

УДК 57.013:574.24:615.9

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА НАКОПЛЕНИЯ МИКРОЧАСТИЦ ПЛАСТИКА РАЗМЕРОМ 100 И 1000 НМ В ЛЕГКИХ КРЫСЫ ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

^{1,2}Каримов Д.О., ¹Хуснутдинова Н.Ю., ¹Смолянкин Д.А., ¹Гизатуллина А.А.,
¹Ахмадеев А.Р., ¹Мухаммадиева Г.Ф., ¹Рябова Ю.В.

¹ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда
и экологии человека», Уфа, e-mail: ryabovayuvl@yandex.ru;

²ФГБНУ «Национальный научно-исследовательский институт
общественного здоровья имени Н.А. Семашко», Москва

Цель исследования – сравнительная полуколичественная оценка накопления микрочастиц полистирола размером 100 и 1000 нм в ткани легких крыс после однократного воздействия. Экспериментальное моделирование осуществляли *in vivo* на крысах-самках. Микрочастицы полистирола вводили внутрисердечно в объеме 0,5 мл, что обеспечивало немедленное поступление их в кровоток. Через 5 ч животных выводили из эксперимента и немедленно проводили забор образцов тканей легких. Приготовленные криосрезы тканей исследовали методом микроскопии во флуоресцентном режиме. Для оценки накопления применялся полуколичественный метод на основе специально разработанной ранговой шкалы. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием метода Bootstrap с поправкой Холма – Бонферрони. В результате проведенного исследования установлено, что микрочастицы пластика размером 100 и 1000 нм при внутрисердечном введении уже через 5 ч обнаруживаются в легких крыс как в виде отдельных частиц, так и в форме конгломератов. При этом частицы диаметром 1000 нм выявлялись в легочной ткани более чем в два раза чаще, что, вероятно, обусловлено как особенностями кровотока в системном и легочном кругах, так и различиями в захвате частиц альвеолярными макрофагами, обеспечивающими очищение легких от инородных объектов.

Ключевые слова: крысы, эксперимент, микропластик, легкие, полуколичественная оценка

COMPARATIVE SEMI-QUANTITATIVE ASSESSMENT OF THE ACCUMULATION OF 100 NM AND 1000 NM POLYSTYRENE MICROPARTICLES IN RAT LUNG TISSUE FOLLOWING A SINGLE EXPOSURE

^{1,2}Karimov D.O., ¹Khusnutdinova N.Yu., ¹Smolyankin D.A., ¹Gizatullina A.A.,
¹Akhmadeev A.R., ¹Mukhammadiyeva G.F., ¹Ryabova Yu.V.

¹Ufa research institute of occupational health and human ecology, Ufa,
e-mail: ryabovayuvl@yandex.ru;

²N.A. Semashko National Research Institute of Public Health, Moscow

The aim of this study was to perform a comparative semi-quantitative assessment of the accumulation of 100 nm and 1000 nm polystyrene microparticles in rat lung tissue after a single exposure. The experimental modeling was conducted *in vivo* using female rats. Polystyrene microparticles were administered via intracardiac injection at a volume of 0.5 mL, ensuring immediate entry into the systemic circulation. After 5 hours, the animals were euthanized and lung tissue samples were promptly collected. Cryosections of the tissues were examined using fluorescence microscopy. The degree of microparticle accumulation was assessed using a semi-quantitative method based on a specially developed ranking scale. Statistical analysis of the obtained data was carried out using the Bootstrap method with Holm–Bonferroni correction. The results demonstrated that both 100 nm and 1000 nm plastic microparticles were detectable in the lungs as early as 5 hours after intracardiac injection, appearing as both individual particles and particle aggregates. Notably, 1000 nm particles were found in lung tissue more than twice as often as 100 nm particles. This difference is likely attributable to both the characteristics of pulmonary and systemic blood flow and the size-dependent efficiency of phagocytic uptake by alveolar macrophages responsible for clearing foreign material from the lungs.

Keywords: rats, experiment, micropaste, lungs, semiquantitative assessment

Введение

В последние годы микропластик рассматривается как один из приоритетных и относительно устойчивых загрязнителей окружающей среды [1, 2]. Наряду с широким распространением микропластика в пищевых продуктах, питьевой воде и Мировом

океане все больше данных свидетельствует о его способности оказывать негативное биологическое действие на живые системы, в том числе человека. В метаанализе, оценившем результаты 13 исследований с привлечением добровольцев, установлена связь между уровнем загрязнения микропластика,

репродуктивным здоровьем женщин и исходом беременности, в том числе задержкой внутриутробного развития плода [3]. Интересно, что авторами установлено: даже употребление пищи из пластиковых контейнеров увеличивает вероятность «загрязнения» микропластиком беременных женщин [3]. Подтверждена роль микрочастиц пластика в заболеваниях гепатобилиарной системы – в частности, его наличие усугубляет течение неалкогольной жировой болезни печени, как было продемонстрировано в экспериментальном исследовании на мышах [4]. Все чаще появляются свидетельства о влиянии на желудочно-кишечный тракт путем нарушения баланса кишечной микрофлоры, что, в свою очередь, само по себе способно приводить к системным эффектам, в том числе на иммунную и нервную системы [5, 6]. Среди упомянутых эффектов особенно выделяется способность провоцировать воспалительные процессы в печени, основном органе детоксикации, сопровождающиеся апоптозом клеток [5], что, безусловно, косвенно способствует снижению адаптационного потенциала организма к потенциальному воздействию ксенобиотиков любого рода. Однако, несмотря на бурное изучение вредных свойств микрочастиц пластика, вопросы его распределения в организме, тканеспецифичной локализации и кинетики накопления остаются слабо изученными. Имеются лишь единичные сведения о том, что микрочастицы пластика благодаря своему небольшому размеру могут легко проникать в пищеварительный тракт и задерживаться там, впоследствии преодолевая биологические барьеры и перемещаясь в другие части организма, такие как кровь, печень, почки и мозг [7].

Вместе с тем большая часть доступной литературы сосредоточена преимущественно на оценке токсического действия микропластика, тогда как данные о его биораспределении, в том числе при системном поступлении, крайне ограничены. Между тем особенности распределения микрочастиц в организме могут напрямую определять как характер, так и выраженность их биологического действия. Это хорошо продемонстрировано в исследованиях, посвященных токсическим свойствам наночастиц, для которых токсичность определяется не только химическим составом, но и физико-химическими параметрами: размером, формой, зарядом поверхности, способностью образовывать белковую корону и агрегаты, адсорбировать на своей поверхности прочие вещества [8, 9]. Эти характеристики существенно влияют на проникновение частиц в ткани и их взаимодействие с клетками [9].

Кроме того, растет количество данных, указывающих на способность микропластика адсорбировать на своей поверхности другие загрязнители, включая органические соединения [10, 11], что потенциально может усиливать токсический эффект последних, способствовать их транспортировке вглубь биологических тканей вместе с самим микропластиком.

Следует отметить, что используемые в ряде исследований методы выявления микропластика в тканях часто предполагают сложные аналитические технологии, требующие дорогостоящего оборудования и высокой квалификации персонала. На этом фоне особую ценность приобретают простые и воспроизводимые подходы, такие как полуколичественные методы визуальной оценки, широко применяемые в различных отраслях науки. Подобные методы не требуют сложного оборудования или специализированной подготовки, обеспечивают быструю интерпретацию результатов и хорошо подходят для первичного скрининга. Несмотря на относительную субъективность, при правильно организованной системе ранжирования и двойной слепой оценке они могут давать стабильные и сопоставимые результаты, особенно в условиях, когда количественный анализ затруднен или экономически нецелесообразен.

Цель исследования – сравнительная полуколичественная оценка накопления микрочастиц полистирола размером 100 и 1000 нм в ткани легких крыс после однократного воздействия.

Материалы и методы исследования

Самки крыс линии Wistar возрастом около 3 месяцев и массой 180–200 г на начало экспериментального исследования были получены из питомника «Рапполово» и содержались в оборудованном виварии в соответствии с действующими нормами и стандартами Российской Федерации, а также положениями Директивы 2010/63/ЕС Европейского парламента о защите животных, используемых в научных целях. Содержание и уход за животными соответствовали требованиям ГОСТ 33215–2014. Этическое заключение на проведение исследования получено (протокол № 01-02 от 08.02.2024).

В исследование включено 12 интактных самок, которые были случайным образом распределены на 4 группы по 3 животных. Каждой крысе была нанесена индивидуальная метка, которая располагалась на хвосте. С учетом ограниченного количества животных в каждой группе, для повышения достоверности результатов от каждого органа отбиралось по 4 образца тканей из слу-

чайных областей, что в сумме обеспечивало 12 наблюдений на группу. Учет стадий эстрального цикла не проводился, однако, благодаря идентичным условиям содержания и случайному распределению животных по группам, влияние полового цикла на результаты считается минимальным.

Для изучения распределения микропластици пластика использовались меченные флуоресцентным красителем полистирольные частицы сферической формы диаметром 100 и 1000 нм (QiuHuan, Китай; максимум возбуждения – 488 нм, максимум эмиссии – 518 нм), приготовленные в виде 1% суспензии в дистиллированной воде. Перед введением суспензия гомогенизировалась в ультразвуковой ванне (УЗО-«МЕДЭЛ») с использованием ротатора (BioSan) и контролировалась визуально с помощью фильтра EGFP на флуоресцентном имиджере Celena X (Logos Biosystems, Южная Корея). Контрольной субстанцией служил физиологический раствор.

Микрочастицы вводили в объеме 0,5 мл внутрисердечно с целью моделирования острого системного воздействия и изучения последующего распределения в легочной ткани. Такой способ введения обеспечивает прямой доступ микропластика в сосудистое русло и минимизирует возможные потери при прохождении желудочно-кишечного тракта или при ингаляции, что позволяет строго контролировать дозировку и условия распределения вещества [12]. При этом следует учитывать, что данный метод не отражает физиологические пути попадания микропластика в организм, а моделирует искусственное острое системное воздействие [13]. Через 5 ч после введения животных подвергали эвтаназии методом декапитации. Из легких немедленно отбирались образцы тканей для морфологического анализа. До криотомии фрагменты хранились при -70°C в криогеле. Срезы толщиной 10 мкм изготавливались на микротоме-криостате Leica CM 1520 (Leica BioSystems, Германия), после чего наносились на предметные стекла и документировались с использованием светофильтра EGFP при увеличении $200\times$ (Celena X, Logos Biosystems).

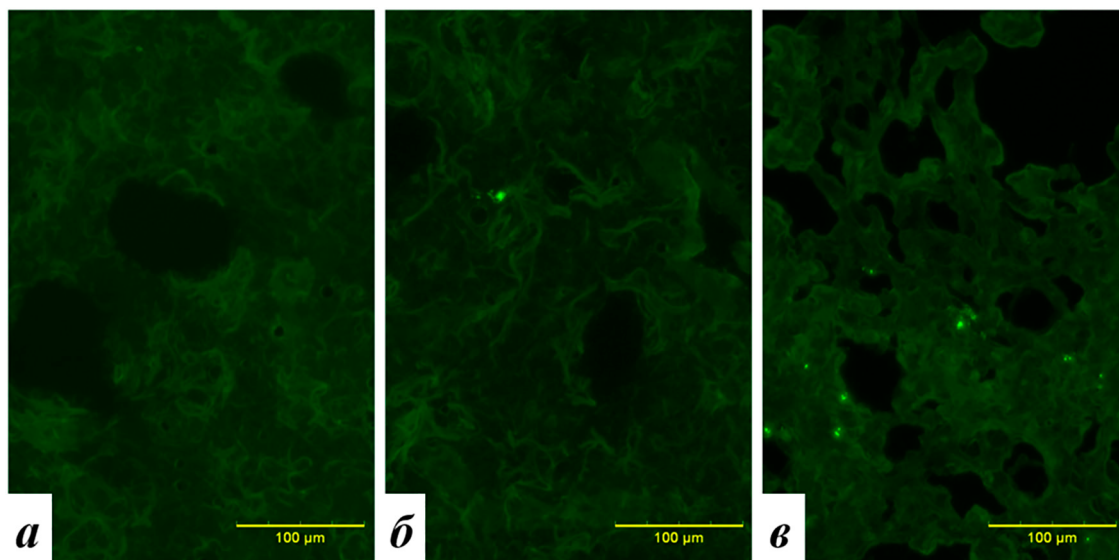
Для полуколичественной оценки степени накопления микропластика в легочной ткани два независимых исследователя оценивали количество флуоресцирующих объектов и их конгломератов не менее чем в 30 случайно выбранных полях зрения на каждый образец. К флуоресцирующим объектам относили четко очерченные элементы сферической формы, а также конгломераты таких частиц. Для снижения

субъективности оценка проводилась независимо двумя операторами, результаты усреднялись. Применялась ранговая шкала: 0 – отсутствие флуоресцирующих объектов или участков, 1 – единичные, 2 – умеренное количество, 3 – выраженное накопление.

Статистическая обработка данных полуколичественной оценки выполнялась с использованием метода Bootstrap с поправкой Холма – Бонферрони. С одной стороны, Bootstrap обеспечивает устойчивость анализа при небольшом объеме выборки и не требует строгих допущений о распределении данных, что особенно важно для ранговых шкал. С другой, для множественных сравнений между группами использовалась поправка Холма – Бонферрони, которая представляет собой усовершенствованную версию классической поправки Бонферрони. Этот метод позволяет эффективно контролировать общий уровень ошибок первого рода (ложноположительных результатов), возникающих при множественном тестировании, при этом сохраняя более высокую статистическую мощность по сравнению с консервативной классической процедурой. Сначала полученные р-значения упорядочиваются по возрастанию, после чего каждому из них присваивается индивидуальный уровень значимости, становящийся все более строгим по мере увеличения ранга. Проверка гипотез осуществляется последовательно: если первая (наименьшая) р-значимость оказывается статистически значимой, проверка продолжается; в противном случае весь набор признается недостоверным. Такой подход позволяет более надежно интерпретировать результаты множественных сравнений, минимизируя риск случайных находок при сохранении чувствительности анализа [14].

Результаты исследования и их обсуждение

На рисунке представлены микрофотографии фрагментов тканей легких животных контрольной группы и животных, подвергшихся воздействию МП размером 100 и 1000 нм, полученные во флуоресцентном режиме. В контрольной группе визуализируется умеренное равномерное фоновое свечение ткани, обусловленное естественной аутофлуоресценцией. Это явление характерно для многих биологических структур, в том числе коллагена, эластина, липофусцина, и служит естественным «шумом», неминуемо сопровождающим флуоресцентную микроскопию. Важно отметить, что аутофлуоресценция не является артефактом, она отражает естественную метаболическую активность тканей.



Микрофотографии фрагментов легких животных контрольной группы (а) и экспериментальных животных, подвергшихся воздействию МП размером 100 (б) и 1000 (в), увеличение $\times 200$

Структура ткани животных, получавших микропластицы пластика размером 100 или 1000 нм, сохранена и аналогична контролю. Вместе с тем встречаются яркие флуоресцирующие объекты разного размера – микропластицы пластика либо их конгломераты.

Полуколичественная оценка накопления микропластика показала, что в контрольной группе среднее количество флуоресцирующих объектов и их конгломератов составило $0,12 \pm 0,04$ балла. Эти значения не свидетельствуют о наличии микропластика как такового, а скорее отражают уровень фоновой флуоресценции, характерный для данной ткани. Поскольку оценка проводилась вслепую двумя независимыми операторами, вероятно, отдельные участки фонового свечения могли быть ошибочно интерпретированы как частицы.

В группе, получившей микропластицы диаметром 100 нм, это значение было статистически значимо выше и составило $0,54 \pm 0,05$ балла ($p = 0,0001$ по сравнению с контролем). В группе, получившей частицы диаметром 1000 нм, уровень накопления оказался еще выше – $1,31 \pm 0,06$ балла ($p = 0,0001$ по сравнению с контролем). Различия между двумя экспериментальными группами также оказались статистически значимыми ($p = 0,0001$), при этом показатель для группы 1000 нм почти в два раза превышал таковой для группы 100 нм.

Важно подчеркнуть, что задачей настоящего исследования не являлось модели-

рование реального (ингаляционного) пути поступления микропластика в организм. Целью работы было расширение научных представлений о распределении частиц в случае их попадания в системный кровоток, например, после преодоления желудочно-кишечного барьера. Предполагается, что различия в распределении микропластиц после внутрисердечного введения обусловлены как физико-химическими свойствами самих частиц, так и особенностями системного и легочного кровообращения. При введении вещества в левый желудочек сердца оно поступает в большой круг кровообращения, однако дальнейшее поведение частиц зависит от их размера, как это известно и доказано, например, для частиц микро- и нанометрового диапазона [9, 15]. Частицы диаметром 100 нм, крайне близкие к нанометровому диапазону, обладая низким гидродинамическим сопротивлением, потенциально способны проходить через капиллярные барьеры и распространяться таким образом [16]. Напротив, микропластицы 1000 нм, ввиду больших размеров, могут задерживаться на уровне микрососудов, особенно в условиях высокой вязкости среды и наличия клеточных фильтров в легочном русле.

Дополнительным фактором, влияющим на распределение микропластиц пластика в живом организме, может быть фагоцитоз со стороны иммунных клеток. Как первичный фагоцит в легких, альвеолярный макрофаг отвечает за удаление

чужеродных частиц и патогенов. И, хотя он может поглощать частицы в том числе до 1000 нм, частицы более 100 нм уже считаются достаточно крупными для фагоцитоза. Существует два независимых механизма эндоцитоза крупных частиц свыше 100 нм: фагоцитоз и макропиноцитоз. Обе формы эндоцитоза опосредованы рецепторами и требуют актин-зависимой перестройки цитоскелета; однако механика поглощения различна. Фагоцитоз включает механизм, подобный застёжке-молнии, в котором псевдоподии плотно обхватывают цель, исключая окружающую жидкость. Для сравнения, макропиноцитоз использует складки клеточной мембраны, которые выступают вокруг цели, складываются обратно на мембрану и сливаются, образуя большие эндоцитарные макропиносомы [17]. Также стоит отметить, что частицы свыше 1000 нм и их конгломераты могут быть слишком крупными для эффективного захвата [17]. Таким образом, можно предположить, что частицы меньшего размера, поступив с током крови в легкие, частично покидают их и продолжают циркуляцию, в то время как более крупные микрочастицы остаются в легочной ткани. Следует отметить, что визуально фиксируемое скопление флуоресцирующих объектов не позволяет с уверенностью установить, наблюдаются ли индивидуальные частицы, их агрегаты или поглощенные макрофагами комплексы. Полученные данные подтверждают, что физические характеристики, такие как размер частиц, играют ключевую роль в их биологическом поведении. Эти параметры должны учитываться не только для наноматериалов, но и в отношении микропластика, влияние которого на организм остается недостаточно изученным. Вместе с тем необходимы дальнейшие исследования, включая иммуногистохимические и ультраструктурные методы, необходимы для выяснения механизмов клеточного захвата, накопления и элиминации микропластика при остром и особенно при длительном воздействии.

Заключение

В исследовании на белых крысах-самках показано, что уже через 5 ч после однократного системного воздействия (внутрисердечного введения) микрочастицы пластика диаметром 100 и 1000 нм накапливаются в легочной ткани крыс. Степень накопления при этом зависит от размера частиц: более крупные частицы выявлялись статистически значимо чаще, чем частицы меньшего диаметра. Вероятно, это связано как с осо-

бенностями легочной микроциркуляции, так и с ограничениями фагоцитарной активности макрофагов в отношении частиц определенного размера.

Наблюдаемая тенденция подчеркивает важность учета физико-химических свойств микропластика при оценке его биологического поведения. Визуально определяемые флуоресцирующие объекты могут представлять собой как отдельные частицы, так и их конгломераты или комплексы, поглощенные макрофагами, что требует уточнения с помощью дополнительных методов. Полученные результаты демонстрируют перспективность полук количественного подхода к оценке накопления микропластика и подчеркивают необходимость дальнейшего изучения механизмов его распределения и элиминации, особенно в условиях длительного воздействия.

Список литературы

1. Zhao S., Kvale K.F., Zhu L., Zettler E.R., Egger M., Mincer T.J., Amaral-Zettler L.A., Lebreton L., Niemann H., Nakajima R., Thiel M., Bos R.P., Galgani L., Stubbins A. The distribution of subsurface microplastics in the ocean // *Nature*. 2025. Vol 641, Is. 8061. P. 51–61. DOI: 10.1038/s41586-025-08818-1.
2. Kwon J.H., Kim J.W., Pham T.D., Tarafdar A., Hong S., Chun S.H., Lee S.H., Kang D.Y., Kim J.Y., Kim S.B., Jung J. Microplastics in Food: A Review on Analytical Methods and Challenges // *Int J Environ Res Public Health*. 2020. Vol 17, Is. 18. P. 6710. DOI: 10.3390/ijerph17186710.
3. Ali-Hassanzadeh M., Arefinia N., Ghoresli Z.A., Askarpour H., Mashayekhi-Sardoo H. The effects of exposure to microplastics on female reproductive health and pregnancy outcomes: A systematic review and meta-analysis // *Reprod Toxicol*. 2025. № 135. P. 108932. DOI: 10.1016/j.reprotox.2025.108932.
4. Li Q., Niu X., Cai Y., Li L., Xia Z. Exposure to submicroplastics promotes the progression of nonalcoholic fatty liver disease in ApoE-deficient mice // *Toxicology*. 2025. № 515. P. 154137. DOI: 10.1016/j.tox.2025.154137.
5. Xia S., Yan C., Cai G., Xu Q., Zou H., Gu J., Yuan Y., Liu Z., Bian J. Gut dysbiosis exacerbates inflammatory liver injury induced by environmentally relevant concentrations of nanoplastics via the gut-liver axis // *J. Environ Sci (China)*. 2025. № 155. P. 250–266. DOI: 10.1016/j.jes.2024.11.022.
6. Sofield C.E., Anderton R.S., Gorecki A.M. Mind over Microplastics: Exploring Microplastic-Induced Gut Disruption and Gut-Brain-Axis Consequences // *Curr Issues Mol Biol*. 2024. Vol 46, Is. 5. P. 4186–4202. DOI: 10.3390/cimb46050256.
7. Zarus G.M., Muianga C., Hunter C.M., Pappas R.S. A review of data for quantifying human exposures to micro and nanoplastics and potential health risks // *Sci Total Environ*. 2021. № 756. P. 144010. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.144010.
8. Joudeh N., Linke D. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists // *J Nanobiotechnology*. 2022. Vol 20, Is. 1. P. 262. DOI: 10.1186/s12951-022-01477-8.
9. Sukhanova A., Bozrova S., Sokolov P., Berestovoy M., Karaulov A., Nabiev I. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties // *Nanoscale Res Lett*. 2018. Vol. 13, Is. 1. P. 44. DOI: 10.1186/s11671-018-2457-x.
10. Chand N., Krause S., Prajapati S.K. The potential of microplastics acting as vector for triclosan in aquatic environments // *Aquat Toxicol*. 2025. № 284. P. 107381. DOI: 10.1016/j.aquatox.2025.107381.

11. Adamu H., Haruna A., Zango Z.U., Garba Z.N., Musa S.G., Yahaya S.M., IbrahimTafida U., Bello U., Danmallam U.N., Akinpelu A.A., Ibrahim A.S., Sabo A., Aljunid Merican Z.M., Qamar M. Microplastics and Co-pollutants in soil and marine environments: Sorption and desorption dynamics in unveiling invisible danger and key to ecotoxicological risk assessment // *Chemosphere*. 2024. № 362. P. 142630. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2024.142630.
12. Carr K.E., Smyth S.H., McCullough M.T., Morris J.F., Moyes S.M. Morphological aspects of interactions between microparticles and mammalian cells: intestinal uptake and onward movement // *Prog Histochem Cytochem*. 2012. Vol 46, Is. 4. P. 185–252. DOI: 10.1016/j.proghi.2011.11.001.
13. Kannan K., Vimalkumar K. A Review of Human Exposure to Microplastics and Insights Into Microplastics as Obesogens // *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021. № 12. P. 724989. DOI: 10.3389/fendo.2021.724989.
14. Wallace H.M., Alexander J., Barregård L., Bignami M. Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood // *EFSA Journal*. 2016. № 14. P. 1–30.
15. Prow T.W., Grice J.E., Lin L.L., Faye R., Butler M., Becker W., Wurm E.M., Yoong C., Robertson T.A., Soyer H.P., Roberts M.S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery // *Adv Drug Deliv Rev*. 2011. Vol. 63, Is. 6. P. 470–491. DOI: 10.1016/j.addr.2011.01.012.
16. Thomas O.S., Weber W. Overcoming Physiological Barriers to Nanoparticle Delivery-Are We There Yet? // *Front Bioeng Biotechnol*. 2019. № 7. P. 415. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00415.
17. Mohning M.P., Thomas S.M., Barthel L., Mould K.J., McCubrey A.L., Frasch S.C., Bratton D.L., Henson P.M., Janssen W.J. Phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages during acute lung injury requires MerTK // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2018. Vol. 314, Is. 1. P. L69–L82. DOI: 10.1152/ajplung.00058.2017.