течение 40 минут в темноте). Анализ флуоресценции красителя проводили в канале FL2 (зеленая область спектра).

Для проверки нормальности распределения выборки использовался критерий Фишера. Достоверность различий между группами образцов оценивали при помощи дисперсионного анализа ANOVA при уровне значимости $p \leq 0,05$. О наличии статистически значимых различий между группами говорит превосходство полученного значения критерия Фишера над его критическим значением при заданном количестве наблюдений и количестве групп ($F > F_{\text{крит}}$). Все измерения исследуемых параметров проводились в трех повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение гемоцитов мидий по параметрам прямого и бокового светорассеяния позволило выделить две субпопуляции клеток, которые различались относительными размерами и уровнем гранулярности (рис. 1а). Относительно мелкие клетки (FS=107,8±1,9 у. е.) с низким уровнем гранулярности (SS=13,2±0,6 у. е.), которые были идентифицированы как агранулоциты, преобладали в контрольных образцах гемолимфы, составляя 95,6±0,6 % всех клеток суспензии. Крупные клетки с высокой гранулярностью (FS=259,3±6,6 и SS=37,0±2,2 у. е., соответственно) — гранулоциты — составляли 4,0±0,5 % всех клеток.

Инкубация мидий в воде, содержащей различную концентрацию ДЕНР, оказывала существенное воздействие на клеточный состав гемолимфы

(рис. 1б–д). При воздействии ДЕНР в концентрации 0,4 мг/л в течение 24 часов было замечено резкое уменьшение числа агранулоцитов по сравнению с контрольной группой, доля которых составила 61,4±7,1 % от общего числа клеток, и значительное увеличение доли гранулоцитов — до 38,4±7,3 % (n=14, p<0,05). Спустя 48 часов инкубации моллюсков в данной концентрации доли агранулоцитов и гранулоцитов вернулись к значениям, близким к контролю, и составляли 86,5±4,7 и 12,9±4,8 %, соответственно (n=14, p<0,05) (рис. 2а).

Характер воздействия ДЕНР в концентрации 4,0 мг/л на клеточный состав гемолимфы мидий отличался от такового при более низкой концентрации токсиканта. В течение всего периода воздействия данной концентрации происходило постепенное уменьшение доли агранулоцитов. Спустя 24 часа воздействия доля агранулоцитов составляла 86,5±7,2 %, а через 48 часов — 75,6±8,3 %. В свою очередь, доля гранулоцитов постепенно возрастала: через 24 часа она составляла 13,0±7,3 %, а через 48 часов — 23,6±8,7 %, однако изменения носили характер тенденции (рис. 2б).

Обе концентрации ДЕНР (0,4 и 4,0 мг/л) индуцировали снижение содержания АФК в гемоцитах, что проявлялось в выраженном уменьшении интенсивности флуоресценции агранулоцитов и гранулоцитов, окрашенных DCF-DA (таблица). При этом степень снижения способности клеток к генерации АФК была пропорциональна времени воздействия ДЕНР. Спустя 24 часа нахождения мидий в воде, содержащей 0,4 мг/л ДЕНР, способность агранулоцитов к генерации АФК упала почти в 2 раза, а на конец экспериментального периода (48 часов инкубации) интенсивность флуоресценции DCF-DA была более чем в 6 раз меньше показателя контроля (n=14, p<0,05). У гранулоцитов резкий скачок уменьшения флуоресценции произошел при воздействии 0,4 мг/л ДЕНР на второй день инкубации (48 часов), в то время как в первые 24 часа способность гранулоцитов к генерации АФК сохранялась на уровнях, близких к контролю (n=14, p<0,05).

В дозировке ДЕНР 4,0 мг/л флуоресценция DCF в клетках гемолимфы в меньшей степени определялась временем воздействия. В течение первых 24 часов воздействия данной концентрации способность агранулоцитов к генерации АФК упала более чем в 2 раза (таблица). В последующие сутки снижение содержания АФК было не таким сильным,

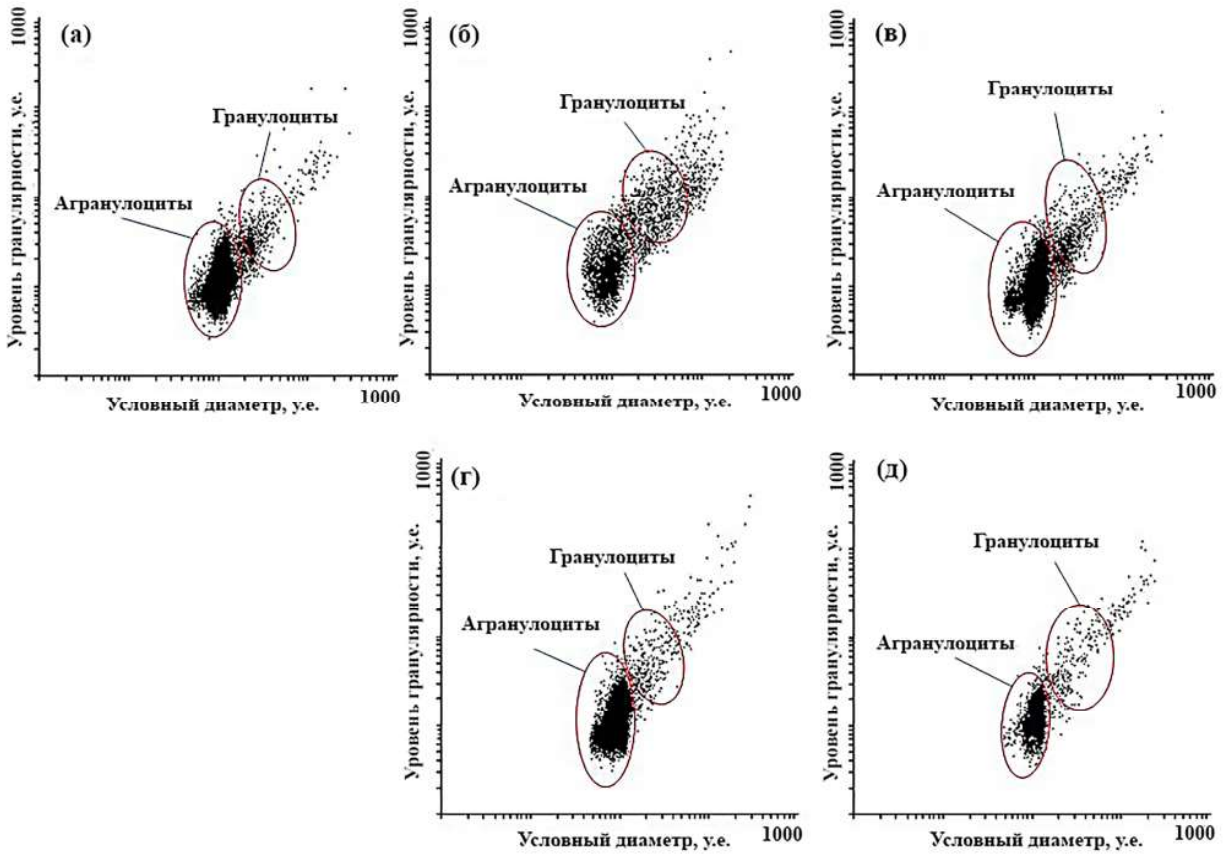


Рис. 1. Изменения клеточного состава гемолимфы мидий в результате воздействия ДЭПР: (а) контрольная группа; (б) 0,4 мг/л ДЭПР в течение 24 часов; (в) 0,4 мг/л ДЭПР в течение 48 часов; (г) 4,0 мг/л ДЭПР в течение 24 часов; (д) 4,0 мг/л ДЭПР в течение 48 часов

Fig. 1. Changes in the hemolymph cellular composition of the mussels exposed to DEHP: (a) control group; (б) 0.4 mg/L DEHP for 24 hours; (в) 0.4 mg/L DEHP for 48 hours; (г) 4.0 mg/L DEHP for 24 hours; (д) 4.0 mg/L DEHP for 48 hours

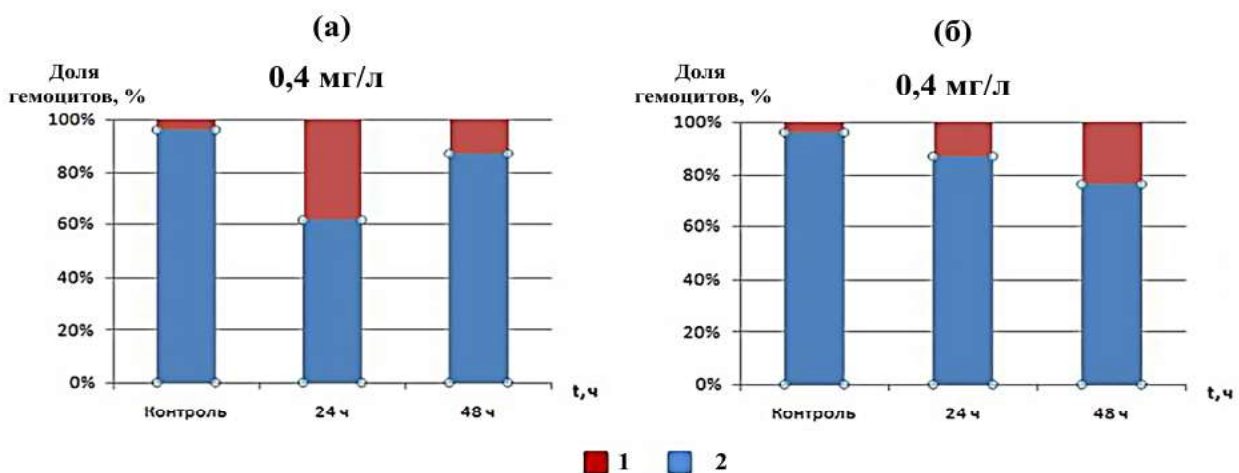


Рис. 2. Соотношение морфотипов клеток в гемолимфе при воздействии концентраций ДЭПР в 0,4 мг/л (а) и 4,0 мг/л (б): 1 — гранулоциты, 2 — агранулоциты

Fig. 2. Ratio of cell morphotypes in the hemolymph after the exposure to DEHP concentrations of 0.4 mg/L (a) and 4.0 mg/L (б): 1 — granulocytes, 2 — agranulocytes

Содержание активных форм кислорода в агранулоцитах и гранулоцитах при воздействии ДЕНР в концентрациях 0,4 и 4,0 мг/л

Content of reactive oxygen species in agranulocytes and granulocytes after the exposure to DENP concentrations of 0.4 and 4.0 mg/L

Тип клеток Cell type	Контроль Control group	ДЕНР 0,4 мг/л / 0.4 mg/L		ДЕНР 4,0 мг/л / 4.0 mg/L	
		24 ч. / 24 h	48 ч. / 48 h	24 ч. / 24 h	48 ч. / 24 h
Агранулоциты Agranulocytes	714,1±126,2	345,6±29,3*	115,4±26,3*	311,6±71,8	242,0±78,9
Гранулоциты Granulocytes	1641,8±190,4	1544,5±134,2*	322,4±85,9*	1312,2±186,5	872,2±216,9

Примечание: *Статистическая достоверность изменения показателя по сравнению с контролем

Note: *Significant difference as compared to the control group

и интенсивность флуоресценции DCF на конец экспериментального периода была почти в 3 раза меньше показателей контроля. У гранулоцитов спустя 24 часа нахождения мидий в воде, содержащей 4,0 мг/л ДЕНР, способность к генерации АФК была достаточно близка к контролю, а спустя 48 часов воздействия интенсивность флуоресценции DCF была почти в 2 раза меньше контроля ($p < 0,05$).

По результатам проделанной работы было выявлено, что воздействие ДЕНР *in vivo* влияло на функциональное состояние мидий (*M. galloprovincialis*). Инкубирование мидий в воде, содержащей ДЕНР, приводило к достоверным изменениям клеточного состава гемолимфы, которые зависели от времени влияния вещества на организм моллюска ($n=14$, $p < 0,05$). Так, в первые сутки экспериментального периода при концентрации ДЕНР 0,4 мг/л произошел резкий рост доли гранулоцитов, а в последующие сутки этот показатель стремился к контрольному уровню. Влияние ДЕНР в большей дозировке (4,0 мг/л) в меньшей степени оказывало воздействие на клеточный состав гемолимфы мидий: наблюдалась слабая тенденция роста доли гранулоцитов со временем инкубации. Повышение доли гранулоцитов свидетельствует об активации иммунного ответа, поскольку эти клетки в большей степени реализуют клеточные иммунные функции [20]. Аналогично полученным результатам, в исследовании воздействия хлорида кадмия и дизельного топлива в концентрациях 2 мг/л и 2 мл/л соответственно в течение 36 часов на двустворчатых моллюсков (*Anadara inaequalis* (Bruguière, 1789) и *M. galloprovincialis*) наблюдалось увеличение числа гранулярных клеток в гемолимфе экстрапаллиальной жидкости [21]. При воздействии бенз(а)пирена (BaP) на мидию *M. galloprovincialis* [22] и устрицу *Magallana gigas* (Thunberg, 1793)

[23] также отмечались сдвиги клеточного состава гемолимфы в сторону роста доли гранулоцитов. В первом случае длительность воздействия BaP *in vivo* составляла 7 и 14 дней с концентрацией 150 нг/л, во втором случае — *in vitro* 4 и 24 ч. в дозах 200 мкмоль/л. В обоих исследованиях влияние бенз(а)пирена отразилось на соотношении типов клеток в гемолимфе моллюсков с заметным увеличением доли гранулоцитов, что свидетельствует о стимулировании иммунной реакции организма. Таким образом, воздействие ДЕНР на клеточный состав гемолимфы, очевидно, носит неспецифический характер и сходно с воздействием других токсикантов.

Спонтанная продукция активных форм кислорода играет важную роль в клеточной защите организма двустворчатых моллюсков. Молекулы АФК участвуют в реализации неспецифического иммунного ответа, оказывая цитотоксический эффект на патогенные микроорганизмы и вызывая у них окислительный стресс [24]. В данной работе инкубация моллюсков в среде, содержащей ДЕНР, приводила к снижению способности гемоцитов к генерации АФК ($n=14$, $p < 0,05$). Наиболее выраженный эффект отмечался при воздействии меньшей концентрации (0,4 мг/л). Это позволяет предположить токсическое воздействие ДЕНР на иммунные функции клеток гемолимфы. У гранулоцитов способность к спонтанной продукции АФК была в большей степени подвержена влиянию ДЕНР, в сравнении с агранулоцитами. Исследование воздействия хлороталонила на активацию иммунного ответа гемоцитов устрицы *in vitro* в концентрации 10, 50, 100, 250 и 500 мг/л в течение 20 ч. выявило дозозависимое снижение общей продукции АФК [25]. В работе Gómez-Mendikute et al., 2003 [26] гемоциты мидий обрабатывали тяжелыми металлами (кадмием (Cd) и медью (Cu)) в различных

концентрациях в условиях *in vitro*, а также органическими ксенобиотиками паракватом и бенз(а)-пиреном в течение 24 часов. Уменьшение продукции АФК наблюдалось только в гемоцитах, обработанных Cu. Нарушение способности гемоцитов продуцировать АФК можно рассматривать как показатель иммуносупрессии, поскольку свободные радикалы участвуют в механизмах клеточно-опосредованной противомикробной защиты [24]. Предположения о иммунотоксичности фталатов на молекулярном уровне у двусторчатых моллюсков были высказаны ранее в исследовании Lu Y. et al., 2013 [15]. Воздействие ДЕНР в концентрациях 0,4 и 4,0 мг/л приводило к изменениям экспрессии генов, связанных с иммунитетом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, сходно с исследованными ранее ксенобиотиками, ДЕНР вызывал токсический эффект на двусторчатых моллюсков. Различные концентрации ДЕНР уже спустя сутки оказывали негативное влияние на некоторые иммунные параметры мидии *M. galloprovincialis*, такие как соотношение типов клеток в гемолимфе и способность гемоцитов к генерации активных форм кислорода. Изменение этих показателей может свидетельствовать об интоксикации организма моллюска. Исследование показывает, что иммунная система мидий чувствительна к относительно низким концентрациям ДЕНР (0,4 мг/л), что говорит о высокой токсичности данного пластификатора.

Работа выполнена в рамках госзадания № 121102500161-4 «Закономерности организации иммунной системы промысловых гидробионтов и исследование влияния факторов внешней среды на функционирование их защитных систем».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andrady A.L. Microplastics in the marine environment // *Marine Pollution Bulletin*. 2011. Vol. 62, issue 8. Pp. 1596–1605. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.05.030.
2. Sun S., Shi W., Tang Y., Han Y., Du X., Zhou W., Hu Y., Zhou C., Liu G. Immunotoxicity of petroleum hydrocarbons and microplastics alone or in combination to a bivalve species: Synergic impacts and potential toxication mechanisms // *Science of the Total Environment*. 2020. Vol. 728. e138852. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138852.
3. Tang Y., Zhou W., Sun S., Du X., Han Y., Shi W., Liu G. Immunotoxicity and neurotoxicity of bisphenol A and microplastics alone or in combination to a bivalve species, *Tegillarca granosa* // *Environmental Pollution*. 2020. Vol. 265. e115115. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115115.
4. Jambeck J.R., Geyer R., Wilcox C., Siegler T.R., Perryman M., Andrady A., Narayan R., Law K.L. Plastic waste inputs from land into the ocean // *Science*. 2015. Vol. 347, issue 6223. Pp. 768–771. doi: 10.1126/science.1260352.
5. Yu J., Sun L., Ma C., Qiao Y., Yao H. Thermal degradation of PVC: A review // *Waste Management*. 2016. Vol. 48. Pp. 300–314. doi: 10.1016/j.wasman.2015.11.041.
6. Aurela B., Kulmala H., Söderhjelm L. Phthalates in paper and board packaging and their migration into Tenax and sugar // *Food Additives & Contaminants*. 1999. Vol. 16, no. 12. Pp. 571–577. doi: 10.1080/026520399283713
7. Lithner D., Nordensvan I., Dave G. Comparative acute toxicity of leachates from plastic products made of polypropylene, polyethylene, PVC, acrylonitrile-butadiene-styrene, and epoxy to *Daphnia magna* // *Environmental Science and Pollution Research International*. 2012. Vol. 19, no. 5. Pp. 1763–1772. doi: 10.1007/s11356-011-0663-5.
8. Hermabessiere L., Dehaut A., Paul-Pont I., Lacroix C., Jezequel R., Soudant P., Duflos G. Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review // *Chemosphere*. 2017. Vol. 182. Pp. 781–793. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.05.096.
9. Klamer H.J.C., Leonards P.E., Lamoree M.H., Villerius L.A., Akerman J.E., Bakker J.F. A chemical and toxicological profile of Dutch North Sea surface sediments // *Chemosphere*. 2005. Vol. 58, no. 11. Pp. 1579–1587. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.11.027.
10. Татарников В.О., Коршенко А.Н., Кочетков А.И., Азмухамбетова Д.Х. Фталаты в донных отложениях российского сектора Каспийского моря // *Труды Государственного океанографического института*. 2020. № 221. С. 143–153.
11. Heudorf U., Mersch-Sundermann V., Angerer J. Phthalates: toxicology and exposure // *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2007. Vol. 210, no. 5. Pp. 623–634. doi: 10.1016/j.ijheh.2007.07.011.
12. Rios-Fuster B., Alomar C., Capó X., González G.P., Martínez R.M.G., Rojas D.L.S., Silva M., Hernando P.F., Solé M., Freitas R., Deudero S. Assessment of the impact of aquaculture facilities on transplanted mussels (*Mytilus galloprovincialis*): Integrating plasticizers and physiological analyses as a biomonitoring strategy // *Journal of Hazardous Materials*. 2022. Vol. 424, part A. e127264. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.127264.
13. Molino C., Filippi S., Stoppiello G.A., Meschini R., Angeletti D. *In vitro* evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of Di(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) embryonic

- cell line // *Toxicology in Vitro*. 2019. Vol. 56. Pp. 118–125. doi: 10.1016/j.tiv.2019.01.017.
14. Yin X., Zeb R., Wei H., Cai L. Acute exposure of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) induces immune signal regulation and ferroptosis in *Oryzias melastigma* // *Chemosphere*. 2021. Vol. 265. e129053. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.129053.
15. Lu Y., Zhang P., Li C., Su X., Jin C., Li Y., Xu Y., Li T. Characterisation of immune-related gene expression in clam (*Venerupis philippinarum*) under exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate // *Fish & Shellfish Immunology*. 2013. Vol. 34, no. 1. Pp. 142–146. doi: 10.1016/j.fsi.2012.10.015.
16. Elder J.F., Collins J.J. Freshwater molluscs as indicators of bioavailability and toxicity of metals in surface water systems // *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 1991. Vol. 122. Pp. 37–79. doi: 10.1007/978-1-4612-3198-1_2.
17. Jahan S., Strezov V. Assessment of trace elements pollution in the sea ports of New South Wales (NSW), Australia using oysters as bioindicators // *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, no. 1. e1416.
18. Sherry J.P. The role of biomarkers in the health assessment of aquatic ecosystems // *Aquatic Ecosystem Health & Management*. 2003. Vol. 6, issue 4. Pp. 423–440. doi: 10.1080/714044172.
19. Андреева А.Ю., Кладченко Е.С., Кухарева Т.А., Сахонь Е.Г. Анализ клеточного цикла и морфофункциональных параметров гемоцитов *Mytilus galloprovincialis* Lam., 1819 (Bivalvia) в прибрежных экосистемах с различной антропогенной нагрузкой // *Биология внутренних вод*. 2019. № 4–2. Pp. 74–81. doi: 10.1134/S0320965219060032.
20. Aladaileh S., Nair S.V., Birch D., Raftos D.A. Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: morphology and function // *Journal of Invertebrate Pathology*. 2007. Vol. 96, no. 1. Pp. 48–63. doi: 10.1016/j.jip.2007.02.011.
21. Kolyuchkina G.A., Ismailov A.D. Parameters of extrapallial fluid of bivalves as nonspecific biomarkers of short-term environmental pollution // *Oceanology*. 2007. Vol. 47, no. 2. Pp. 213–220. doi: 10.1134/S0001437007020087.
22. Pittura L., Avio C.G., Giuliani M.E., d'Errico G., Keiter S.H., Cormier B., Gorbi S., Regoli F. Microplastics as vehicles of environmental PAHs to marine organisms: Combined chemical and physical hazards to the Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis* // *Frontiers in Marine Science*. 2018. Vol. 5. e103. doi: 10.3389/fmars.2018.00103.
23. Gagnaire B., Thomas-Guyon H., Burgeot T., Renault T. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry // *Cell Biology and Toxicology*. 2006. Vol. 22, no. 1. Pp. 1–14. doi: 10.1007/s10565-006-0011-6.
24. Anderson R.S., Mora L.M., Thomson S.A. Modulation of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocyte immune function by copper, as measured by luminol-enhanced chemiluminescence // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 1994. Vol. 108, issue 2. Pp. 215–220. doi: 10.1016/1367-8280(94)90033-7.
25. Baier-Anderson C., Anderson R.S. The effects of chlorothalonil on oyster hemocyte activation: Phagocytosis, reduced pyridine nucleotides, and reactive oxygen species production // *Environmental Research*. 2000. Vol. 83, no. 1. Pp. 72–78. doi: 10.1006/enrs.1999.4033.
26. Gómez-Mendikute A., Cajaraville M.P. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes // *Toxicology in Vitro*. 2003. Vol. 17, no. 5–6. Pp. 539–546. doi: 10.1016/s0887-2333(03)00093-6.

REFERENCES

1. Andrady A.L. Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, vol. 62, issue 8, pp. 1596–1605. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.05.030.
2. Sun S., Shi W., Tang Y., Han Y., Du X., Zhou W., Hu Y., Zhou C., Liu G. Immunotoxicity of petroleum hydrocarbons and microplastics alone or in combination to a bivalve species: Synergic impacts and potential toxication mechanisms. *Science of the Total Environment*, 2020, vol. 728, e138852. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138852.
3. Tang Y., Zhou W., Sun S., Du X., Han Y., Shi W., Liu G. Immunotoxicity and neurotoxicity of bisphenol A and microplastics alone or in combination to a bivalve species, *Tegillarca granosa*. *Environmental Pollution*, 2020, vol. 265, e115115. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115115.
4. Jambeck J.R., Geyer R., Wilcox C., Siegler T.R., Perryman M., Andrady A., Narayan R., Law K.L. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 2015, vol. 347, issue 6223, pp. 768–771. doi: 10.1126/science.1260352.
5. Yu J., Sun L., Ma C., Qiao Y., Yao H. Thermal degradation of PVC: A review. *Waste Management*, 2016, vol. 48, pp. 300–314. doi: 10.1016/j.wasman.2015.11.041.
6. Aurela B., Kulmala H., Söderhjelm L. Phthalates in paper and board packaging and their migration into Tenax and sugar. *Food Additives & Contaminants*, 1999, vol. 16, no. 12, pp. 571–577. doi: 10.1080/026520399283713.
7. Lithner D., Nordensvan I., Dave G. Comparative acute toxicity of leachates from plastic products made of polypropylene, polyethylene, PVC, acrylonitrile-butadiene-styrene, and epoxy to *Daphnia magna*. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2012, vol. 19, no. 5, pp. 1763–1772. doi: 10.1007/s11356-011-0663-5.

8. Hermabessiere L., Dehaut A., Paul-Pont I., Lacroix C., Jezequel R., Soudant P., Dufflos G. Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review. *Chemosphere*, 2017, vol. 182, pp. 781–793. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.05.096.
9. Klamer H.J.C., Leonards P.E., Lamoree M.H., Villerius L.A., Akerman J.E., Bakker J.F. A chemical and toxicological profile of Dutch North Sea surface sediments. *Chemosphere*, 2005, vol. 58, no. 11, pp. 1579–1587. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.11.027.
10. Tatarnikov V.O., Korshenko A.N., Kochetkov A.I., Azmukhambetova D.Kh. Ftalaty v donnykh otlozheniyakh rossiyskogo sektora Kaspiyskogo morya [Phthalates in the bottom sediments of the Russian Sector of the Caspian Sea]. *Trudy Gosudarstvennogo okeanograficheskogo instituta [Proceedings of N.N. Zubov State Oceanographic Institute]*, 2020, no. 221, pp. 143–153. (In Russian).
11. Heudorf U., Mersch-Sundermann V., Angerer J. Phthalates: toxicology and exposure. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2007, vol. 210, no. 5, pp. 623–634. doi: 10.1016/j.ijheh.2007.07.011.
12. Rios-Fuster B., Alomar C., Capó X., González G.P., Martínez R.M.G., Rojas D.L.S., Silva M., Hernando P.F., Solé M., Freitas R., Deudero S. Assessment of the impact of aquaculture facilities on transplanted mussels (*Mytilus galloprovincialis*): Integrating plasticizers and physiological analyses as a biomonitoring strategy. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, vol. 424, part A, e127264. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.127264.
13. Molino C., Filippi S., Stoppiello G.A., Meschini R., Angeletti D. *In vitro* evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of Di(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) embryonic cell line. *Toxicology in Vitro*, 2019, vol. 56, pp. 118–125. doi: 10.1016/j.tiv.2019.01.017.
14. Yin X., Zeb R., Wei H., Cai L. Acute exposure of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) induces immune signal regulation and ferroptosis in *Oryzias melastigma*. *Chemosphere*, 2021, vol. 265, e129053. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.129053.
15. Lu Y., Zhang P., Li C., Su X., Jin C., Li Y., Xu Y., Li T. Characterisation of immune-related gene expression in clam (*Venerupis philippinarum*) under exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, vol. 34, no. 1, pp. 142–146. doi: 10.1016/j.fsi.2012.10.015.
16. Elder J.F., Collins J.J. Freshwater molluscs as indicators of bioavailability and toxicity of metals in surface-water systems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 1991, vol. 122, pp. 37–79. doi: 10.1007/978-1-4612-3198-1_2.
17. Jahan S., Strezov V. Assessment of trace elements pollution in the sea ports of New South Wales (NSW), Australia using oysters as bioindicators. *Scientific Reports*, 2019, vol. 9, no. 1, e1416.
18. Sherry J.P. The role of biomarkers in the health assessment of aquatic ecosystems. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 2003, vol. 6, issue 4, pp. 423–440. doi: 10.1080/714044172.
19. Andreyeva A.Y., Kladchenko E.S., Kukhareva T.A., Sakhon E.G. Analysis of cell cycle and morphological and functional abnormalities of *Mytilus galloprovincialis* Lam., 1819 (Bivalvia) hemocytes from coastal ecosystems near Sevastopol, Crimea. *Inland Water Biology*, 2019, vol. 12, suppl. 2, pp. 96–103. doi: 10.1134/S1995082919060038.
20. Aladaileh S., Nair S.V., Birch D., Raftos D.A. Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: morphology and function. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2007, vol. 96, no. 1, pp. 48–63. doi: 10.1016/j.jip.2007.02.011.
21. Kolyuchkina G.A., Ismailov A.D. Parameters of extrapallial fluid of bivalves as nonspecific biomarkers of short-term environmental pollution. *Oceanology*, 2007, vol. 47, no. 2, pp. 213–220. doi: 10.1134/S0001437007020087.
22. Pittura L., Avio C.G., Giuliani M.E., d'Errico G., Keiter S.H., Cormier B., Gorbi S., Regoli F. Microplastics as vehicles of environmental PAHs to marine organisms: Combined chemical and physical hazards to the Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Frontiers in Marine Science*, 2018, vol. 5, e103. doi: 10.3389/fmars.2018.00103.
23. Gagnaire B., Thomas-Guyon H., Burgeot T., Renault T. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biology and Toxicology*, 2006, vol. 22, no. 1, pp. 1–14. doi: 10.1007/s10565-006-0011-6.
24. Anderson R.S., Mora L.M., Thomson S.A. Modulation of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocyte immune function by copper, as measured by luminol-enhanced chemiluminescence. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1994, vol. 108, issue 2, pp. 215–220. doi: 10.1016/1367-8280(94)90033-7.
25. Baier-Anderson C., Anderson R.S. The effects of chlorothalonil on oyster hemocyte activation: Phagocytosis, reduced pyridine nucleotides, and reactive oxygen species production. *Environmental Research*, 2000, vol. 83, no. 1, pp. 72–78. doi: 10.1006/enrs.1999.4033.
26. Gómez-Mendikute A., Cajaraville M.P. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicology in Vitro*, 2003, vol. 17, no. 5–6, pp. 539–546. doi: 10.1016/s0887-2333(03)00093-6.

Поступила 18.04.2022

Принята к печати 30.05.2022