

УДК 591.3, 615.917

СНИЖЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И ИЗМЕНЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ ПОЛОВ У ПОТОМСТВА *Danio rerio* В РЕЗУЛЬТАТЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ 2,2',5,5'-ТЕТРАХЛОРБИФЕНИЛА (ПХБ 52) НА ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ В ПРЕДНЕРЕСТОВЫЙ ПЕРИОД

© 2024 г. Д. А. Коцур^{a,*}, Ю. И. Варакина^b, Т. Ю. Сорокина^b, А. С. Аксенов^b, А. П. Новоселов^a, В. П. Чащин^{b, c, d}

^aФедеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. Н.П. Лаверова Уральского отделения Российской академии наук, Архангельск, Россия

^bСеверный (Арктический) Федеральный университет им. М.В. Ломоносова, Архангельск, Россия

^cСеверо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

^dСеверо-Западный научный центр гигиены и общественного здоровья Федеральной службы по защите прав потребителей и благополучию человека, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: mitia.kotsur@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.11.2023 г.

После доработки 20.03.2024 г.

Принята к публикации 05.04.2024 г.

Представлены результаты воздействия 2,2',5,5'-тетрахлорбифенила (ПХБ 52) на организм пресноводных рыб *Danio rerio* (Hamilton, 1822) в период, предшествующий их нересту. В ходе эксперимента установлено, что воздействие ПХБ 52 и на самцов, и на самок приводит к повышенной гибели потомства на ранних стадиях развития. Она заметно преобладала в группах потомства, у которых вредному воздействию подвергались только родители—самцы. Существенными оказались и смещения соотношения полов в группах среди выжившего потомства с преобладанием самок, по сравнению с контролем. Этот эффект был более выраженным в группах потомства, у которых были экспонированы только родители—самки. После измерения концентраций ПХБ 52 у родительских особей методом газовой хромато-масс-спектрометрии было установлено, что содержание ПХБ 52 у самок почти в 2 раза превышало таковое у самцов. Сделано заключение, что снижение жизнеспособности и дисбаланс соотношения самцов полов в потомстве имеют выраженную половую зависимость при воздействии ПХБ 52 на организм родительских особей.

Ключевые слова: ПХБ, 2,2',5,5'-тетрахлорбифенил, *Danio rerio*, данио рерио, выживаемость, потомство, соотношение полов, репродуктивная система, газовая хромато-масс-спектрометрия

DOI: 10.31857/S0320965224060153, **EDN:** WWTRST

ВВЕДЕНИЕ

Полихлорированные бифенилы – группа ароматических СОЗ, молекулы которых представляют собой два соединенных друг с другом бензольных кольца. Атомы водорода у бензольных колец могут замещаться от 1 до 10 атомами хлора в пара-, орто- и/или метаположении.¹ Теоретически группа

соединений ПХБ насчитывает 209 соединений, различающихся между собой положением и количеством атомов хлора (Mills et al., 2007).

ПХБ в прошлом активно применяли в основном как компонент масел диэлектрической жидкости для термоизоляции трансформаторной и конденсаторной электротехники. Также их использовали в строительных материалах (например, красках, герметиках и т.п.) благодаря высокой огнестойкости и теплопроводности, позволяющей отводить нагревание (Erickson, Kaley, 2011). ПХБ производили в 12 странах мира примерно с 1930-х вплоть до 1980-х годов, когда производство ПХБ было запрещено в связи с обнаруженными опасными токсическими свойствами. Однако согласно информации, полученной в ходе

¹ IARC. Polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls. 2016 // IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France. V. 107. P. 509. URL: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Polychlorinated-Biphenyls-And-Polybrominated-Biphenyls-2015>.

Сокращения: ПХБ – полихлорированные бифенилы, ПХБ 52 – 2,2',5,5'-тетрахлорбифенил, СОЗ – стойкие органические загрязнители.

одного из совещаний консультативного комитета сети по ликвидации ПХБ (PCB Elimination Network) на конец 2015 г., производство ПХБ все еще продолжалось в Северной Корее.² Вместе с прекращением их производства предприняты меры по утилизации оставшейся электротехники и прочих материалов, содержащих ПХБ. ПХБ были включены в глобальную стокгольмскую конвенцию о СОЗ, вступившую в силу в 2004 г. Несмотря на предпринятые меры по утилизации их остатков, в течение нескольких десятилетий происходила массовая и регулярная контаминация природных экосистем.³ ПХБ обладают высокой устойчивостью в окружающей среде и длительным периодом естественного разложения (Wolff et al., 2000; Ritter et al., 2011). Это предопределяет их способность накапливаться в липидах живых организмов (Moser, McLachlan, 2001) и такое накопление лежит в основе феноменов биоаккумуляции и биомагнификации при перемещении по пищевой цепи. В ней происходит многократное увеличение концентрации ПХБ в организмах от самых малых гидробионтов вплоть до человека, что представляет опасность для здоровья организмов даже при низких дозах контаминации (Broding et al., 2008).

Эта группа СОЗ оказывает системное многофункциональное токсическое действие, в частности, на репродуктивную (Bonde et al., 2008), эндокринную (Grandjean et al., 2012) и иммунную системы (Loomis et al., 1997). Кроме того, Международное Агентство по изучению рака (IARC) классифицирует ПХБ как доказанный канцероген для человека,⁴ и выявлено вредное влияние ПХБ на кожу человека.⁵ Также имеются доказательства генотоксичности, мутагенности и изменения экспрессии генов от воздействия ПХБ на организм (Ludewig, Robertson, 2012), что

² UNEP. 2016. Consolidated assessment of efforts made toward the elimination of polychlorinated biphenyls // Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. Geneva, Switzerland. P. 50. URL: <https://chm.pops.int/Implementation/IndustrialPOPs/PCBs/Meetings/7thmeetingPENAdvisoryCommittee/tabid/5405/Default.aspx>

³ UNEP. 2015. Preliminary assessment of efforts made toward the elimination of polychlorinated biphenyls // Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. Geneva, Switzerland. P. 40. URL: <https://chm.pops.int/Implementation/PCBs/PEN/6thmeetingPENAdvisoryCommittee/tabid/4779/Default.aspx>

⁴ IARC. Polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls. 2016. // IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France. V. 107. P. 509. URL: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Polychlorinated-Biphenyls-And-Polybrominated-Biphenyls-2015>.

⁵ ATSDR. Polychlorinated Biphenyls (PCBs) Toxicity. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, USA, May 24, 2023. URL: <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/polychlorinated-biphenyls/cover-page.html>.

предполагает возможность передачи токсических эффектов в последующие поколения.⁶

Для экспериментального изучения подобных эффектов наиболее целесообразным считается использование модельных организмов, в частности, аквариумных рыб *Danio rerio* (Hamilton, 1822), обладающих короткими сроками достижения половой зрелости и генерации потомства в интервале 2–6 мес.⁷ У этой модели проведено полное секвенирование генома, который имеет ортологи генов, схожих с генами в геноме человека. Поэтому этих рыб часто применяют в биомедицинских исследованиях благодаря схожим генам, функции которых участвуют в онтогенезе, болезнях и поведении человека (Harper, Lawrence, 2011).

Для проводимого нами эксперимента выбран конгенер ПХБ 52, поскольку это один из шести наиболее распространенных в окружающей среде конгенеров ПХБ. Эти конгенеры ПХБ по рекомендациям Стокгольмской конвенции ООН должны измеряться в продуктах питания и биологических жидкостях человека (например, в моче и цельной крови).⁸ Кроме того, конгенер ПХБ 52 является одним из мировых индикаторов всемирной организации здравоохранения (Liu et al., 2016).

Данный эксперимент направлен на исследование воздействия ПХБ на производителей рыб *Danio rerio* в преднерестовый период, которое вызывает снижение жизнеспособности в целом и возможные видимые нарушения онтогенеза у потомства в возрасте вплоть до 4 мес. Исследования воздействия ПХБ на репродуктивную систему самцов *Danio rerio* малочисленны, почти единичны, не говоря уже о результатах негативного воздействия на развитие потомства, спровоцированное воздействием ПХБ на самцов *Danio rerio*. Кроме того, негативные эффекты развития потомства *Danio rerio*, возникшие после воздействия ПХБ на их родительские особи, в целом изучены недостаточно (Коцури и др., 2023).

Цель работы – оценить выживаемость, нарушения онтогенеза и соотношение полов в потомствах отдельно экспонированных производителей (и

⁶ AMAP Assessment 2021: Human Health in the Arctic. 2021 // Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP). Tromsø, Norway. xii + 254 pp. URL: <https://www.amap.no/documents/download/6889/inline>.

⁷ CCAC guidelines: Zebrafish and other small, warm-water laboratory fish. 2020 // Canadian Council on Animal Care (CCAC). Ottawa, Canada. iv + 104 pp. URL: https://ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/CCAC_Guidelines-Zebrafish_and_other_small_warm-water_laboratory_fish.pdf.

⁸ IARC. Polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls. 2016 // IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France. V. 107. P. 509. URL: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Polychlorinated-Biphenyls-And-Polybrominated-Biphenyls-2015>.

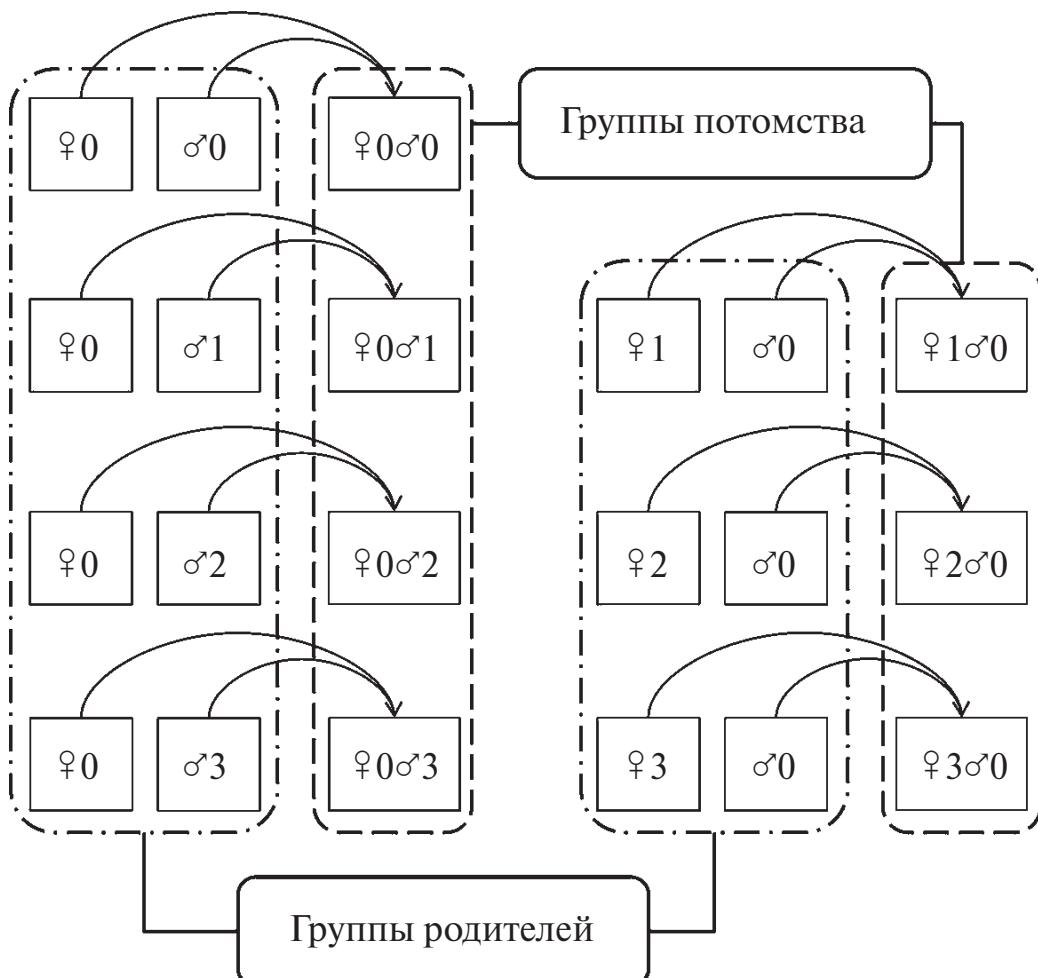


Рис. 1. Схема содержания рыб в лаборатории. В группах родителей ♂—самцы, ♀—самки. Цифра после символа – это доза в экспонировании: 0—не экспонированы, 1 — 25 мкг/особь, 2 — 45 мкг/особь, 3 — 90 мкг/особь. Группы потомства обозначены в зависимости от групп родителей.

самцов, и самок) *Danio rerio* 2,2',5,5'-тетрахлорхлорбифенилом (ПХБ 52) в преднерестовой период.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Во время эксперимента использовали вуалевых *Danio rerio*, очень схожих по внешнему виду с генетическим штаммом дикого типа AB, но с более крупными плавниками и хвостами, чем у дикого типа AB. Приобретено 70 самок и 70 самцов в возрасте 2.5 мес. с момента оплодотворения. Рыб помещали в 14 аквариумах объемом по 20 л без приточной системы, в каждом из них содержали либо по 10 самцов, либо по 10 самок, тем самым изолируя друг от друга особей разных полов во избежание совместного кормления пищей, содержащей используемый конгенер ПХБ, в ходе эксперимента. Каждый аквариум с родительскими рыбами маркировали в зависимости от пола и дозой воздействия ПХБ 52 (схема дана на рис. 1). Также заранее подготавливали 7 аквариумов объемом по 20 л для нереста (рис. 1), в которые пересаживали

рыб после кормления пищей с различными концентрациями ПХБ 52. Контрольную группу потомства обозначали как ♀0♂0. Группы потомства, у которых были экспонированы родители-самки и неэкспонированы (“чистые”) родители-самцы, обозначали как ♀1♂0, ♀2♂0 и ♀3♂0 соответственно, а три группы потомства с неэкспонированными (“чистыми”) родителями-самками и экспонированными родителями-самцами обозначали как ♀0♂1, ♀0♂2 и ♀0♂3 соответственно.

Условия содержания. Среднесуточная температура воды была $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, водородный показатель pH 7.0 ± 0.5 , общая жесткость воды dGH: 3–15, световой режим в аквариумной камере состоял из двух периодов: 12 ч освещения, 12 ч темноты. До начала эксперимента рыб адаптировали к этим условиям в течение 30 сут. Аквариумную воду еженедельно тестировали с помощью индикаторных тестов качественной реакции “НИЛПА” (научно-исследовательская лаборатория профессиональной аквариумистики, производитель “Аква Меню”, Россия) на содержание нитратов,

нитритов, ионов аммония, pH и общую жесткость воды. Избыток ионов аммония удаляли с помощью реактива “НИЛПА Антиаммиак”, который добавляли из расчета по 5 мл на 40 л аквариумной воды.

Режим кормления. Использовали сухой корм Tetra Min granules (производитель “Tetra”, Германия), который давали рыбам дважды в сутки в первую неделю взращивания рыб в аквариумах, далее рыб кормили один раз в сутки из расчета 3–5% общей массы рыб, находящихся в аквариуме. По воскресеньям рыб не кормили.

После периода адаптации самцов и самок раздельно подвергали воздействию ПХБ 52 в соответствии с обозначением дозы (производитель – Dr. Ehrenstorfer, Германия, чистота стандартного порошка 99.4%, 10 мг). Перед воздействием ПХБ 52 растворяли в 500 мкл ацетона в ампуле с ПХБ 52, переносили в пробирку типа фалькон, заполненную 11 мл нагретого жира печени трески, и круговыми движениями перемешивали. Чтобы в корме ПХБ 52 был с дозой 90 мкг/особь, добавляли раствор жира с примесью ПХБ 52 в соотношении 1 мл жира к 1 г сухого корма. Для получения двух наименьших доз остатки полученной смеси жира с ПХБ 52 разбавляли жиром печени трески в отдельных пробирках в 2 и 3.6 раза (45 и 25 мкг/особь соответственно). Полученный жир в трех пробирках добавляли в сухой корм и тщательно размешивали стеклянной палочкой для равномерной адсорбции. Корм для контрольной группы состоял из кормовой смеси, которая содержала идентичные дозы ацетона и жира печени трески, но без дозы ПХБ. Опытных и контрольных рыб кормили смесью 3 раза в неделю в течение трех недель.

После завершения кормления рыб пищей с различным содержанием ПХБ 52 проводили их подготовку к нересту без какого-либо вредного воздействия на протяжении двух недель. За одни сутки до нереста рыб не кормили, и в вечернее время по три самца и три самки из каждого аквариума помещали в нерестовые аквариумы объемом 20 л с температурой воды $28 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, получая 7 групп по шесть рыб. В аквариумы с родительскими особями погружали отсадники с сеткой объемом 2.5 л, чтобы отделить производителей икры от других рыб при обратной пересадке из нерестовых аквариумов. На следующее утро после завершения нереста рыб перемещали обратно в свои аквариумы в отсеке с отсадниками. Потомства получали в каждой группе без повторностей. Отнерестившихся самцов и самок извлекали из отсадников и подвергали эвтаназии путем их быстрого замораживания в малых емкостях с водой при температуре -80°C для последующих измерений остаточных концентраций ПХБ 52 во всей массе тела. Таким образом, сохраняли по три

особи-производителя от каждой родительской группы.

После вылупления предличинок на 4–5-е сут после оплодотворения проводили сбор и подсчет погибшей икры. В возрасте 7–21 сут после оплодотворения мальков кормили инфузориями, выращенными в лабораторных условиях. В период постэмбрионального развития собирали и учитывали погибших мальков, количество которых ежедневно фиксировали отдельно для каждой подопытной группы. Икру и погибших личинок собирали с помощью пипетки Пастера. Также еженедельно снижали температуру воды на 1°C вплоть до 25°C . В возрасте 21–35 сут после оплодотворения молодь рыб кормили наутилиями *Artemia salina* (L., 1758) до 4 раз в сутки, затем в возрасте 35–60 сут – 2–3 раза в сутки. Спустя 60 сут с момента оплодотворения рыбы перешли на потребление сухого корма Tetra Min granules 2 раза в сутки, а затем на один раз. По достижению возраста 35–40 сут после оплодотворения рыб переводили из аквариумов на 20 л в аквариумы на 120 л с температурой воды $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. При этом подсчитывали количество молоди рыб для каждой родительской группы и полученные данные использовали для оценки показателей выживаемости рыб на ранней стадии жизни.

После перемещения рыб в аквариумы объемом 120 л визуально оценивали морфологические отклонения в их развитии, в частности, размер, форму и массу тела, черепно-лицевое строение, форму плавников, состояние глаз и жаберных крышечек. Рыб выращивали вплоть до 120 сут после оплодотворения, после чего подвергали эвтаназии (таким же образом, как и их родителей) и сохраняли. У сохраненных потомственных рыб определяли пол для выявления соотношения полов в каждой экспериментальной группе. Пол определяли по окраске и форме тела. Самцы имеют, как правило, стреловидную форму и желтоватый оттенок, у самок окраска ближе к серебристой с ярко-синими полосами и более округлая форма тела, поскольку гонады самок значительно больше гонад самцов (Spence et al., 2008; Kossack, Draper, 2019). После подсчета всех потомственных рыб соотношение полов в группах рассчитывали как количество самок к количеству самцов.

Из каждой экспериментальной группы потомства сохраняли по 10 экз. для заморозки при температуре -80°C и последующего измерения концентрации ПХБ 52 в массе тела. Сохраненные в низкотемпературной среде образцы родительских особей–производителей и их потомков из контрольной и экспонированных групп подвергали лиофилизации с помощью лиофильной сушилки Labconco FreeZone 2.5L (США) при температуре -50°C с определением остаточной влажности в массе тела. Эти образцы затем гомогенизировали

до получения однородной массы в керамической ступке с помощью пестика и помещали в пробирки объемом 15 мл. Затем гомогенизированную массу подвергали экстракции, очистке серной кислотой в стеклянных колонках. Полученный элюат концентрировали до необходимого объема для последующего химического анализа. Содержания ПХБ 52 в сухой массе рыб определяли методом газовой хромато-масс-спектрометрии на приборе Agilent 7890A, оснащенном тройной квадрупольной системой MS/MS Agilent серии 7000 (США). Опыты проводили в Центре коллективного пользования научным оборудованием “Арктика” Северного (Арктического) федерального университета им. М. В. Ломоносова, с применением внутреннего стандарта PCB#101₁₃C¹² и последующими расчетами результатов по методике, подробно описанной в работе Д. Е. Лахманова (Lakhmanov et al., 2020).

Для оценки показателей выживаемости использовали следующие данные: количество погибшей икры, взятой на 5-е сут после оплодотворения; количество погибших предличинок и мальков в каждые сутки за период с 5-х сут после оплодотворения; количество молоди в каждой группе при переводе их из аквариумов на 20 л в аквариумы на 120 л. На основании этих данных вычисляли общее количество вымеченной икры на каждую группу и количество выживших особей в каждые сутки за период с 6-х по 30-е сут после оплодотворения. Таким образом, получили выборки из 25 точек на каждую из семи групп. Эти выборки представляли собой кривые, где количество выживших особей снижалось каждые сутки. Полученные значения пересчитали в проценты. Далее проводили регрессионный анализ, где выборки кривых проверяли на статистическую значимость и адекватность с помощью ранее описанной методики (Воскобойников, 2005), в программном обеспечении MS Excel 2016 (корпорация Microsoft Corporation, Редмонд, США). Для этого значения выборок логарифмировали для приведения их к линейному типу, чтобы использовать функцию “регрессия”. Затем проводили статистическую оценку по F-критерию Фишера, сравнивая ее с функцией одностороннего F-распределения вероятностей на уровне значимости 0.05. Все проверяемые уравнения регрессии были статистически значимыми.

Далее определяли различия между выборками контрольной группы и группами воздействия ПХБ 52 с помощью программного обеспечения IBM SPSS Statistics v. 23.0 (Корпорация IBM, Армонк, США). Для этого выборки по каждой кривой проверяли на нормальность распределения и определили средние значения у каждой группы с доверительным интервалом 95%. Для сравнения статистических различий контрольной с экспериментальными выборками использовался

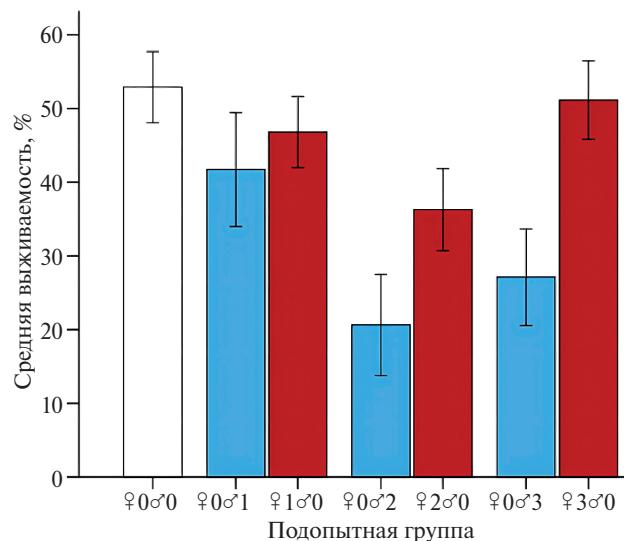


Рис. 2. Динамика выживаемости мальков *Danio rerio* в течение 30 сут после оплодотворения в группах, где подвергались воздействию ПХБ только родительские самцы ($\varnothing 0\circ 1$, $\varnothing 0\circ 2$ и $\varnothing 0\circ 3$) или только родительские самки ($\varnothing 1\circ 0$, $\varnothing 2\circ 0$ и $\varnothing 3\circ 0$). Даны средние значения \pm стандартное отклонение. Количество вымеченной икры в группе: $\varnothing 0\circ 0$ – 932, $\varnothing 0\circ 1$ – 242, $\varnothing 0\circ 2$ – 334, $\varnothing 0\circ 3$ – 319, $\varnothing 1\circ 0$ – 158, $\varnothing 2\circ 0$ – 155, $\varnothing 3\circ 0$ – 368. Различия между контрольной и экспериментальными выборками, определенные с помощью двухвыборочного критерия Вилкоксона, статистически значимы ($p = 0$ для всех пар, кроме пары $\varnothing 0\circ 0$ – $\varnothing 3\circ 0$: $p = 0.014$).

двувыборочный непараметрический критерий Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выживаемость потомства. В процессе воздействия ПХБ 52 на организм производителей в преднерестовый период и после его завершения онтогенез рыб проходил без заметных нарушений. После нереста во всех экспонированных группах начальные процессы эмбрионального развития протекали примерно одинаково вне зависимости от экспозиционной дозы.

Предличинки вылуплялись из оболочки икры на 4–5-е сут после оплодотворения и уже с наступлением постэмбрионального цикла развития в жизнеспособности потомства наблюдали значительные различия. В потомстве экспонированных групп зарегистрировано снижение выживаемости мальков по сравнению с контрольной группой (рис. 2). На рис. 2 показано, что доза-эффективная зависимость снижения выживаемости потомства и интенсивности воздействия ПХБ 52 на организм родительских особей имеет нелинейный характер. При этом частота гибели потомства у экспонированных самцов существенно превышает таковую в потомстве экспонированных к тем же дозам ПХБ родителей-самок.

Соотношение полов в потомстве. Для определения соотношения полов в потомстве у каждой

Таблица 1. Характеристика групп потомства *Danio rerio* в возрасте 120 сут с момента оплодотворения и содержание ПХБ 52 в организме родительских особей

Группа потомства	<i>n</i>	Пол родителей	ПХБ 52	♀♀ : ♂♂
♀0♂0	398	♀0	<0.1	
		♂0	<0.1	0.9 : 1
♀0♂1	61	♀0	0.13	
		♂1	37.03	0.8 : 1
♀0♂2	50	♀0	<0.1	
		♂2	70.23	5.3 : 1
♀0♂3	63	♀0	4.41	
		♂3	193.52	2 : 1
♀1♂0	63	♀1	76.36	
		♂0	<0.1	13 : 1
♀2♂0	45	♀2	149.79	
		♂0	1.27	14 : 1
♀3♂0	127	♀3	506.03	
		♂0	2.6	8.8 : 1

Примечание. ♀♀ : ♂♂ — соотношение полов; *n* — общая численность особей в группе. Цифра после символа обозначает дозу, применяемую в экспонировании: 0—не экспонированы, 1—25 мкг/особь, 2—45 мкг/особь, 3—90 мкг/особь. ПХБ 52 — содержание ПХБ 52 в образцах рыб на сырую массу, нг/г.

особи из экспериментальных групп исследовали половую принадлежность и оценивали нарушения морфологического развития. Структурные аномалии были обнаружены лишь в единичных случаях, включая контрольную группу. Для некоторых рыб визуальное определение пола оказалось трудно осуществимым из-за отсутствия явного полового диморфизма у особей небольших размеров тела (стандартная длина <20 мм). Дифференциация гонад у *Danio rerio* происходит, как правило, значительно раньше, чем внешние проявления полового диморфизма в период полового созревания⁹ (Wilson et al., 2014; Kossack, Draper, 2019). Рыбы, у которых визуальное определение половой принадлежности оказалось затруднительным, были немногочисленны, поэтому их исключили из расчета соотношения полов. В экспонированных группах соотношение полов смешалось в сторону самок по сравнению с контролем (табл. 1). Наиболее заметное уменьшение доли самцов наблюдали в группах, где экспозиции к ПХБ 52 подверглись родительские особи самок (в среднем 11.9 : 1 соответственно самки к самцам), тогда как у экспонированных родительских особей самцов среднее соотношение полов самок к самцам в потомстве было 2.7 : 1.

⁹ CCAC guidelines: Zebrafish and other small, warm-water laboratory fish. 2020 // Canadian Council on Animal Care (CCAC). Ottawa, Canada. iv + 104 pp. URL: https://ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Zebrafish_and_other_small_warm-water_laboratory_fish.pdf.

Анализ содержания ПХБ 52 у родителей и потомства. Оценка половых различий в процессах аккумуляции и биотрансформации ПХБ 52, поступившего с кормом в организм рыб, проводили в каждой сохраненной группе родительских особей по результатам определения остаточного содержания этого экотоксиканта в сырой массе тела. Полученные данные (табл. 1) показали, что содержание ПХБ 52 в образцах рыб самцов почти в 2 раза ниже, чем в образцах рыб самок при идентичных расчетных дозах.

В отдельных случаях среди рыб из групп неэкспонированных к ПХБ родительских особей обоих полов отмечено его содержание несколько выше нижнего предела обнаружения. Наиболее вероятной причиной выявления следов ПХБ среди этих групп может быть поедание икры или контакт с экскрементами экспонированных особей в период совместного краткосрочного пребывания в нерестовых аквариумах. Однако эти следовые концентрации достаточно близки к фоновой и, очевидно, не могут оказать существенного влияния на выводы, сделанные по результатам эксперимента. Следует отметить, что ни в одном из образцов проб у потомства экспериментальных групп *Danio rerio* содержание ПХБ 52 выше пределов обнаружения не установлено.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты исследования воздействия ПХБ 52 на родительские особи *Danio rerio* в преднерестовый период показали, что у экспонированных особей обоих полов значительно снижалась выживаемость потомства, причем частота гибели потомков не зависела линейно от полученной дозы. Если при воздействии низкой и средней доз ПХБ 52 на родительских особей выживаемость потомства снижалась, то при высокой дозе в обоих случаях она несколько увеличивалась, оставаясь достоверно ниже, чем в контроле. При этом результаты определения остаточных концентраций ПХБ 52 после нереста в организме у родительских особей экспонированных рыб свидетельствуют о тесной корреляции, близкой к линейной, с расчетными дозами внешнего воздействия (по *r*-Спирмену *r* = 0.899, при *p* = 0.00). Следует отметить, что выживаемость потомства от экспонированных родителей-самцов по сравнению с аналогичным показателем от экспонированных родителей-самок была значительно ниже, что, возможно, связано с более высокой восприимчивостью самцов к репродуктивной токсичности ПХБ 52. Однако такое предположение нуждается в дополнительных исследованиях, поскольку воздействие ПХБ на репродуктивную систему самцов *Danio rerio* и его последствий для будущих поколений почти не изучено (Коцур и др., 2023).

Экспонирование родительских особей *Danio rerio* к ПХБ 52, как самок, так и самцов, приводит к феминизации потомства со значительным преобладанием в нем самок. При этом наиболее выраженное нарушение соотношения полов наблюдается у потомков экспонированных самок. Аналогичные данные по нарушению соотношения полов в потомстве *Danio rerio* были получены после воздействия 17 α -этинилэстрадиола (Xu et al., 2008) и 17 β -эстрадиола (Brion et al., 2004) на их родителей. Известно, что многие антропогенные химические загрязнители и, в частности, ПХБ обладают свойствами эндокринных токсикантов, оказывая гормоноподобное действие, а также нарушая секреторные функции желез внутренней секреции (Яглова, Яглов, 2012).

Судя по полученным нами результатам, токсическое действие ПХБ 52 характеризуется эстрогеноподобным эффектом. Подобный эффект был подтвержден в исследовании с помощью биосистемы ER-CALUX эстрогенной и антиэстрогенной активности конгенеров ПХБ, обнаруженных в сыворотке крови мужчин, которые проживали в загрязненных районах (производство ПХБ), а также в районах восточной Словакии. Результаты этого анализа показали, что низкохлорированные ПХБ (ПХБ 28, 52, 66, 74, 99, 105) проявляют эстрогенную активность, в то время, как высокохлорированные ПХБ (ПХБ 138, 156, 170, 180, 187, 194, 199, 203) – антиэстрогенную (Plísková et al., 2005).

По результатам измерения остаточного содержания ПХБ 52 в организме после нереста у экспонированных рыб методом газовой хромато-масс-спектрометрии было обнаружено, что средние концентрации этого экотоксиканта при одинаковых дозах воздействия у самок были почти в 2 раза выше, чем у самцов. Наиболее вероятным фактором зависимой от пола аккумуляции жирорастворимых эстрогеноподобных экотоксикантов могут быть различия в накоплении липидов в теле и его общего содержания у самок *Danio rerio*, существенно превышающие таковые у самцов (Sun et al., 2020). Показано (Sun et al., 2020), что воздействие эстрогеноподобных экотоксикантов (бисфенола А и 17 β -эстрадиола) на организм *Danio rerio* в течение 6 нед. вызывает выраженные признаки метаболической феминизации у экспонированных самцов. Прежде всего, это выражалось, в виде половой трансформации их молок, что, возможно, является основным фактором риска нарушений репродуктивных функций у самцов и низкой выживаемости их потомства, обнаруженных в нашем исследовании при воздействии ПХБ 52. То есть, при воздействии эстрогеноподобных экотоксикантов в процессе дифференцирования гонад у молоди рыб стимулируется развитие яичника, а также возникают деградация и некроз сперматогенного эпителия, что в итоге приводит к увеличению доли самок в популяции.

В то же время, возможно, ПХБ 52 у обработанных самцов снижает активность сперматозоидов и/или повреждает их, тем самым уменьшая шансы оплодотворения икры в целом. Наше предположение о снижении оплодотворяемости икры самцами после воздействия ПХБ 52 сделано в связи с данными эксперимента, в котором доказано воздействие арохлора 1254 на самцов *Danio rerio*, приведшее к снижению количества сперматозоидов, их активности и продолжительности жизни (Njiwa et al., 2004). Также этот вывод подтверждается тем, что наибольшая доля погибшего потомства обработанных самцов как раз приходится на эмбриональную стадию по сравнению с контрольной группой. Выраженная феминизация потомства также была обнаружена у коренных жителей Чукотского АО в результате потребления традиционной пищи, сильно загрязненной ПХБ (соотношение мальчиков и девочек среди новорожденных было 100/250 при среднем показателе в мире 106/100). При этом вероятность рождения девочек тесно коррелировала с содержанием в крови у рожениц низкохлорированных ПХБ 28, 32, 52, 101, 118.¹⁰

Несмотря на совпадение полученных нами результатов экспериментальных исследований при сравнении с воздействием других эндокринных токсикантов, распространенных в водных экосистемах и загрязняющих пищевые цепи, дальнейшее прогнозирование и эффективное предотвращение опасных экологических последствий этих антропогенных загрязнений невозможно без дополнительных исследований. В первую очередь эти исследования должны предусматривать изучение механизмов репродуктивных нарушений у мужских и женских особей на клеточном и на молекулярном уровнях, которые почти не изучены (He et al., 2021; Коцур и др., 2023).

Особенно это необходимо для прогноза рисков воздействия экотоксикантов при разработке мер по повышению эффективности рыбохозяйственной деятельности, в частности, там, где существует потребность в управлении продуктивностью популяций рыб в изолированных водных объектах. Например, в Рыбинском водохранилище, в котором промысловым объектом является лещ *Abramis brama* L., накапливающий с возрастом в липидах различные конгнегеры ПХБ, что подтверждено соответствующими исследованиями (German et al., 2023). Комплексный подход должен, по нашему мнению, включать в себя следующие исследования: 1) изучение структуры гонад при воздействии ПХБ с применением гистологических и иммунохимических методов для оценки состояния гонад (Orn et al., 1998;

¹⁰ AMAP. Persistent toxic substances, food security and indigenous peoples of the Russian North. Final report. 2004. Oslo, Norway, 192 pp. ISBN 82-7971-036-1. URL: <https://www.amap.no/documents/doc/persistent-toxicsubstances-food-security-and-indigenous-peoples-of-the-russian-north.-final-report/795>.

Olsson et al., 1999; Daouk et al., 2011; Kraugerud et al., 2012; Quintaneiro et al., 2019); 2) химические анализы по измерению уровня вителлогенин-подобных белков, ответственных за развитие ооцитов у самок (Quintaneiro et al., 2019); 3) исследование изменения экспрессии генов гонад у самок и самцов при воздействии ПХБ (Nourizadeh-Lillabadi et al., 2009; Lyche et al., 2010), а также изменения экспрессии генов у последующих поколений (Alfonso et al., 2019); 4) изучение генотоксического и мутагенного действия ПХБ (He et al., 2021), которые потенциально могут вызывать хромосомные aberrации или геномные мутации; 5) изучение выживаемости последующих поколений, онтогенеза с ранней стадии жизни до половозрелого возраста, соотношения полов, ослабления/усиления полового диморфизма (Berg et al., 2011; Kraugerud et al., 2012); 6) систематические обзоры исследований *in vitro* по выявлению связывания ПХБ с рецепторами эстрогена (Plísková et al., 2005) и других исследований *in vitro* для оценки воздействия ПХБ на прочие рецепторы, отвечающие за функционирование репродуктивной системы обоих полов. В вышеперечисленных направлениях проводили определенные исследования, однако их явно недостаточно для прогнозирования рисков из-за применения разных методов экспонирования модельных видов и разных смесей конгенеров ПХБ без учета вызываемых ими эндокринных нарушений (Plísková et al., 2005).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Снижение жизнеспособности и дисбаланс соотношения полов в потомстве, существенно понижающих биотический потенциал в популяции, имеет выраженную половую зависимость при воздействии ПХБ 52 на организм родительских особей модельного вида рыб *Danio rerio*. Необходимы дополнительные исследования для комплексного изучения репродуктивных нарушений у обоих полов по отдельности и эмбрионального развития потомства при воздействии экотоксикантов, возникших в объектах окружающей среды в результате антропогенной деятельности.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны сотрудникам Центра коллективного пользования научным оборудованием “Арктика” Северного (Арктического) федерального университета им. М.В. Ломоносова Д.С. Косякову и А.Ю. Кожевникову за предоставленную возможность и Д.Е. Лахманову за помощь в выполнении химического анализа подготовленных проб на содержание ПХБ с использованием лабораторного оборудования газовой хромато-масс-спектрометрии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Проведенный эксперимент выполнен при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-15-20076).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Воскобойников Ю.Е.* 2005. Эконометрика в Excel: учебное пособие. Новосибирск: Новосиб. гос. арх.-стр. ун-т.
- Коцур Д.А., Сорокина Т.Ю., Аксенов А.С., Чашин В.П.* 2023. *Danio rerio* как модель изучения репродуктивных рисков, связанных с воздействием полихлорированных бифенилов на людей (систематический обзор) // Экология человека. Т. 30. № 4. С. 245.
<https://doi.org/10.17816/humeco321190>
- Яглова Н.В., Яглов В.В.* 2012. Эндокринные дизрапторы – новое направление исследований в эндокринологии // Вестн. Российской академии медицинских наук. Т. 67. № 3. С. 56.
<https://doi.org/10.15690/vramn.v67i3.186>
- Alfonso S., Blanc M., Joassard L. et al.* 2019. Examining multi- and transgenerational behavioral and molecular alterations resulting from parental exposure to an environmental PCB and PBDE mixture // Aquat. Toxicol. V. 208. P. 29.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.12.021>
- Berg V., Lyche J.L., Karlsson C. et al.* 2011. Accumulation and effects of natural mixtures of persistent organic pollutants (POP) in zebrafish after two generations of exposure // J. Toxicol. Environ. Health. Part A. V. 74. № 7–9. P. 407.
<https://doi.org/10.1080/15287394.2011.550455>
- Bonde J.P., Toft G., Rylander L. et al.* 2008. Fertility and markers of male reproductive function in Inuit and European populations spanning large contrasts in blood levels of persistent organochlorines // Environ. Health Perspect. V. 116. P. 269.
<https://doi.org/10.1289/ehp.10700>
- Brion F., Tyler C.R., Palazzi X. et al.* 2004. Impacts of 17beta-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-, larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*) // Aquat. Toxicol. V. 68. P. 193.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.01.022>
- Broding H.C., Schettgen T., Hillert A. et al.* 2008. Subjective complaints in persons under chronic low-dose exposure to lower polychlorinated biphenyls (PCBs) // Int. J. Hyg. Environ. Health. V. 211. № 5–6. P. 648.
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2008.02.001>
- Daouk T., Larcher T., Rouspard F. et al.* 2011. Long-term food-exposure of zebrafish to PCB mixtures mimicking some environmental situations induces ovary pathology and impairs reproduction ability // Aquat. Toxicol. V. 105. № 3–4. P. 270.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.021>
- Erickson M.D., Kaley II R.G.* 2011. Applications of polychlorinated biphenyls // Environ. Sci. Pollut. Res. V. 18. № 2. P. 135.
<https://doi.org/10.1007/s11356-010-0392-1>
- German A.V., Mamontov A.A., Mamontova E.A.* 2023. Polychlorinated biphenyls in the bream *Abramis brama* from the Volga Reach of the Rybinsk Reservoir: effect of fish age and assessment of risk to human health // Inland Water Biol. V. 16. P. 377.

- https://doi.org/10.1134/S1995082923020074
- Grandjean P., Grønlund C., Kjaer I.M. et al.* 2012. Reproductive hormone profile and pubertal development in 14-year-old boys prenatally exposed to polychlorinated biphenyls // *Reprod. Toxicol.* V. 34. P. 498.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.07.005>
- Harper C., Lawrence C.* 2011. *The Laboratory Zebrafish* // CRC Press. ISBN: 9780429150159.
<https://doi.org/10.1201/b13588>
- He Q.L., Zhang L., Liu S.Z.* 2021. Effects of polychlorinated biphenyls on animal reproductive systems and epigenetic modifications // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* V. 107. № 3. P. 398.
<https://doi.org/10.1007/s00128-021-03285-6>
- Kossack M.E., Draper B.W.* 2019. Genetic regulation of sex determination and maintenance in zebrafish (*Danio rerio*) // *Curr. Top. Dev. Biol.* V. 134. P. 119.
<https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.02.004>
- Kraugerud M., Doughty R.W., Lyche J.L. et al.* 2012. Natural mixtures of persistent organic pollutants (POPs) suppress ovarian follicle development, liver vitellogenin immunostaining and hepatocyte proliferation in female zebrafish (*Danio rerio*) // *Aquat. Toxicol.* V. 116. P. 16.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.02.031>
- Lakhmanov D., Varakina Yu., Aksenov A. et al.* 2020. Persistent organic pollutants (POPs) in fish consumed by the indigenous peoples from Nenets Autonomous Okrug // *Environments.* V. 7. № 1. e3.
<https://doi.org/10.3390/environments7010003>
- Liu Y., Wang X.N., Wang J. et al.* 2016. Graphene oxide attenuates the cytotoxicity and mutagenicity of PCB 52 via activation of genuine autophagy // *Environ. Sci. Technol.* V. 50. № 6. P. 3154.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03895>
- Loomis D., Browning S.R., Schenck A.P. et al.* 1997. Cancer mortality among electric utility workers exposed to polychlorinated biphenyls // *Occup. Environ. Med.* V. 54. P. 720.
<http://dx.doi.org/10.1136/oem.54.10.720>
- Ludewig G., Robertson L.W.* 2013. Polychlorinated biphenyls (PCBs) as initiating agents in hepatocellular carcinoma // *Cancer Lett.* V. 334. № 1. P. 46.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.041>
- Lyche J.L., Nourizadeh-Lillabadi R., Almaas C. et al.* 2010. Natural mixtures of persistent organic pollutants (pop) increase weight gain, advance puberty, and induce changes in gene expression associated with steroid hormones and obesity in female zebrafish // *J. Toxicol. Environ. Health. Part A.* V. 73. № 15. P. 1032.
<https://doi.org/10.1080/15287394.2010.481618>
- Mills S.A. 3rd, Thal D.I., Barney J.* 2007. A summary of the 209 PCB congener nomenclature // *Chemosphere.* V. 68. № 9. P. 1603.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.03.052>
- Moser G.A., McLachlan M.S.* 2001. The influence of dietary concentration on the absorption and excretion of persistent lipophilic organic pollutants in the human intestinal tract // *Chemosphere.* V. 45. № 2. P. 201.
[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00551-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00551-8)
- Njiwa J.R., Müller P., Klein R.* 2004. Binary mixture of DDT and Arochlor1254: effects on sperm release by *Danio rerio* // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* V. 58. № 2. P. 211.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.11.003>
- Nourizadeh-Lillabadi R., Lyche J.L., Almaas C. et al.* 2009. Transcriptional Regulation in Liver and Testis Associated with Developmental and Reproductive Effects in Male Zebrafish Exposed to Natural Mixtures of Persistent Organic Pollutants (POP) // *J. Toxicol. Environ. Health. Part A.* V. 72. № 3–4. P. 112.
<https://doi.org/10.1080/15287390802537255>
- Olsson P.E., Westerlund L., Teh S.J. et al.* 1999. Effects of maternal exposure to estrogen and PCB on different life stages of zebrafish (*Danio rerio*) // *Ambio.* V. 28. № 1. P. 100.
- Orn S., Andersson P.L., Forlin L. et al.* 1998. The impact on reproduction of an orally administered mixture of selected PCBs in zebrafish (*Danio rerio*) // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* V. 35. № 1. P. 52.
<https://doi.org/10.1007/s002449900348>
- Plísková M., Vondráček J., Canton R.F. et al.* 2005. Impact of polychlorinated biphenyls contamination on estrogenic activity in human male serum // *Environ. Health Perspect.* V. 113. № 10. P. 1277.
<https://doi.org/10.1289/ehp.7745>
- Quintaneiro C., Soares A.M.V.M., Costa D. et al.* 2019. Effects of PCB-77 in adult zebrafish after exposure during early life stages // *J. Environ. Sci. Health. Part A: Environ. Sci. Eng. Toxic Hazard. Subst. Control.* V. 54. № 5. P. 478.
<https://doi.org/10.1080/10934529.2019.1568793>
- Ritter R., Scheringer M., MacLeod M. et al.* 2011. Intrinsic human elimination half-lives of polychlorinated biphenyls derived from the temporal evolution of cross-sectional biomonitoring data from the United Kingdom // *Environ. Health Perspect.* V. 119. P. 225.
<https://doi.org/10.1289/ehp.1002211>
- Spence R., Gerlach G., Lawrence C., Smith C.* 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio* // *Biol. Rev.* V. 83. P. 13.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>
- Sun S.-X., Wu J.-L., Lv H.-B. et al.* 2020. Environmental estrogen exposure converts lipid metabolism in male fish to a female pattern mediated by AMPK and mTOR signaling pathways // *J. Hazard. Mater.* V. 394. Article № 122537.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122537>
- Wilson C.A., High S.K., McCluskey B.M. et al.* 2014. Wild sex in zebrafish: Loss of the natural sex determinant in domesticated strains // *Genetics.* V. 198. № 3. P. 1291.
<https://doi.org/10.1534/genetics.114.169284>
- Wolff M.S., Zeleniuch-Jacquotte A., Dubin N., Toniolo P.* 2000. Risk of breast cancer and organo chlorine exposure // *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* V. 9. P. 271.
- Xu H., Yang J., Wang Y. et al.* 2008. Exposure to 17alpha-ethynodiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (*Danio rerio*) // *Aquat. Toxicol.* V. 88. № 1. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.01.020>

Decreased Viability and Changes in Sex Ratio in the Offspring of *Danio rerio* as a Result of Exposure to 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl (PCB 52) on Producers During the Prespawning Period

D. A. Kotsur^{1,*}, Yu. I. Varakina², T. Yu. Sorokina², A. S. Aksenov², A. P. Novoselov¹, V. P. Chashchin^{2, 3, 4}

¹*N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, Russia*

²*Northern (Arctic) Federal University Named After M. V. Lomonosov, Arkhangelsk, Russia*

³*North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia*

⁴*Northwestern Scientific Center for Hygiene and Public Health of the Federal Service for Consumer Rights Protection and Human Welfare, Saint-Petersburg, Russia*

*e-mail: mittia.kotsur@yandex.ru

The results of studies of the impact of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl (PCB 52) on the body of the freshwater fish *Danio rerio* (Hamilton, 1822) in the period preceding their spawning are presented. During this experiment, it is established that exposure to PCB 52 of both males and females leads to the increased mortality of offspring in the early stages of development. It is noticeably predominant in groups in which only male parents are exposed to harmful effects. Shifts in the sex ratio in groups among the surviving offspring with a predominance of females compared to the control also turn out to be significant. This effect is more pronounced in offspring groups in which only female parents were exposed. After measuring PCB 52 concentrations in parent animals using gas chromatography – mass spectrometry, it is found that the PCB 52 content in females is almost twice as high as in males. It is concluded that a decreased viability and an imbalance in the sex ratio in the offspring has a pronounced sex dependence when exposed to PCB 52 on the body of the animal parents.

Keywords: PCBs, 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl, *Danio rerio*, survival rate, sex ratio, reproductive system, gas chromatography mass spectrometry