

УДК 615.099; 615.917; 611.36; 579.222

Орто- и мета-монохлорированные бифенилы угнетают гуморальный иммунитет и оказывают токсическое воздействие на клетки печени мышей

Д. О. Егорова^{1*}, С. В. Гейн¹, Н. А. Королев¹, Н. П. Логинова²¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, 614990 Россия²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пермь, 614990 Россия

*E-mail: daryao@rambler.ru

Поступила в редакцию 16.12.2024

Принята к печати 13.05.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27596

РЕФЕРАТ Широкомасштабное загрязнение окружающей среды полихлорированными бифенилами ведет к серьезным нарушениям здоровья человека и животных. Основное внимание уделяется изучению негативных эффектов, вызванных проникновением в организм человека средне- и высокохлорированных бифенилов. Имеются единичные сведения о влиянии низкохлорированных бифенилов, содержащих 1–2 заместителя, на функции органов и систем млекопитающих. Известно, что в природных условиях полихлорбифенилы могут подвергаться бактериальной деструкции, продукты которой относятся к группе вторичных поллютантов и рассматриваются как опасные для природы агенты. Ввиду малой изученности влияния вышеупомянутых соединений на здоровье человека, вопрос о воздействии монозамещенных хлорбифенилов, а также продуктов их биотрансформации на иммунитет и состояние внутренних органов млекопитающих остается открытым. В представленной работе впервые показаны эффекты воздействия орто- и мета-замещенных монохлорированных бифенилов на функции клеток иммунной системы и морфофункциональное состояние печени млекопитающих *in vivo*. Установлено, что ПХБ 1 и ПХБ 2 угнетают гуморальный иммунитет и вызывают продуктивную воспалительную реакцию, распространенную белковую дистрофию с фокусами некроза в печени. Продукты аэробной бактериальной трансформации ПХБ 1 и ПХБ 2 не оказывают негативного влияния на иммунную систему млекопитающих, но обладают токсичностью в отношении гепатоцитов, хотя и в меньшей степени, чем исходные хлорбифенилы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА монохлорированные бифенилы, гуморальный иммунитет, гепатоциты, биодеструкция, лейкоциты.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПХБ – полихлорированные бифенилы; ПХБ 1 – орто-монохлорбифенил; ПХБ 2 – мета-монохлорбифенил; АОК – антителообразующие клетки; ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим анализом; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных проблем современности является воздействие на организм человека и животных полихлорированных бифенилов (ПХБ), а также их производных, образующихся в окружающей среде под действием природных факторов. Согласно Стокгольмской конвенции, ПХБ запрещены к производству и применению, однако они сохраняются

в объектах окружающей среды и несут прямую угрозу здоровью населения [1]. Группа ПХБ состоит из 209 соединений, отличающихся количеством заместителей и их положением в молекуле. Поступление ПХБ в организм человека происходит в результате их аккумуляции в пищевых цепях [2]. ПХБ вызывают нарушения в развитии плода животных, заболевания кожи и нервной системы, рас-

смаатриваются как одна из причин возникновения диабета, а также провоцируют развитие опухолевых заболеваний и генетических нарушений [3, 4]. На примере отдельных средне- и высокохлорированных конгенеров ПХБ, содержащих более трех заместителей в молекуле, а также коммерческих смесей, показано их негативное влияние на иммунитет [5–7]. Однако вопрос о значимости низкохлорированных бифенилов для здоровья животных и человека в настоящий момент остается открытым.

Основным направлением для предотвращения перемещения ПХБ по пищевым цепям является их биодеструкция в природных средах, обусловленная деятельностью ферментативных систем аэробных бактерий. При этом образуются гидроксированные производные хлорбифенилов и хлорбензойные кислоты, которые также могут вызывать негативные эффекты при поступлении в организм млекопитающих [8].

В данной работе впервые показаны эффекты *орто*- и *мета*-замещенных монохлорированных бифенилов и продуктов их бактериальной деструкции на показатели адаптивного иммунитета и морфофункциональное состояние печени мышей *in vivo*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали белых мышей породы Swiss, массой 18–23 г обоих полов. Животных содержали в условиях лабораторного вивария с 12-часовым циклом освещения, двухразовым питанием натуральным кормом в количестве, соответствующем суточным нормам, при неограниченном доступе к воде. Эксперименты были проведены в соответствии с рекомендациями и этическими нормами, указанными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей». Получено разрешение локального этического комитета «ИЭГМ УрО РАН» IRB00010009 (Пермь, Россия) (протокол № 29 от 08.10.2024 г.).

орто-Монохлорбифенил (ПХБ 1) и *мета*-монохлорбифенил (ПХБ 2) вводили мышам перорально, в кукурузном масле, последовательно, через день, в дозе 100 мг/кг. Выбор дозы основан на опубликованных данных [9]. Продукты биодеструкции ПХБ 1 и ПХБ 2 вводили мышам перорально в виде водного раствора, через день, в дозе, соответствующей 100 мг/кг исходного субстрата. Контрольным группам вводили кукурузное масло и минеральную среду культивирования, освобожденную от бактериальных клеток, каждая группа содержала 7–11 особей.

Продолжительность эксперимента составила 25 сут. Гуморальный иммунитет индуцировали на 19

день эксперимента введением эритроцитов барана (10^8 клеток в 200 мкл физиологического раствора) в брюшную полость мышей. Реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) индуцировали на 24 день эксперимента введением разрешающей дозы эритроцитов барана под кожу левой стопы и аналогичный объем 0.9% раствора NaCl вводили под кожу правой стопы. На 25 день животных выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом. Гуморальный иммунный ответ оценивали по количеству антителообразующих клеток методом локального гемолиза в геле агарозы по методу Эрне. Выраженность реакции ГЗТ оценивали, измеряя отек лапы по индексу массы, который рассчитывали по формуле: $(P_o - P_k)/P_k \times 100\%$, где P_o – показатели массы опытной конечности, P_k – показатели массы контрольной конечности.

Ткани печени фиксировали в 10 % нейтральном формалине на фосфатном буфере (pH 7.2), с дальнейшей заливкой в парафин Histomix. Гистологические препараты готовили стандартным методом. Для оценки общей морфологической картины срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Оценку и фотосъемку проводили на микроскопе Olympus (Япония) с программным пакетом Imeg pro+ (free version).

Продукты биодеструкции ПХБ 1 и ПХБ 2 получали в экспериментах с отмытыми клетками аэробного штамма *Rhodococcus* sp. FG1 (ВКМ Ас-3030) согласно [10]. Культивирование осуществляли в течение 24 ч. Количественный анализ хлорбифенилов и их гидроксипроизводных проводили в условиях ГХ-МС [10]. Содержание веществ в каждом исследуемом образце рассчитывали методом внутренней нормализации. Качественный анализ производили по базе NIST17. Наличие бензойной и хлорбензойных кислот определяли методом ВЭЖХ в культуральной среде, освобожденной от бактериальных клеток центрифугированием (9660 g, 3 мин, центрифуга miniSpin (Eppendorf, Германия)), согласно [10].

Статистический анализ результатов проводили с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента в программном пакете Microsoft Excel. Данные в таблицах представлены в виде среднего и его стандартной ошибки ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как описано ранее, средне- и высокохлорированные бифенилы оказывают депрессивное воздействие на гуморальный и клеточно-опосредованный иммунитет позвоночных [5–7]. Нами установлено, что ПХБ 1 и ПХБ 2 в эксперименте *in vivo* статистически значимо снижали количество АОК в селенке как по относительным, так и абсолютным

Таблица 1. Влияние орто-моноклорбифенила (ПХБ 1) и мета-моноклорбифенила (ПХБ 2) на количество АОК в селезенке и выраженность реакции ГЗТ

Вещество	lgАОК/млн	lgАОК/орг	Индекс реакции ГЗТ, %
Кукурузное масло (Км)	2.25 ± 0.11	4.66 ± 0.09	20.06 ± 1.78
ПХБ 1	1.70 ± 0.19*	4.11 ± 0.20*	21.73 ± 2.37
ПХБ 2	1.69 ± 0.22*	4.07 ± 0.22*	25.59 ± 3.62

Примечание: * $p \leq 0.05$ по сравнению с контролем.

Таблица 2. Влияние продуктов биодеструкции орто-моноклорбифенила (ПХБ 1) и мета-моноклорбифенила (ПХБ 2) на количество АОК в селезенке и выраженность реакции ГЗТ

Вещество	lgАОК/млн	lgАОК/орг	Индекс реакции ГЗТ, %
Минеральная среда (Кс)	2.04 ± 0.15	4.29 ± 0.19	30.97 ± 4.56
Продукты деструкции ПХБ 1	2.00 ± 0.07	4.48 ± 0.11	24.63 ± 5.38
Продукты деструкции ПХБ 2	2.02 ± 0.17	4.43 ± 0.19	19.59 ± 2.68

показателям, на выраженность реакции ГЗТ исследуемые соединения не влияли (табл. 1).

Таким образом, ПХБ 1 и ПХБ 2 угнетают гуморальный иммунитет, но не влияют на показатели клеточно-опосредованного иммунитета.

Установлено, что продукты микробной трансформации ПХБ 1 и ПХБ 2 не оказывали статистически значимого влияния на количество антителообразующих клеток в селезенке и выраженность реакции ГЗТ по сравнению с группой животных, получавших в качестве контроля минеральную среду (Кс), в которой культивировали микроорганизмы, использованные для деструкции (табл. 2).

На основании результатов ГХ-МС, ВЭЖХ, баз данных NIST17 и KEGG (<http://kegg.jp>) установлено, что штамм *Rhodococcus* sp. FG1 осуществляет разложение ПХБ 1 по классическому аэробному окислительному пути с формированием в качестве основного соединения 2-хлорбензойной кислоты, а ПХБ 2 – с образованием двух конгенов гидроксигированных производных хлорбифенила, а также бензойной и 3-хлорбензойной кислот (рис. 1). Однако, в отличие от метаболитов 2,4,4'-трихлорбифенила [8], они не оказывали негативное влияние на иммунную систему мышей.

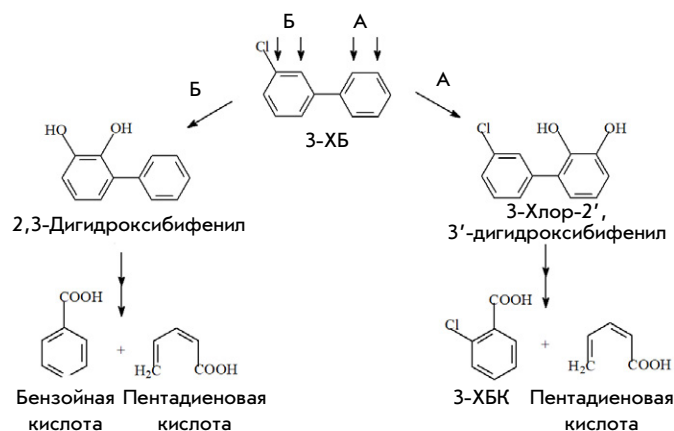


Рис. 1. Схема окисления ПХБ 2 ферментативной системой штамма *Rhodococcus* sp. FG1 и основные продукты деструкции. А – метаболический путь начинается с окисления 2 и 3 атомов углерода в незамещенном кольце молекулы бифенила. Б – метаболический путь начинается с окисления 2 и 3 атомов углерода в замещенном кольце молекулы бифенила

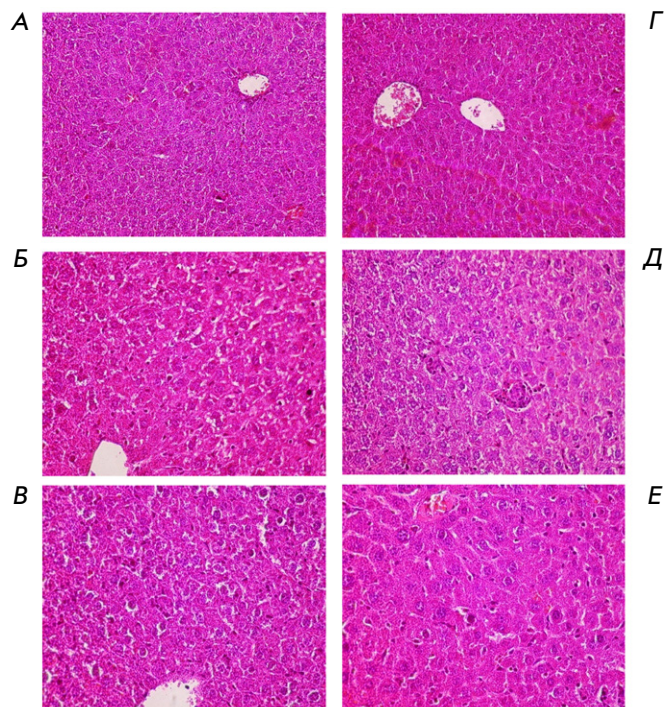


Рис. 2. Структура печени мышей в контрольных группах (А – кукурузное масло, Г – среда культивирования бактерий), под воздействием ПХБ 1 (Б), ПХБ 2 (В), продуктов биодеструкции ПХБ 1 (Д) и продуктов биодеструкции ПХБ 2 (Е) штаммом *Rhodococcus* sp. FG1. Ув. 400. Окраска: гематоксилин-эозином

Гистологическое исследование показало, что печень животных в группах контроля имела нормальное строение, все структуры имели признаки функциональной активности (рис. 2А,Г). Пероральное введение ПХБ 1 и ПХБ 2 привело (в сравнении с группой контроля) к значительному увеличению числа двуядерных гепатоцитов, а также клеток с ядрами разной величины, мелкие фокусы некроза гепатоцитов и выраженную продуктивную воспалительную реакцию с признаками белковой дистрофии, имеющей распространенный характер (рис. 2Б,В). Согласно [11], выраженность реакции оценена на три балла. Согласно [12], внутрибрюшинное введение низкохлорированных бифенилов в тканях печени приводит к обширным клеточным изменениям, при этом не выявлено зависимости выраженности эффекта от введенного конгенера ПХБ. В печени животных, получавших продукты бактериальной деструкции ПХБ 1 и ПХБ 2, сохранялись признаки умеренной белковой дистрофии гепатоцитов, умеренный анизокариоз, увеличение числа двуядерных гепатоцитов в центральных об-

ластях печеночных долек, умеренно продуктивная воспалительная реакция (рис. 2Д,Е). Выраженность реакции согласно [11], оценена на 1.5 балла. Таким образом, можно предположить, что гидроксипроизводные ПХБ 1 и ПХБ 2 и (хлор)бензойные кислоты менее токсичны для гепатоцитов, нежели исходные монохлорбифенилы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования впервые установлено, что *орто*- и *мета*-монохлорированные бифенилы угнетают гуморальный иммунитет, вызывают в печени продуктивную воспалительную реакцию, сопровождающуюся признаками клеточной дистрофии с фокусами некроза. Продукты бактериальной деструкции рассматриваемых хлорбифенилов не обладают иммуносупрессивным эффектом, однако оказывают токсическое воздействие на клетки печени, хотя и менее выраженное. ●

Работа поддержана грантом РНФ
(№ 24-24-00498).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhu M., Yuan Y., Yin H., Guo Z., Wei X., Qi X., Liu H., Dang Z. // Sci. Total. Environ. 2022. V. 805. Article 150270. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.150270.
2. Frossard V., Vagnon C., Cottin N., Pin M., Santoul F., Nafrechoux E. // Sci. Total. Environ. 2023. V. 902. Article 166037. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166037>.
3. Lan T., Liu B., Bao W., Thorne P.S. // Sci. Repts. 2023. V. 13. № 1. Article 18322. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45301-1>.
4. Miletić M., Kmetić I., Kovač V., Šimić B., Petković T., Štrac D.Š., Pleadin J., Murati T. // Env. Sci. Pollut. Res. 2023. V. 30. № 31. P. 77318–77327. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-27812-6>.
5. Gao Y., Huang W., Jiang N., Fang J.K.H., Hu M., Shang Y., Wang Y. // Marine Environ. Res. 2023. V. 192. Article 106214. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2023.106214>.
6. Duffy J.E., Carlson E., Li Y., Prophete C., Zelikoff J.T. // Marine Environ. Res. 2002. V. 54. № 3–5. P. 559–563. [https://doi.org/10.1016/s0141-1136\(02\)00176-9](https://doi.org/10.1016/s0141-1136(02)00176-9).
7. Hammond J.A., Hall A.J., Dyrinda E.A. // Aquatic Toxicol. 2005. V. 74. № 2. P. 126–138. <https://doi.org/10.1016/j.aquat-tox.2005.05.006>.
8. Rengelshausen J., Randerath I., Schettgen T., Esser A., Kaifé A., Lang J., Kraus T., Ziegler P. // Arch. Toxicol. 2023. V. 97. № 10. P. 2609–2623. doi: 10.1007/s00204-023-03578-1.
9. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
10. Egorova D.O., Gorbunova T.I., Pervova M.G., Kir'yanova T.D., Demakov V.A., Saloutin V.I., Chupakhin O.N. // J. Haz. Mat. 2020. V. 400. Article 123328. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123328>.
11. Сенькова А.В., Савин И.А., Черноповская Е.Л., Давыдова А.С., Мещанинова М.И., Бишани А., Воробьева М.А., Зенкова М.А. // Acta Nature. 2024. Т. 16. № 2 (61). С. 61–71. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.27393>.
12. Ludewig G., Robertson L.W. // Cancer Lett. 2013. V. 334. P. 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.041>.