

Морфологическая характеристика внутренних органов мышей при длительном потреблении микропластика

Н.А. Золотова, Д.Ш. Джалилова, И.С. Цветков, А.В. Сентябрева, О.В. Макарова

Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Резюме. Введение. Микропластик, загрязняющий окружающую среду, может представлять опасность для здоровья живых организмов, в том числе человека. Экспериментальные исследования на мышах и крысах показали, что микропластик способен проникать во внутреннюю среду организма, вызывать структурные повреждения и нарушения функции различных органов. Тем не менее данные, посвященные этой проблеме, фрагментарны и противоречивы. Цель работы – охарактеризовать морфологические изменения внутренних органов мышей при длительном потреблении разных доз микропластика.

Материалы и методы. Мышам трех опытных групп (пять мышей в каждой группе) в течение 4 недель питьевую воду заменяли на суспензию частиц полистирола диаметром 5 мкм в дистиллированной воде с концентрацией 0,1, 1 и 10 мг/л. Средние дозы потребления составили 0,023, 0,23 и 2,3 мг микропластика на килограмм массы тела животного в сутки, соответственно. Животные контрольной группы на протяжении всего эксперимента получали дистиллированную воду. Проводили морфологическое исследование толстой кишки, селезенки, печени, почек, легких, тимуса, брыжеечных лимфатических узлов, головного мозга, сердца, семенников и мышцы бедра. В ободочной кишке морфометрическими методами были оценены воспалительная инфильтрация, число эндокринных и бокаловидных клеток и содержание в последних нейтральных и высокосульфатированных муцинов.

Результаты. Патологических изменений в печени, почках, легких, тимусе, брыжеечных лимфатических узлах, головном мозге, сердце, семенниках и мышце бедра мышей при воздействии разных доз частиц полистирола диаметром 5 мкм не выявлено. При низкой дозе микропластика (0,023 мг/кг/сут) обнаружено снижение объемной доли бокаловидных клеток в слизистой оболочке ободочной кишки. При высокой концентрации микропластика (2,3 мг/кг/сут) наблюдались активация морфофункциональных зон селезенки, а также повышение содержания эндокринных клеток и снижение доли высокосульфатированных муцинов в бокаловидных клетках.

Заключение. Микропластики полистирола диаметром 5 мкм в дозах 0,023–2,3 мг/кг/сут при воздействии в течение 4 недель вызывают адаптивные морфофункциональные изменения в толстой кишке и селезенке.

Ключевые слова: микропластик, полистирол, селезенка, ободочная кишка, внутренние органы

Для корреспонденции: Наталья Александровна Золотова. E-mail: natashazltv@gmail.com

Для цитирования: Золотова Н.А., Джалилова Д.Ш., Цветков И.С., Сентябрева А.В., Макарова О.В. Морфологическая характеристика внутренних органов мышей при длительном потреблении микропластика. Клин. эксп. морфология. 2023;12(3):82–92. DOI: 10.31088/СЕМ2023.12.3.82-92.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ № 22-24-00232.

Статья поступила 30.11.2022. Получена после рецензирования 22.12.2022. Принята в печать 10.04.2023.

Morphological features of the internal organs in mice after prolonged microplastics consumption

N.A. Zolotova, D.Sh. Dzhaliilova, I.S. Tsvetkov, A.V. Sentyabreva, O.V. Makarova

Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky National Research Centre of Surgery", Moscow, Russia

Abstract. Introduction. Microplastics (MP) pollute the environment and can pose a danger to living organisms including humans. Experimental studies on mice and rats demonstrated that microplastics can enter the internal environment, causing structural damage to and dysfunction of various organs. However, data

on this issue are scarce and contradictory. The aim of this paper was to characterize morphological changes in the internal organs in mice after prolonged MP consumption in different doses.

Materials and methods. We formed four groups (n=5 each): three experimental and one control group. Mice of the experimental groups were given a 5- μ m polystyrene particle suspension in distilled water at a concentration of 0.1, 1, and 10 mg/l for 4 weeks. The daily consumption doses averaged 0.023, 0.23, and 2.3 mg of microparticles per kg of animal body weight, respectively. The control group received distilled water throughout the experiment. We conducted a morphological examination of the colon, spleen, liver, kidneys, lungs, thymus, mesenteric lymph nodes, brain, heart, testicles, and thigh muscles. In the colon, morphometric methods were used to evaluate inflammatory infiltration, the number of endocrine and goblet cells, and the content of neutral and highly sulfated mucins in the latter.

Results. On morphological examination under the influence of 5- μ m polystyrene particle consumption in different doses, we revealed pathological changes only in the spleen and colon. However, a decrease in the goblet cell volume fraction in the colon mucosa was found in the group with low dose of microplastics (0.023 mg/kg/day). The group that consumed 2.3 mg/kg/day of microplastics showed the activation of both spleen compartments, an increased endocrine cells count, and a decreased proportion of highly sulfated mucins in goblet cells.

Conclusion. Polystyrene microparticles with a 5- μ m diameter consumed for 4 weeks at doses of 0.023–2.3 mg/kg/day cause adaptive morphological and functional changes in the colon and spleen.

Keywords: microplastics, polystyrene, spleen, colon, internal organs

Corresponding author: Natalia A. Zolotova. E-mail: natashazltv@gmail.com

For citation: Zolotova N.A., Dzhililova D.Sh., Tsvetkov I.S., Sentyabreva A.V., Makarova O.V. Morphological features of the internal organs in mice after prolonged microplastics consumption. Clin. exp. morphology. 2023;12(3):82–92 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.3.82-92.

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 22-24-00232.

Received 30.11.2022. **Received in revised form** 22.12.2022. **Accepted** 10.04.2023.

Введение

Термин «пластмассы» или «пластики» обозначает любые материалы, основой которых являются синтетические либо природные высокомолекулярные соединения – полимеры. За последние 60 лет во всем мире произведено более 6,3 млрд тонн различных пластмасс [1]. Пластиковый мусор в окружающей среде очень медленно разлагается, но быстро распадается на мелкие фрагменты. Пластиковые фрагменты размером менее 5 мм получили название «микропластик» (МП). За счет малых размеров частиц МП интенсивно распространяется в окружающей среде с водой и ветром и обнаруживается по всему земному шару: в воздухе, почве и воде, в полярных льдах, на глубине морей, в живых организмах. Человек постоянно поглощает МП с водой и пищей, вдыхает с воздухом [2], поэтому основной вопрос в проблеме загрязнения среды МП заключается в том, представляет ли он риск для здоровья человека. Тем не менее однозначного ответа на этот вопрос до сих пор нет.

Наиболее часто для оценки токсических и нетоксических эффектов различных веществ на организм человека в качестве модельных животных используют лабораторных грызунов. Исследований эффектов МП на организм лабораторных грызунов на данный момент проведено относительно немного: к сентябрю 2021 года было опубликовано всего 30 статей [2]. На 1 ноября 2022 года в базе данных PubMed по запросу *microplastic+mice* отображается 160 работ. В большинстве случаев для моделирования эффектов длитель-

ного потребления МП микрочастицы пластика вводят мышам перорально с водой через желудочный зонд или заменяют воду в поилках на суспензию МП. Чаще всего используются частицы полистирола диаметром 0,5 или 5 мкм. Полистирол (PS) – один из наиболее распространенных типов пластика, из него изготавливают одноразовую посуду и упаковочные материалы, строительные материалы – такие как сэндвич-панели, теплоизоляционные плиты, декоративные элементы, пленки; медицинское оборудование, включая одноразовые инструменты и различные детали устройств для переливания крови, и т.д. Дозы при пероральном воздействии варьируют от 0,01 до 100 мг/кг/сут, чаще всего составляют 0,024 и 0,24 мг/кг/сут. При пероральном введении лабораторным грызунам частицы МП были обнаружены в кишечнике, печени, почках, легких, селезенке, сердце, яичниках и семенниках, что вызывало биохимические изменения, структурные повреждения и дисфункцию этих органов [2, 3]. Однако из-за небольшого числа исследований и значительных различий в выборе видов и линий животных, доз, типов и размеров частиц МП, способов его введения, продолжительности воздействия данные о потенциальном вреде пластика для человека и животных фрагментарны и противоречивы.

В связи с изложенным целью работы – охарактеризовать морфологические изменения внутренних органов мышей при потреблении частиц микропластика в течение 4 недель в дозах 0,023, 0,23 и 2,3 мг на килограмм массы тела в сутки.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 20 половозрелых самцах мышей линии C57BL/6, полученных из питомника «Столбовая». Мышей содержали в открытой системе при температуре +18–25°C при естественном освещении, свободном доступе к воде и комбикорму ПК-120-1 (ООО «Лабораторснаб», Россия, сертификат соответствия № РОССТУ.п081.В00113, ГОСТ Р50258-92). При работе с экспериментальными животными руководствовались Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Исследование одобрено биоэтической комиссией НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына (протокол № 31(7) от 03.12.2021).

Животных разделили на четыре группы по пять мышей в каждой. В трех опытных группах воду в поилках на 4 недели заменяли на суспензию микрочастиц полистирола диаметром 5 мкм (Micro particles based on polystyrene, superparamagnetic, orange fluorescent size: 5 µm, 49831, Sigma-Aldrich, США) в дистиллированной воде, концентрация МП – 0,1, 1 и 10 мг/л. Средняя масса тела мышей составляла 22,0±2,5 грамма, каждое животное потребляло около 5 мл суспензии частиц МП в день. Соответственно, в среднем дозы составляли 0,023, 0,23 и 2,3 мг МП на килограмм массы тела животного в сутки. Суспензию частиц готовили ежедневно, жидкость в поилках взбалтывали несколько раз в день. Мыши контрольной группы на протяжении всего эксперимента потребляли дистиллированную воду. Животных выводили из эксперимента на 29-е сутки методом цервикальной дислокации под эфирным наркозом.

Проводили аутопсию животных, забирали внутренние органы и четырехглавую мышцу бедра. Дистальный отдел ободочной кишки вскрывали по брыжейке, промывали фосфатно-солевым буфером (Phosphate buffered saline (PBS), pH 7,4, 0.01M, таблетки, «БиолоТ», Россия), расправляли на миллипоровом фильтре, фиксировали в 10% забуференном формалине («Биовитрум», Россия) в течение суток. Печень, почку, селезенку, тимус, брыжеечные лимфатические узлы, головной мозг, сердце, мышцу бедра и семенник фиксировали в жидкости Буэна в течение суток, а легкие – в фиксаторе Карнуа в течение 4 часов. После гистологической проводки в аппарате Tissue-Tek VIP5Jr (Sakura, США) образцы тканей заключали в гистомикс на аппарате Tissue-Tek TEC (Sakura, США), изготавливали срезы толщиной 5 мкм на микротоме Microm HM340E (Thermo Fisher Scientific, США). Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Проводили морфологическое исследование препаратов.

Для оценки количества клеток в собственной пластинке слизистой оболочки (СПСО) ободочной кишки окрашенные гематоксилином и эозином препараты фотографировали при ×400 на микроскопе Axioptan 2 imaging (Carl Zeiss, Германия). В программе PhotoM 1.21 (© А. Черниговский, 2000–2001) измеряли

площадь соединительной ткани СПСО, подсчитывали число ядер, попавших в эту зону. Рассчитывали число клеточных элементов на стандартную единицу площади СПСО (1 мкм²).

Для оценки объемной доли бокаловидных клеток в слизистой оболочке толстой кишки и содержания в них высокосульфатированных и нейтральных муцинов гистологические препараты окрашивали альциановым синим pH 1,0 и проводили ШИК-реакцию. Препараты фотографировали при ×200 в одинаковых условиях освещения. В программе ImageJ (National Institute of Health, США) проводили бинаризацию снимков препаратов с ШИК-реакцией, устанавливая порог так, чтобы выделенными оказывались только бокаловидные клетки. Обводили участок с правильно ориентированными криптами от мышечной пластинки до просвета, определяли его площадь и площадь бокаловидных клеток на нем. Рассчитывали объемную долю бокаловидных клеток как отношение площади бокаловидных клеток к площади слизистой оболочки. На снимках препаратов, окрашенных альциановым синим, и после проведения ШИК-реакции в программе ImageJ измеряли среднюю яркость точек бокаловидных клеток и фона – участка снимка без ткани. Рассчитывали оптическую плотность бокаловидных клеток как десятичный логарифм отношения средней яркости точек фона к средней яркости точек бокаловидных клеток.

Для оценки числа эндокринных клеток в ободочной кишке проводили иммунофлуоресцентное исследование гистологических срезов с антителами к хромогранину А (Rabbit-anti-mouse polyclonal anti-Chromogranin A antibody, ab15160, Abcam, Великобритания, разведение 1:200). Использовали вторичные антитела с флуоресцентной меткой Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody Alexa Fluor™ 488 (A11008, Invitrogen, разведение 1:300) [4, 5]. Препараты фотографировали при ×100. В программе PhotoM 1.21 измеряли площадь участка слизистой оболочки с правильно ориентированными криптами. Подсчитывали число клеток с флуоресцентной меткой на выделенном участке. Рассчитывали число хромогранин А-положительных клеток на 1 мкм² площади слизистой оболочки.

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе STATISTICA 6.0 (StatSoft, США). Выборки описывали через медиану и межквартильные размахи. Для сравнения групп использовали дисперсионный анализ Крускала–Уоллиса в сочетании со множественным сравнением средних рангов. Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки $p < 0,05$.

Результаты

При морфологическом исследовании в печени, почках, легких, тимусе, брыжеечных лимфатических узлах, головном мозге, сердце, семенниках и мышце бедра мышей контрольной группы и получавших

суспензию разных доз МП какие-либо патологические изменения не выявлены.

В опытных группах по сравнению с контрольной обнаружены морфологические изменения в селезенке и дистальном отделе ободочной кишки. В группе животных, потреблявших МП в дозе 2,3 мг/кг/сут, в селезенке наблюдались расширение светлых центров лимфоидных узелков и расширение маргинальных зон, что указывает на антигенную активацию (рис. 1). По сравнению с контрольной у животных всех опытных групп на качественном уровне в дистальном отделе ободочной кишки отмечались увеличение размеров и снижение количества бокаловидных клеток (рис. 2 А–D).

При исследовании печени, почек, легких, тимуса, брыжеечных лимфатических узлов, головного мозга, сердца, семенников и мышцы бедра не было обнаружено различий между опытными и контрольной группами.

Так как при качественном морфологическом исследовании были выявлены структурные изменения в обо-

дочной кишке, проведено морфометрическое исследование этого органа. При оценке содержания клеточных элементов в СПСО ободочной кишки статистически значимые различия между контрольной и опытными группами не выявлены (рис. 2 Е).

Эндокринные клетки выявляли с помощью антител к компоненту секреторных гранул – хромогранину А. В группах мышей, потреблявших МП в дозах 0,023 и 0,23 мг/кг/сут, содержание хромогранин А-положительных клеток в слизистой оболочке ободочной кишки не отличалось от контрольных значений. В группе 2,3 мг/кг/сут этот показатель статистически значимо возрастал (рис. 3).

По сравнению с контролем во всех экспериментальных группах отмечалась выраженная тенденция к снижению объемной доли бокаловидных клеток, однако статистической значимости различия достигали только в группе животных, потреблявших МП в дозе 0,023 мг/кг/сут. Содержание в бокаловидных клетках нейтральных и высокосульфатированных

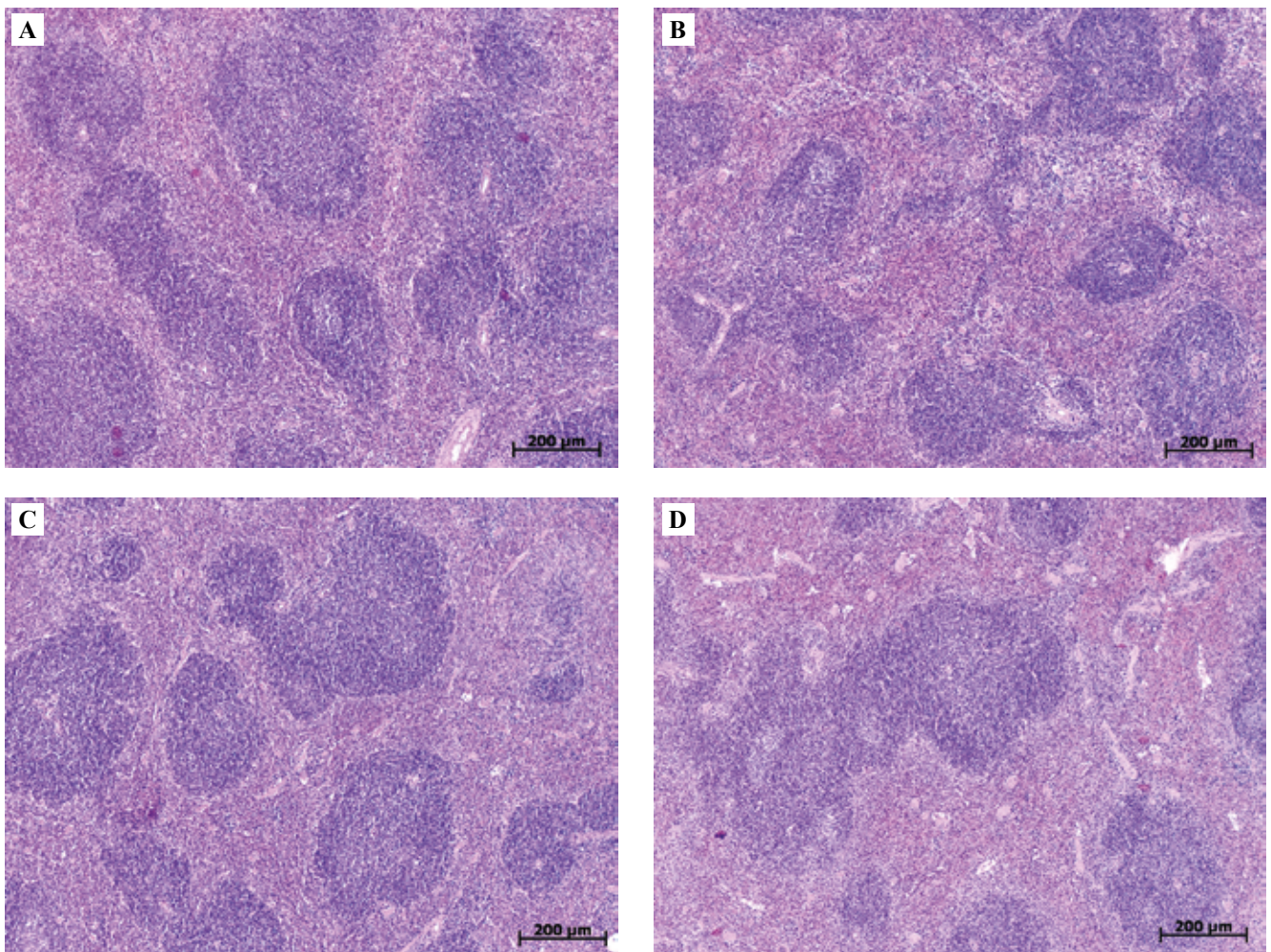


Рис. 1. Селезенка мышей контрольной группы (А) и потреблявших микропластик в дозах 0,023 (В), 0,23 (С) и 2,3 (D) мг/кг/сут. Окраска гематоксилином и эозином, масштабный отрезок 200 мкм

Fig. 1. Spleens of mice from the control group (A) and those having consumed microplastics at doses of 0.023 (B), 0.23 (C), and 2.3 mg/kg/day (D). H&E stain, scale bar 200 µm

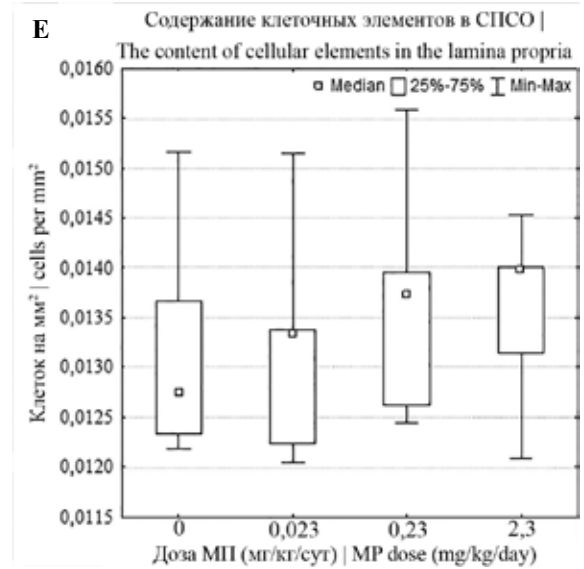
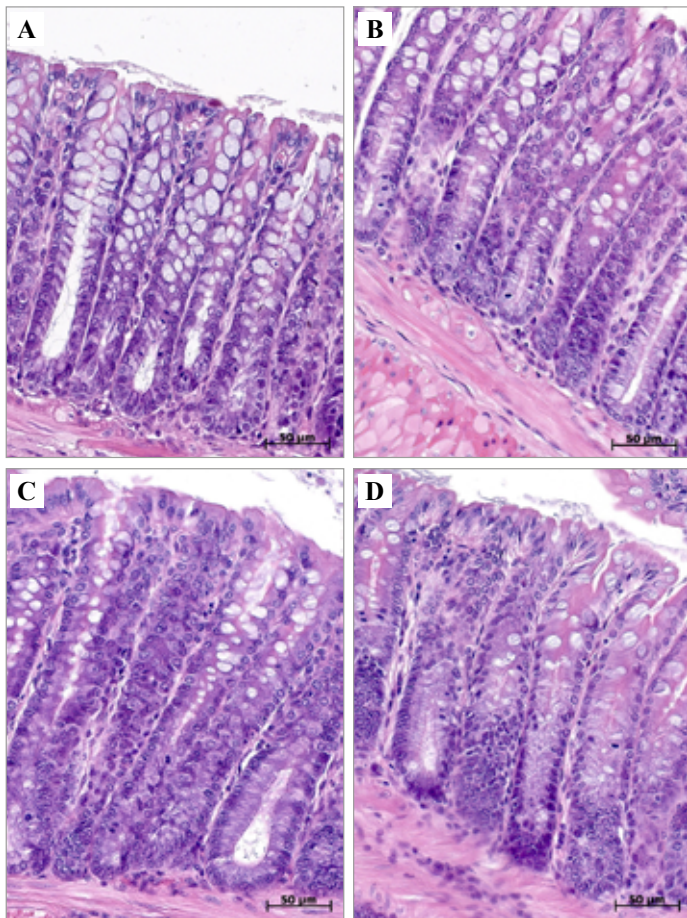


Рис. 2. Слизистая оболочка дистального отдела ободочной кишки мышей контрольной группы (А) и потреблявших микропластик в дозах 0,023 (В), 0,23 (С) и 2,3 (D) мг/кг/сут. Окраска гематоксилином и эозином, масштабный отрезок 50 мкм. Е – содержание клеточных элементов в СПСО ободочной кишки

Fig. 2. The mucosa of the distal colon of mice from the control group (A) and those having consumed microplastics (MP) at doses of 0.023 (B), 0.23 (C), and 2.3 (D) mg/kg/day. H&E stain, scale bar 50 µm. E – the content of cellular elements in the lamina propria of the colon

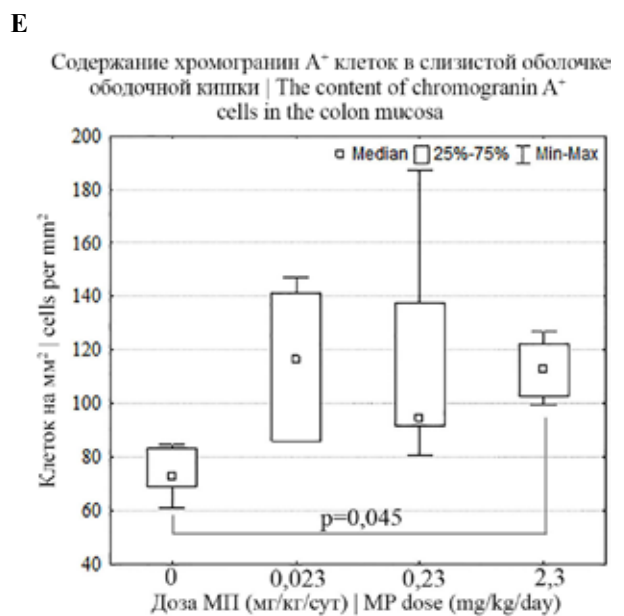
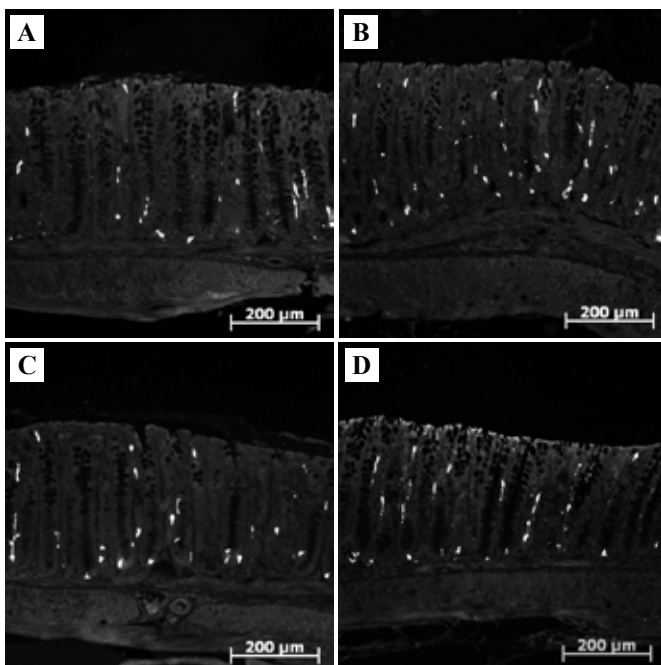


Рис. 3. Эндокринные клетки в дистальном отделе ободочной кишки мышей контрольной группы (А) и потреблявших микропластик в дозах 0,023 (В), 0,23 (С) и 2,3 (D) мг/кг/сут. Иммунофлуоресцентное окрашивание с антителами к хромогранину А, масштабный отрезок 200 мкм. Е – содержание хромогранин А-положительных клеток в слизистой оболочке ободочной кишки

Fig. 3. Endocrine cells in the distal colon of mice from the control group (A) and those having consumed microplastics (MP) at doses of 0.023 (B), 0.23 (C), and 2.3 (D) mg/kg/day. Immunofluorescent staining with chromogranin A antibodies, scale bar 200 µm. E – the content of chromogranin A-positive cells in the colon mucosa

муцинов между исследуемыми группами не различалось. Тем не менее по сравнению с контролем в группе мышей, потреблявших МП в дозе 2,3 мг/кг/сут, мы

наблюдали сдвиг соотношения нейтральных и высокосульфатированных муцинов в сторону нейтральных (рис. 4, 5).

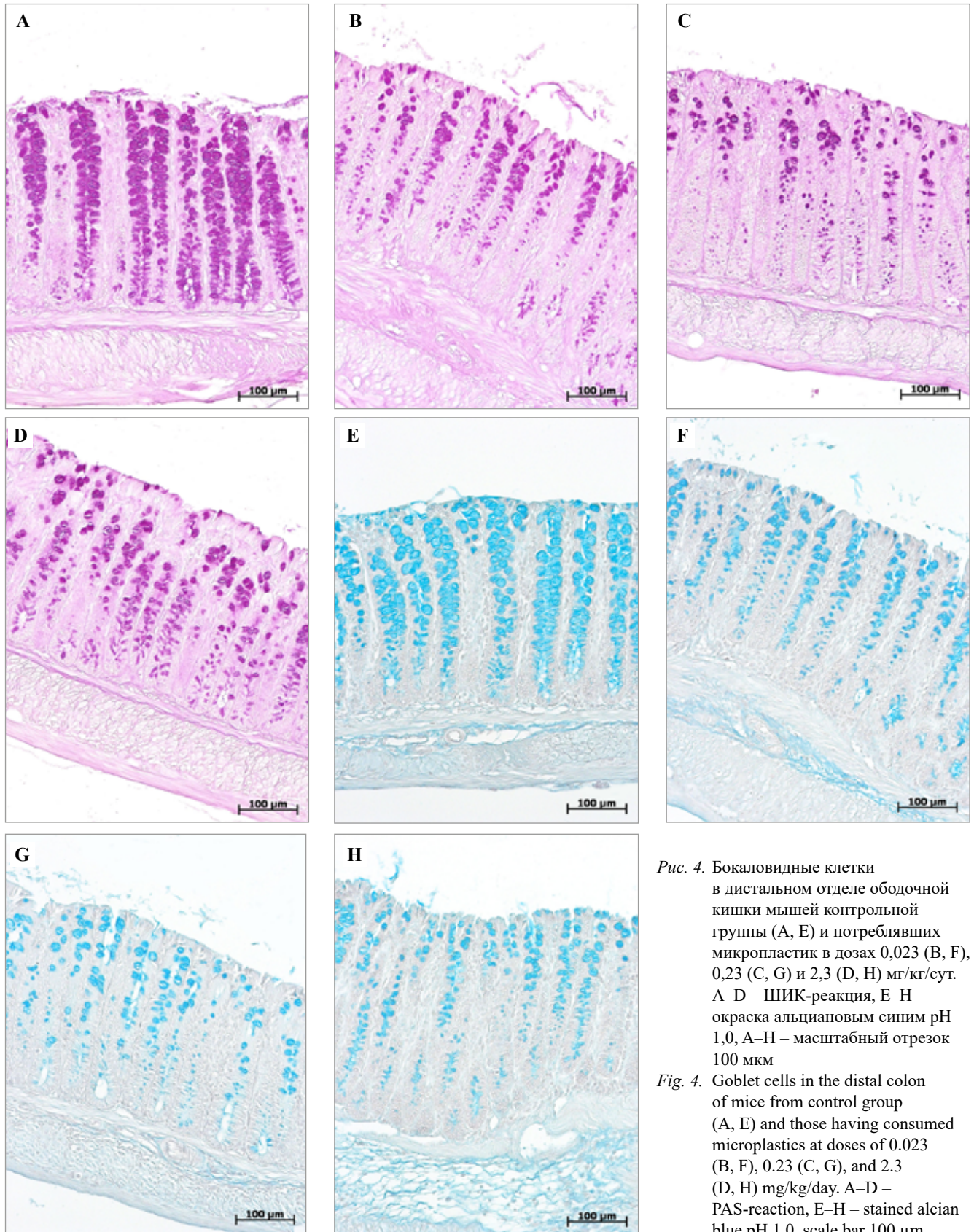


Рис. 4. Бокаловидные клетки в дистальном отделе ободочной кишки мышей контрольной группы (А, Е) и потреблявших микропластик в дозах 0,023 (В, F), 0,23 (С, G) и 2,3 (D, H) мг/кг/сут. А–D – ШИК-реакция, Е–H – окраска альциановым синим рН 1,0, А–H – масштабный отрезок 100 мкм

Fig. 4. Goblet cells in the distal colon of mice from control group (A, E) and those having consumed microplastics at doses of 0.023 (B, F), 0.23 (C, G), and 2.3 (D, H) mg/kg/day. A–D – PAS-reaction, E–H – stained alcian blue pH 1.0, scale bar 100 µm

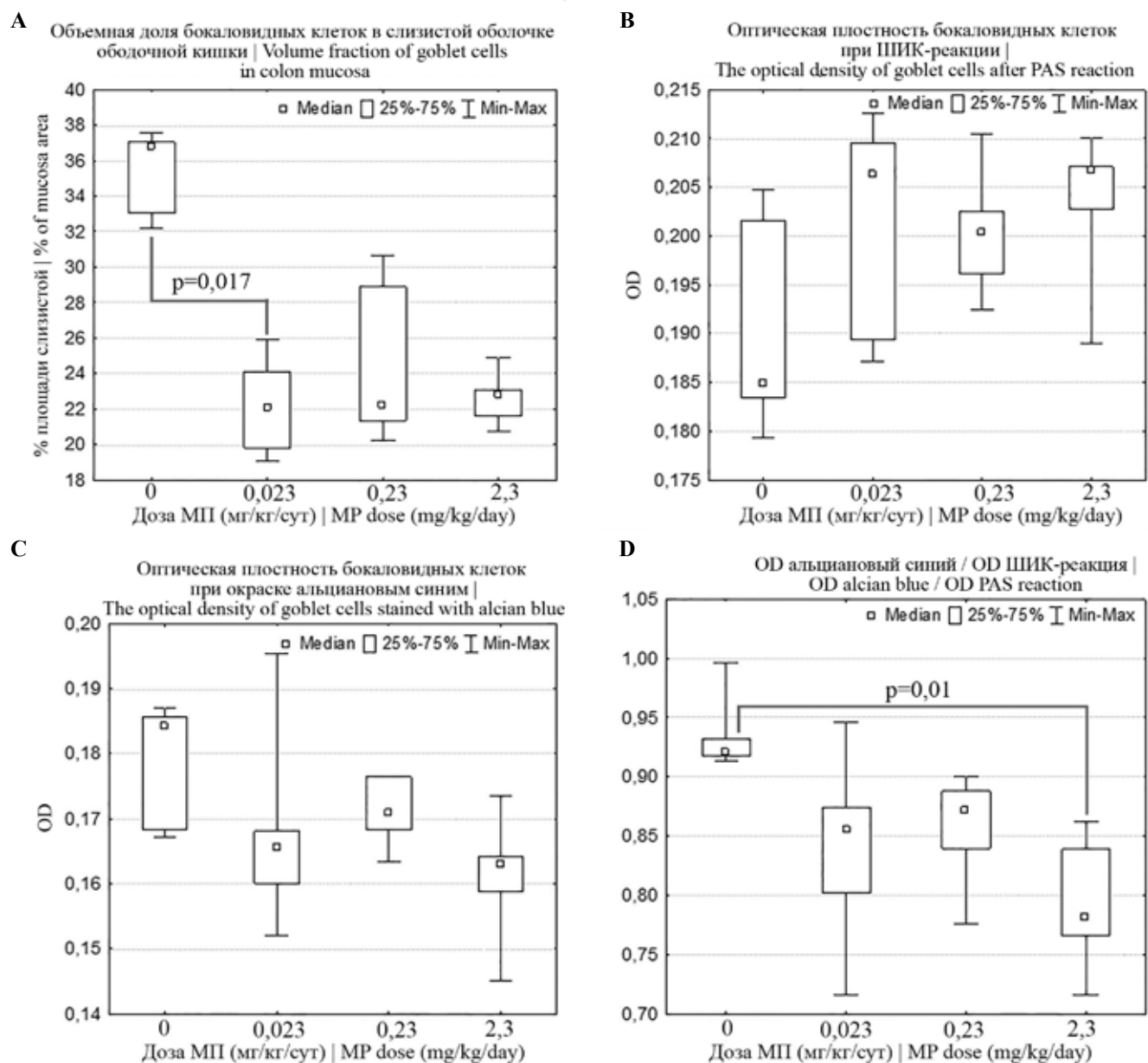


Рис. 5. Изменения параметров бокаловидных клеток дистального отдела ободочной кишки при потреблении разных доз микропластика.

А – объемная доля бокаловидных клеток, В – оптическая плотность бокаловидных клеток при ШИК-реакции, С – оптическая плотность бокаловидных клеток при окраске альциановым синим pH 1,0, Д – отношение оптической плотности бокаловидных клеток при окраске альциановым синим к оптической плотности при ШИК-реакции. OD – оптическая плотность

Fig. 5. Changes in the parameters of goblet cells in the distal colon after consuming different doses of microplastics.

А – the volume fraction of goblet cells, В – the optical density of goblet cells in the PAS reaction, С – the optical density of goblet cells in alcian blue staining pH 1.0, Д – the ratio of the optical density of goblet cells after alcian blue staining to the optical density after PAS-reaction. OD – optical density

Обсуждение

В связи с тем, что животные получали МП перорально с питьевой водой, первой мишенью воздействия были органы желудочно-кишечного тракта. В ободочной кишке у самцов мышей C57BL/6 при воздействии МП полистирола диаметром 5 мкм в дозах 0,023, 0,23 и 2,3 мг/кг/сут в течение 4 недель на качественном

уровне мы отмечаем снижение числа и гипертрофию бокаловидных клеток, что указывает на гиперсекрецию и истощение запасов муцина. Бокаловидные клетки секретируют слизь, которая покрывает поверхность слизистой оболочки, способствует продвижению химуса, участвует в процессах пристеночного пищеварения, а также является первой линией защиты организма

от эндогенных и экзогенных раздражителей, препятствует адгезии и инвазии микроорганизмов. Основным структурным компонентом слизи является высокогликозилированный белок – муцин Muc2. Концевые углеводные группы в молекуле муцина могут быть нейтральными – не модифицированными ($-\text{CH}_2\text{OH}$) либо кислыми – модифицированными остатками серной ($-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$) или сиаловых кислот. Нейтральные концевые группы выявляются с помощью ШИК-реакции, кислые – с помощью катионного красителя альцианового синего (при pH 1,0 он окрашивает сульфогруппы) [6]. При количественной оценке во всех опытных группах мы наблюдали выраженную тенденцию к снижению объемной доли бокаловидных клеток, однако статистической значимости различия достигали только в группе, получавшей пластик в наименьшей дозе – 0,023 мг/кг/сут. В разных работах значительно варьируют линии, пол животных, типы пластика, размеры частиц, дозы и сроки воздействия, что затрудняет сопоставление полученных нами данных с данными литературы. L. Lu et al. показали, что у самцов мышей ICR при потреблении микрочастиц полистирола диаметром 0,5 и 50 мкм в дозах 0,024 и 0,24 мг/кг/сут в течение 5 недель при окраске АВ-PAS (окраска альциановым синим, совмещенная с ШИК-реакцией) снижаются объемная доля бокаловидных клеток и яркость их окрашивания, но экспрессия мРНК Muc2 статистически значимо не изменяется, что указывает на гиперсекрецию слизи [7]. H. Sun et al. показали, что у самок мышей, потреблявших микрочастицы полиэтилена диаметром 1–10 мкм в дозе 0,2 мг/кг/сут в течение 30 дней, по данным окрашивания АВ-PAS значительно снижалась плотность муцина в толстой кишке, однако экспрессия мРНК Muc2 имела тенденцию к увеличению, что также указывает на повышение секреции слизи [8]. В исследовании Y. Jin et al. у самцов мышей ICR, получавших частицы полистирола диаметром 5 мкм в дозах 0,024 и 0,24 мг/кг/день в течение 6 недель, статистически значимо снижалась объемная доля бокаловидных клеток, окрашенных АВ-PAS, и при большей дозе снижалась экспрессия мРНК муцина Muc2 [9]. В нашем эксперименте интенсивность окрашивания бокаловидных клеток альциановым синим и при ШИК-реакции между группами статистически значимо не различалась, однако наблюдалась тенденция к смещению соотношения нейтральных и высокосульфатированных муцинов в сторону нейтральных. Предполагается, что кислые муцины, особенно сульфатированные, лучше, чем нейтральные, защищают от бактериальной транслокации, так как меньше подвержены разрушению бактериальными гидролазами. Снижение доли высокосульфатированных муцинов отмечается у мышей при экспериментальном язвенном колите [6]. В литературе данных о соотношении кислых и нейтральных муцинов в кишечнике под воздействием МП нет. Очевидно, повышение секреции слизи бокаловидными клетками является защитной реакцией, направленной на усиление

функции слизистого барьера и элиминацию микрочастиц из кишечника.

Эндокринные клетки составляют около 1% всех эпителиальных клеток кишечника, продуцируют гормоны и биологически активные вещества, регулирующие функции желудочно-кишечного тракта. В толстой кишке у мышей около 50% эндокринных клеток представлено ЕС-клетками, продуцирующими серотонин [10]. Серотонин стимулирует секрецию слизи бокаловидными клетками, выделение пищеварительных ферментов, подавляет образование соляной кислоты в желудке, тормозит всасывание воды и электролитов в кишечнике, усиливает его моторику. В секреторных гранулах ЕС-клеток вместе с серотонином накапливается небольшой кислый гликопротеин хромогранин А, являющийся маркером большинства клеток диффузной эндокринной системы [6]. Мы наблюдали увеличение содержания хромогранин А-положительных клеток у мышей, потреблявших МП в дозе 2,3 мг/кг/сут. Вероятно, повышение числа эндокринных клеток приводит к увеличению продукции серотонина, стимулирующего секрецию бокаловидных клеток, что вызвало наблюдаемое нами снижение объемной доли бокаловидных клеток. Данные литературы о влиянии МП на эндокринные клетки кишки отсутствуют.

Важную роль в барьерной функции играет локальная иммунная система. В соединительной ткани слизистой оболочки кишечника рассеяно множество иммунных клеток: лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, тучные клетки, эозинофилы, осуществляющие иммунный надзор над содержимым кишечника и препятствующие транслокации патогенов во внутреннюю среду организма. Кроме того, эпителиальные клетки кишечника несут ряд рецепторов к патогенассоциированным микробным паттернам и могут участвовать в регуляции иммунных реакций. При попадании в кишечник патогенных микроорганизмов, токсических веществ и нарушении целостности эпителиальной выстилки наблюдается выраженная воспалительная инфильтрация СПСО [6]. Мы не выявили увеличения содержания клеточных элементов в СПСО ободочной кишки у мышей, потреблявших МП. H. Sun et al. также не выявили воспалительных изменений в толстой кишке у самок мышей, потреблявших микрочастицы полиэтилена диаметром 1–10 мкм в дозе 0,2 мг/кг/сут в течение 30 дней [8]. Тем не менее в работах D.J. Rawle et al. и Y.J. Choi et al. в толстой кишке выявлено повышение экспрессии генов провоспалительных сигнальных путей у самок мышей C57BL/6J, получавших в течение 4 недель микрочастицы полистирола диаметром 1 мкм в дозе 0,08 мг/кг/сут, и у мышей ICR, получавших частицы полистирола диаметром 0,5 мкм в течение 2 недель в дозах 0,2, 1 и 2 мг/кг/сут [11, 12].

Помимо реакции со стороны толстой кишки мы наблюдали активацию морфофункциональных зон селезенки, что, возможно, связано с повышением

проницаемости эпителиального барьера толстой кишки, вызванного истощением запасов слизи, и повышением транслокации просветных антигенов. Вероятно, наличие реакции со стороны селезенки, но отсутствие со стороны слизистой оболочки ободочной кишки обусловлено тем, что в кишечнике поддерживается иммунная толерантность к компонентам пищи и комменсальным микроорганизмам [6]. J. Qiao et al. отмечают, что у самцов мышей C57/B6, потреблявших частицы полистирола диаметром 0,07 мкм и 5 мкм в дозе 2 мг/кг/сут в течение 4 недель, в селезенке повышается содержание цитотоксических Т-лимфоцитов [13]. E.J. Park et al. у самок мышей ICR, потреблявших микрочастицы полиэтилена размером 40–48 мкм в дозах 3,75, 15 и 60 мг/кг/сут в течение 13 недель, выявили изменения субпопуляционного состава лимфоцитов в селезенке, а на ультраструктурном уровне – повреждения органелл в клетках [14]. При этом S. Lee et al. не выявили изменений в селезенке у мышей ICR, получавших частицы полиэтилена размером 10–50 мкм в течение 28 дней в дозах 500, 1000 и 2000 мг/кг/сут [15].

Мы не выявили морфологических изменений в печени, почках, легких, тимусе, брыжеечных лимфатических узлах, головном мозге, сердце, мышце бедра и семенниках у самцов мышей C57BL/6 при воздействии МП полистирола диаметром 5 мкм в дозах 0,023, 0,23 и 2,3 мг/кг/сут в течение 4 недель. По данным L. Zhao et al., у самцов мышей C57BL/6J, которым на протяжении 4 недель ежедневно перорально вводили частицы полистирола диаметром 0,5 мкм в дозе 20 мг/кг/сут, увеличивалась абсолютная и относительная масса печени, в ней наблюдались воспалительная инфильтрация, увеличение числа лимфоцитов, макрофагов и экспрессии провоспалительных цитокинов, повышалось содержание АЛТ и АСТ в сыворотке крови [16]. H. Zheng et al. показали, что у самцов мышей C57, получавших микрочастицы полистирола диаметром 5 мкм в течение 4 недель в дозе 0,1 мг/кг/сут, наблюдались накопление жировых вакуолей в гепатоцитах и выраженные метаболические изменения печени [17]. При исследовании почек мышей, получавших частицы полистирола диаметром 0,05, 0,3, 0,6 или 4 мкм в дозе примерно 200 мг/кг/сут в течение 4 недель, X. Meng et al. выявили морфологические изменения, такие как некроз и десквамация эпителия прямых и извитых почечных канальцев, разрушение щеточной каемки, расширение почечных канальцев и заполнение их гиалиновыми цилиндрами, фиброз, увеличение числа макрофагов. Кроме того, наблюдалось значительное повышение содержания в гомогенате почки миелопероксидазы, что указывает на нейтрофильную инфильтрацию [18]. S. Lee et al. при пероральном введении частиц полиэтилена размером 10–50 мкм в течение 4 недель в дозах 500, 1000 и 2000 мг/кг/сут у самцов и самок мышей ICR выявили МП в легких, при морфологическом исследовании обнаружили гранулемы [15]. Изменений в тимусе в этой работе выявлено

не было [15]. D.J. Rawle et al. методом RNA-Seq обнаружили у самок мышей C57BL/6J, потреблявших 80 мкг/кг/сут частиц полистирола размером 1 мкм с питьевой водой в течение 33–41 дня, в брыжеечных лимфатических узлах признаки слабо выраженной воспалительной реакции и лейкоцитоза [11]. По данным C.W. Lee et al., при пероральном введении частиц полистирола диаметром 2 мкм два раза в неделю в течение 8 недель в дозе 16 мг/кг у самок мышей C57BL/6 МП выявлялся в головном мозге, наблюдались изменения экспрессии генов в нейронах и нейровоспаление в гиппокампе, нарушения обучения и памяти [19]. У самцов крыс Вистар, потреблявших частицы полистирола диаметром 0,5 мкм в дозе 5 мг/кг/сут в течение 90 дней, Z. Li et al. наблюдали интерстициальный отек и фиброз миокарда, ультраструктурные повреждения митохондрий кардиомиоцитов [20]. По результатам W. Shengchen et al., у самцов мышей C57BL/6, получавших с питьевой водой частицы полистирола диаметром 1–10 мкм или 50–100 мкм в дозе примерно 2,4 мг/кг/сут, морфологических изменений мышцы бедра не наблюдалось, но нарушалась ее регенерация после повреждения, вызванного инъекцией BaCl₂ [21]. Согласно ряду исследований, МП вызывает повреждения семенников. По данным X. Xie et al., пероральное введение частиц полистирола диаметром 5,0–5,9 мкм в дозах 0,4, 4 и 40 мг/кг/сут в течение 6 недель вызывает у мышей Balb/c снижение числа сперматогенных клеточек, количества сперматозоидов и концентрации тестостерона [22]. В. Hou et al. у мышей ICR, потреблявших частицы полистирола диаметром 5 мкм в дозах 0,024, 0,24 и 2 мг/кг/сут в течение 5 недель, наблюдали беспорядочное расположение сперматид в извитых семенных канальцах, снижение их количества, отслоение клеточек, уменьшение количества сперматозоидов в канальцах и увеличение числа апоптотических клеточек [23]. H. Jin et al. показали, что введение через желудочный зонд частиц полистирола размером 0,5, 4 и 10 мкм в течение 4 недель в дозе 40 мг/кг/сут у мышей BALB/C приводит к отслоению сперматогенных клеточек, их неупорядоченному расположению, появлению многоядерных гоноцитов в семявыносящих канальцах, снижению уровня тестостерона и значительному снижению подвижности сперматозоидов [24]. Противоречивость полученных нами данных и данных литературы об эффектах МП на внутренние органы, очевидно, обусловлена разными видами и линиями животных, размерами частиц и типами пластика, дозами и сроками воздействия.

Заключение

Патологические изменения в печени, почках, легких, тимусе, брыжеечных лимфатических узлах, головном мозге, сердце, семенниках и мышце бедра самцов мышей C57BL/6 при потреблении в течение 4 недель частиц полистирола диаметром 5 мкм в дозах 0,023, 0,23 и 2,3 мг/кг/сут не выявлены. При потреблении микропластика в дозе 2,3 мг/кг/сут выявлена антиген-

ная активация селезенки. В ободочной кишке наблюдается реакция секреторных клеток: увеличение числа эндокринных (2,3 мг/кг/сут) и снижение объемной доли бокаловидных клеток (0,023 мг/кг/сут). Мы предполагаем, что частицы микропластика механически раздражают слизистую, что вызывает повышение секреции эндокринными клетками серотонина, который стимулирует перистальтику кишки и секрецию слизи, а также замедляет всасывание воды из просвета, что в итоге приводит к гиперсекреции бокаловидных клеток, снижению их объемной доли, истощению запасов муцина и вымыванию слизи с микропластика из кишечника. Эти реакции являются адаптивными. Истощение запасов слизи, вероятно, приводит к повышению проницаемости эпителиального барьера толстой кишки. Локальный компартмент иммунной системы кишки поддерживает толерантность к просветным антигенам, но усиление их транспорта вызывает антигенную стимуляцию селезенки.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Н.А. Золотова, О.В. Макарова.

Сбор и обработка материала – Н.А. Золотова, Д.Ш. Джаллилова, И.С. Цветков, А.В. Сентябрева.

Написание текста – Н.А. Золотова.

Редактирование – О.В. Макарова.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – N.A. Zolotova, O.V. Makarova.

Collected the data and performed the analysis – N.A. Zolotova, D.Sh. Dzhaliylova, I.S. Tsvetkov, A.V. Sentyabreva.

Wrote the paper – N.A. Zolotova.

Edited the manuscript – O.V. Makarova.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. *Alabi OA, Ologbonjaye KI, Awosolu O, Alalade OE.* Public and environmental health effects of plastic wastes disposal: A review. *J Toxicol Risk Assess.* 2019;5:021. DOI: 10.23937/2572-4061.1510021.
2. *Zolotova N, Kosyreva A, Dzhaliylova D, Fokichev N, Makarova O.* Harmful effects of the microplastic pollution on animal health: A literature review. *PeerJ.* 2022;10:e13503. DOI: 10.7717/peerj.13503.
3. *Yong CQY, Valiyaveetil S, Tang BL.* Toxicity of microplastics and nanoplastics in mammalian systems. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(5):1509. DOI: 10.3390/ijerph17051509.
4. *Елясин П.А., Залавина С.В., Машак А.Н., Овсянко Е.В., Айдагулова С.В.* Иммуногистохимическое исследование эффектов тяжелых металлов на слизистую оболочку тонкой кишки крыс препубертатного возраста. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2021;10(4):45–52. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.45-52.
Elyasin PA, Zalavina SV, Mashak AN, Ovsyanko EV, Aidagulova SV. Immunohistochemical study the effects of heavy metals on the intestinal mucosa in prepubertal rats. *Clinical and experimental morphology.* 2021;10(4):45–52 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.45-52.
5. *Чумасов Е.И., Петрова Е.С., Самедов В.Б., Колос Е.А., Коржевский Д.Э.* Иммуногистохимические маркеры для исследования органов пищеварительной системы. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2022;11(4):70–84. DOI: 10.31088/CEM2022.11.4.70-84.
Chumasov EI, Petrova ES, Samedov VB, Kolos EA, Korzhevskii DE. Immunohistochemical markers to study the digestive organs. *Clinical and experimental morphology.* 2022;11(4):70–84 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2022.11.4.70-84.
6. *Золотова Н.А., Макарова О.В.* Эпителиальный барьер толстой кишки в норме и при язвенном колите. Москва: Группа МДВ, 2020. 112 с. Доступно по адресу: <https://istina.msu.ru/publications/book/521375693/> (получено 23.12.2022).
Zolotova NA, Makarova OV. The epithelial barrier of the colon in normal individuals and in those with ulcerative colitis. Moscow: MDV Group, 2020. 112 p. (In Russ.). Available from: <https://istina.msu.ru/publications/book/521375693/> (accessed 23.12.2022).
7. *Lu L, Wan Z, Luo T, Fu Z, Jin Y.* Polystyrene microplastics induce gut microbiota dysbiosis and hepatic lipid metabolism disorder in mice. *Sci Total Environ.* 2018;631–632:449–58. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.051.
8. *Sun H, Chen N, Yang X, Xia Y, Wu D.* Effects induced by polyethylene microplastics oral exposure on colon mucin release, inflammation, gut microflora composition and metabolism in mice. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021;220:112340. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112340.
9. *Jin Y, Lu L, Tu W, Luo T, Fu Z.* Impacts of polystyrene microplastic on the gut barrier, microbiota and metabolism of mice. *Sci Total Environ.* 2019;649:308–17. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.353.
10. *Billing LJ, Larraufie P, Lewis J, Leiter A, Li J, Lam B et al.* Single cell transcriptomic profiling of large intestinal enteroendocrine cells in mice – Identification of selective stimuli for insulin-like peptide-5 and glucagon-like peptide-1 co-expressing cells. *Mol Metab.* 2019;29:158–69. DOI: 10.1016/j.molmet.2019.09.001.
11. *Rawle DJ, Dumenil T, Tang B, Bishop CR, Yan K, Le TT et al.* Microplastic consumption induces inflammatory signatures in the colon and prolongs a viral arthritis. *Sci Total Environ.* 2022;809:152212. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.152212.
12. *Choi YJ, Kim JE, Lee SJ, Gong JE, Jin YJ, Seo S et al.* Inflammatory response in the mid colon of ICR mice treated with polystyrene microplastics for two weeks. *Lab Anim Res.* 2021;37(1):31. DOI: 10.1186/s42826-021-00109-w.
13. *Qiao J, Chen R, Wang M, Bai R, Cui X, Liu Y et al.* Perturbation of gut microbiota plays an important role in micro/nanoplastics-induced gut barrier dysfunction. *Nanoscale.* 2021;13(19):8806–16. DOI: 10.1039/d1nr00038a.
14. *Park EJ, Han JS, Park EJ, Seong E, Lee GH, Kim DW et al.* Repeated-oral dose toxicity of polyethylene microplastics and the possible implications on reproduction and development of the next generation. *Toxicol Lett.* 2020;324:75–85. DOI: 10.1016/j.toxlet.2020.01.008.
15. *Lee S, Kang KK, Sung SE, Choi JH, Sung M, Seong KY et al.* Toxicity study and quantitative evaluation of polyethylene

- microplastics in ICR mice. *Polymers (Basel)*. 2022;14(3):402. DOI: 10.3390/polym14030402.
16. Zhao L, Shi W, Hu F, Song X, Cheng Z, Zhou J. Prolonged oral ingestion of microplastics induced inflammation in the liver tissues of C57BL/6J mice through polarization of macrophages and increased infiltration of natural killer cells. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2021;227:112882. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112882.
 17. Zheng H, Wang J, Wei X, Chang L, Liu S. Proinflammatory properties and lipid disturbance of polystyrene microplastics in the livers of mice with acute colitis. *Sci Total Environ*. 2021;750:143085. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.143085.
 18. Meng X, Zhang J, Wang W, Gonzalez-Gil G, Vrouwenvelder JS, Li Z. Effects of nano- and microplastics on kidney: Physicochemical properties, bioaccumulation, oxidative stress and immunoreaction. *Chemosphere*. 2022;288(Pt 3):132631. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.132631.
 19. Lee CW, Hsu LF, Wu IL, Wang YL, Chen WC, Liu YJ et al. Exposure to polystyrene microplastics impairs hippocampus-dependent learning and memory in mice. *J Hazard Mater*. 2022;430:128431. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.128431.
 20. Li Z, Zhu S, Liu Q, Wei J, Jin Y, Wang X et al. Polystyrene microplastics cause cardiac fibrosis by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway and promoting cardiomyocyte apoptosis in rats. *Environ Pollut*. 2020;265(Pt A):115025. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.115025.
 21. Shengchen W, Jing L, Yujie Y, Yue W, Shiwen X. Polystyrene microplastics-induced ROS overproduction disrupts the skeletal muscle regeneration by converting myoblasts into adipocytes. *J Hazard Mater*. 2021;417:125962. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.125962.
 22. Xie X, Deng T, Duan J, Xie J, Yuan J, Chen M. Exposure to polystyrene microplastics causes reproductive toxicity through oxidative stress and activation of the p38 MAPK signaling pathway. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2020;190:110133. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.110133.
 23. Hou B, Wang F, Liu T, Wang Z. Reproductive toxicity of polystyrene microplastics: In vivo experimental study on testicular toxicity in mice. *J Hazard Mater*. 2021;405:124028. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124028.
 24. Jin H, Ma T, Sha X, Liu Z, Zhou Y, Meng X et al. Polystyrene microplastics induced male reproductive toxicity in mice. *J Hazard Mater*. 2021;401:123430. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.123430.

Информация об авторах

Наталья Александровна Золотова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Джулия Шавкатовна Джалилова – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Иван Сергеевич Цветков – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Александра Владиславовна Сентябрева – младший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Ольга Васильевна Макарова – доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Author information

Natalya A. Zolotova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0002-0119-9889>

Dzhuliya Sh. Dzhaliylova – Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0002-1337-7160>

Ivan S. Tsvetkov – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0003-0946-1105>

Alexandra V. Sentyabreva – Junior Researcher, Laboratory of Neuromorphology, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0001-5064-219x>

Olga V. Makarova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky National Research Centre of Surgery”.
<https://orcid.org/0000-0001-8581-107X>