

Читать
онлайн
Read
onlineКудояров Э.Р., Каримов Д.О., Гизатуллина А.А., Каримов Д.Д., Байгильдин С.С.,
Якупова Т.Г.

Оценка потенцирующего действия микрочастиц полистирола на токсичность акриламида и этанола в условиях комбинированной обработки культуры клеток гепатоцитов мыши МН-22а

ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 450106, Уфа, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Микропластики полимерных соединений распространены в окружающей среде. Одним из часто встречающихся видов микропластика являются частицы полистирола. Наиболее интересным предметом исследования представляется оценка потенцирующих свойств микропластика на проявления токсичности распространённых веществ, поступающих в организм алиментарным путём, прежде всего акриламида и этанола.

Материалы и методы. Экспериментальная работа выполнена на клеточной культуре гепатоцитов мыши МН-22а с соблюдением принципов работ с культурами клеток млекопитающих. Для исследования жизнеспособности клеток по дыхательной активности применялся МТТ-тест. Статистический анализ выполнен в программе SPSS Statistics 21.

Результаты. В статье представлены результаты экспериментального исследования дыхательной активности клеток при комбинированной обработке микропластиками полистирола размером 300 нм в концентрации 0,025% с акриламидом и этанолом. Приведены данные предварительного эксперимента для обоснования выбранной концентрации исследуемого микропластика, демонстрирующие его низкую острую цитотоксичность. Рассчитанные значения IC50 по выживаемости клеток для акриламида и для этанола при одиночном воздействии и при комбинированном воздействии с микропластиками полистирола в течение 24 ч имели незначимые различия.

Ограничения исследования. Исследование выполнено на клеточной культуре гепатоцитов мыши МН-22а (монослой), культивированных в соответствии с требованиями паспорта культуры и обработанных микропластиками полистирола размером 300 нм и их смесями с акриламидом и этанолом в течение 24 ч в микроплашетном формате, что обусловлено возможностями используемой методики исследования.

Заключение. Сравнительный анализ выживаемости при воздействии токсичных веществ без добавления и в присутствии микропластика выявил отсутствие значимых различий между группами клеток, что на данный момент не позволило обнаружить потенцирующее действие микропластиков полистирола размером 300 нм на токсичность акриламида и этанола в условиях 24-часовой комбинированной обработки.

Ключевые слова: микропластик; полистиролы; акриламид; этанол; токсическое действие; культура клеток

Соблюдение этических стандартов. Исследование выполнено в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123), директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/EC от 22.09.2010 г. о защите животных, используемых для научных целей, и требованиями биоэтической комиссии ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека» (протокол № 01-02 от 08.02.2024 г.).

Для цитирования: Кудояров Э.Р., Каримов Д.О., Гизатуллина А.А., Каримов Д.Д., Байгильдин С.С., Якупова Т.Г. Оценка потенцирующего действия микропластиков полистирола на токсичность акриламида и этанола в условиях комбинированной обработки культуры клеток гепатоцитов мыши МН-22а. *Гигиена и санитария*. 2024; 103(7): 737–743. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2024-103-7-737-743> <https://elibrary.ru/dyicarp>

Для корреспонденции: Кудояров Эльдар Ренатович, мл. науч. сотр. отд. токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных исследований, ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека» Роспотребнадзора, 450106, Уфа. E-mail: e.kudoyarov@yandex.ru

Участие авторов: Кудояров Э.Р. – написание текста, сбор и обработка материала; Каримов Д.О. – концепция и дизайн исследования; Гизатуллина А.А. – сбор и обработка материала; Каримов Д.Д. – редактирование; Байгильдин С.С. – сбор и обработка материала; Якупова Т.Г. – сбор и обработка материала. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила: 27.07.2023 / Поступила после доработки: 16.05.2024 / Принята к печати: 19.06.2024 / Опубликована: 31.07.2024

Eldar R. Kudoyarov, Denis O. Karimov, Alina A. Gizatullina, Denis D. Karimov,
Samat S. Baygildin, Tatyana G. Yakupova

Evaluation of the potentiating effect of polystyrene microparticles on the toxicity of acrylamide and ethanol under conditions of combined treatment of mouse hepatocyte cell culture MH-22a

Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology of the Federal Service for Supervision in Protection of the Rights of Consumer and Man Wellbeing, Ufa, 450106, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. Microparticles of polymer compounds are common in the environment. polystyrene particles are the most common types of microplastics. The most interesting subject of the study is the assessment of the potentiating properties of microplastics on the manifestations of toxicity of common substances entering the body by alimentary means, primarily such as acrylamide and ethanol.

Materials and methods. The experimental work was performed on a cell culture of mouse MH-22a hepatocytes in compliance with the principles of working with mammalian cell cultures. An MTT test was used to study cell viability by respiratory activity. The statistical analysis was performed in the SPSS Statistics 21 software.

Results. The article presents the results of an experimental study of the respiratory activity of cells under combined treatment with 300 nm polystyrene microparticles at a concentration of 0.025% with acrylamide and ethanol. Preliminary experimental data is presented to substantiate the selected concentration of the microplastic under study, demonstrating its low acute cytotoxicity. The calculated IC50 values for cell survival for acrylamide and ethanol under single exposure and combined exposure with polystyrene microparticles for 24 hours had insignificant differences.

Limitations. The study was performed on a cell culture of mouse MH-22a hepatocytes (monolayer) cultured in accordance with the requirements of the culture passport and treated with 300 nm polystyrene microparticles and their mixtures with acrylamide and ethanol only for 24 hours in microplate format.

Conclusion. A comparative analysis of survival values when exposed to toxic substances without addition and in the presence of microplastics revealed no significant differences between cell groups, which at the moment did not allow detecting the potentiating effect of polystyrene microparticles with a size of 300 nm on the toxicity of acrylamide and ethanol under 24-hour combined treatment.

Keywords: microplastics; polystyrenes; acrylamide; ethanol; cell culture; toxic actions

Compliance with ethical standards. The study was carried out in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS No. 123), Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes and the requirements of the Bioethical Commission of the Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology” (protocol No. 01-02 of 08.02.2024).

For citation: Kudoyarov E.R., Karimov D.O., Gizatullina A.A., Karimov D.D., Baygildin S.S., Yakupova T. G. Evaluation of the potentiating effect of polystyrene microparticles on the toxicity of acrylamide and ethanol under conditions of combined treatment of mouse hepatocyte cell culture MH-22a. *Gigiena i Sanitariya / Hygiene and Sanitation, Russian journal.* 2024; 103(7): 737–743. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2024-103-7-737-743> <https://elibrary.ru/dyicap> (In Russ.)

For correspondence: Eldar R. Kudoyarov, junior researcher, Dept. of toxicology and genetics with an experimental laboratory animal clinic of the Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology of the Federal Service for Supervision in Protection of the Rights of Consumer and Man Wellbeing, Ufa, 450106, Russian Federation. E-mail: e.kudoyarov@yandex.ru

Contribution: Kudoyarov E.R. – writing text, collection and processing of material; Karimov D.O. – concept and design of the study; Gizatullina A.A. – collection and processing of material; Karimov D.D. – editing; Baygildin S.S. – collection and processing of material; Yakupova T.G. – collection and processing of material. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. The study had no sponsorship.

Received: July 27, 2024 / Revised: May 25, 2024 / Accepted: June 19, 2024 / Published: July 31, 2024

Введение

Изготовление, активное использование и неконтролируемое разрушение деталей механизмов, предметов быта, лакокрасочных покрытий, резин и пластмасс из органических полимерных материалов (полиэтилен, полипропилен, полиэтилентерефталат, полистирол и др.) приводят к образованию и накоплению в природе пластиковых частиц различного размера от макро- до наномасштабов [1–3]. В совокупности все пластиковые частицы от 0,0001 до 5 мм в поперечном размере именуют микропластиком, а размером менее 0,0001 мм (100 нм) – нанопластиком [4]. Некоторым авторам удалось рассчитать, что поступление частиц пластика с пищей в организм человека составляет в среднем около 5 г в неделю независимо от региона [5] и происходит при употреблении морской соли [8–10], питьевой воды [11, 12], морских животных [6, 7]. Микропластик был обнаружен и в пище растительного происхождения (фрукты, овощи, рис) [13, 14].

Намного раньше в Германии было обнаружено присутствие микропластика в большинстве видов минеральной воды, расфасованной в пластиковые бутылки [15]. Экспериментальная проверка обнаруженных микрочастиц выявила наличие у них эстрогенной активности и канцерогенных свойств *in vivo*, обусловленных химическим составом (полиэтилентерефталат). Позднее в водопроводной воде было обнаружено более 20 органических соединений, поступивших из стенок пластиковых трубопроводов, что требует дополнительных исследований риска для здоровья при использовании полимерных материалов в водоснабжении [16].

Частицы пластиков, проходящие через желудочно-кишечный тракт, могут приводить к нарушению микробиома кишечника и запускать в организме образование свободных радикалов [17]. Описано несколько молекулярных механизмов, облегчающих поглощение тканями пластиковых частиц, которые затем участвуют в местных процессах, вызывая воспалительные и иммунные реакции [18]. Ранее было установлено, что частицы полистирола проявляют свойства иммуностимуляторов, индуцируют продукцию цитокинов и хемокинов в зависимости от размера и концентрации [19]. Кроме того, частицы микропластика могут действовать как потенциальные переносчики загрязняющих веществ и хемосенсибилизаторы токсических веществ («эффект троянского

коня») [17]. Кумулятивный эффект воздействия частиц микропластика на клеточные мембраны может сокращать продолжительность жизни клеток в организме [20]. Транспорт частиц размером менее 700 нм через клеточную мембрану внутрь клеток происходит через рецептор-опосредованный эндоцитоз [19, 21], тогда как более крупные частицы могут поглощаться посредством фагоцитоза [22, 23]. Известно, что наночастицы полистирола, меченные красителем FITC с длиной волны 460 нм, после проникновения в клетку накапливаются в цитоплазме [19].

Цель исследования – оценить потенцирующие свойства микропластика на проявления токсичности часто встречающихся гидрофильных веществ, поступающих в организм алиментарным путём и воздействующих на печень. Такими веществами являются акриламид и этанол. Оба химических соединения могут поступать в организм человека через пищеварительный тракт и оказывать на органы и ткани токсическое действие, которое с различной степенью потенциально подвержено модулирующему влиянию со стороны поступающего в организм микропластика. В настоящей статье приводится анализ результатов эксперимента по оценке действия микропластика, потенцирующего токсичность акриламида и этанола на клеточной культуре МН-22а. Существование данной культуры поддерживается более 50 лет, она является постоянной клеточной линией, сохраняющей фенотип гепатоцитов мышей линии СЗНА [24–26]. Недавнее цитогеномное исследование культуры клеток продемонстрировало сходство генотипа и фенотипических особенностей с ранней гепатобластомой, наблюдаемой у детей в возрасте от 0 до 4 лет, что повышает ценность культуры МН-22а в качестве объекта токсикологических исследований в целом [27].

Материалы и методы

Для исследования был выбран коммерческий образец неокрашенных микрочастиц полистирола сферической формы с диаметром 300 нм, представленных в форме 2,5%-й суспензии в дистиллированной воде (кат. № YP1300, Yuan Biotech, КНР).

Для обнаружения цитотоксичных свойств микрочастиц пластика была использована культура гепатоцитов мыши МН-22а («БиолоТ», Россия). Культура клеток была выра-

шена в стерильной питательной среде Игла MEM с солями Хэнкса с глутамином («ПанЭко», Россия), содержащей 10% сыворотки крупного рогатого скота (Biosera, Франция) при температуре плюс 37 °С, влажности 99% и 5% CO₂. Обеспечение равновесия в буферной системе растворов с помощью инкубаторов NU-4950E (NuAire, США) и HF100 Tri-gas Incubator (Heal Force, КНР). Для подсчёта клеток при пассировании культуры использовался автоматический программируемый счётчик клеток LUNA-II (Logos Biosystems, Южная Корея). Наращивание культуры клеток проведено во флаконах культуральных (25 см²) (SPL Life Sciences, Южная Корея). Реактив МТТ – бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (ПанЭко, Россия) – был предварительно за 24 ч разведён в стерильном 0,9% растворе хлорида натрия до концентрации 5 мг/мл и стерилизован путём фильтрования через насадку на шприц с мембраной из полиэфирсульфона (размер пор 0,2 мкм) (Corning Incorporated, США). МТТ-тесты выполнены в планшетах стерильных 96-луночных с адгезивным покрытием для культивирования клеток на плоском дне из прозрачного пластика (Corning Incorporated, США). Плотность посева клеточной культуры для выполнения МТТ-теста составляла 30 000 клеток/луночку, что определяется размером лунки и тем, что этого количества клеток достаточно для максимального покрытия лунки в использованном типе 96-луночного планшета в один слой. В питательной среде с клетками концентрация МТТ составляла 0,5 мг/мл. По завершении инкубации с реактивом МТТ в течение трёх часов питательную среду заменяли на 100%-й диметилсульфоксид (PanReas AppliChem, Италия). Далее в мультимодальном планшетном ридере Feyond-A300 (Allsheng, КНР) производили инкубирование 96-луночного планшета при температуре плюс 37 °С в режиме орбитального перемешивания со скоростью Low в течение 60 мин и дальнейшее измерение оптической плотности образовавшихся растворов формазана в диметилсульфоксиде при длинах световых волн 530 и 620 нм. Нормализация полученных первичных данных реализована путём вычитания оптической плотности среды в лунках без клеток в соответствии с методикой СТП14.621.21.0008.12–2015*. По каждой группе были рассчитаны среднее арифметическое и стандартное отклонение. Для проверки статистической достоверности различий между группами по оптической плотности и выживаемости применяли критерии Краскела – Уоллиса и Манна – Уитни. Статистический анализ результатов выполнен в программе SPSS Statistics 21.

Результаты

Для оценки цитотоксичности были сформированы экспериментальные группы клеток (1, 2, 3, 4), затравленные суспензиями частиц микропластика по четыре концентрации в четырёх повторностях (табл. 1). Контрольную группу 5 представляют клетки, инкубированные в питательной среде без добавления микрочастиц полистирола.

Выживаемость в контрольной группе 5 принята за 100%. Выживаемость в экспериментальных группах вычислялась как отношение оптической плотности в каждой лунке к усреднённому значению оптической плотности в шести лунках контрольной группы 5 ($1,7037 \pm 0,2203$ о.е.), умноженное на 100% (рис. 1).

В результате статистической оценки различий в выживаемости между исследованными группами с использованием критерия Краскела – Уоллиса не было установлено значимых отличий ($H = 0,241$; $p = 0,993$). При повторном проведении описываемого эксперимента также не было обнаружено статистически значимых различий между группами 1–5 при аналогичном сравнении ($H = 2,018$; $p = 0,732$).

* СТП-14.621.21.0008.12–2015. Методика определения цитотоксичности веществ МТТ-тестом на культуре нормальных клеток человека НЕК293. Утв. дир. ИФАВ, член.-корр. РАН С.О. Бачуриным от 25.12.2015 г. Черноголовка, 2015. 13 с.

Таблица 1 / Table 1

Схема распределения клеток гепатомы мыши МН-22а по экспериментальным группам при затравке микрочастицами размером 300 нм (полистирол, 24 ч)

Scheme of distribution of mouse МН-22a hepatoma cells by experimental groups when seeded with microparticles of 300 nm (polystyrene, 24 hours)

Концентрация микропластика, % Concentration of microparticles, %	Количество лунок в группе, штук Number of holes in the group, pieces	Номер группы Group number
0.025	4	1
0.0025	4	2
0.00025	4	3
0.000025	4	4
0	6	5 (контрольная) 5 (control)

Одной из актуальных задач для достижения цели исследования является оценка потенцирующего действия микропластика полистирола при комбинированном воздействии с акриламидом. Для решения этой задачи был выбран ряд концентраций акриламида: 10^{-6} ; 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} ; 10^{-2} ; 10^{-1} ; 1 и 10 моль/л (табл. 2). В качестве групп сравнения выбраны клетки, инкубированные с теми же концентрациями акриламида без добавления микропластика. Выживаемость клеток оценивалась по отношению к интактным клеткам контрольной группы 9. В группе 10 (вода, 1 : 100) изучали, как влияет растворитель в суспензии микропластика (дистиллированная вода) на выживаемость клеток при добавлении в питательную среду в той же степени разведения, что и поступающий при затравке из суспензий микропластика полистирола (разведение 1 : 100).

Сравнение значений относительной выживаемости между группами 9 (контрольная) ($100,00 \pm 11,50\%$) и 10 (вода, 1 : 100) ($95,40 \pm 3,88\%$) не выявило статистически значимых различий (U -критерий Манна – Уитни = 3,000; $p = 0,700$).

Наименьшее число жизнеспособных клеток наблюдалось при концентрации акриламида 10 моль/л в группах 1А (без микропластика) и 1АР (с микропластиком): минус $1,30 \pm 0,11\%$ и минус $3,04 \pm 0,14\%$ соответственно. Отрицательные значения оптической плотности могут объясняться резким снижением рН среды в результате гибели культуры клеток при инкубировании с акриламидом в высоких концентрациях, что не отвергается при сравнении группы 1А с группой 9 и группы 1АР с группой 10 (U -критерий Манна – Уитни $< 0,001$; $p = 0,05$ и U -критерий Манна – Уитни $< 0,001$; $p = 0,05$ соответственно). Аналогичные различия

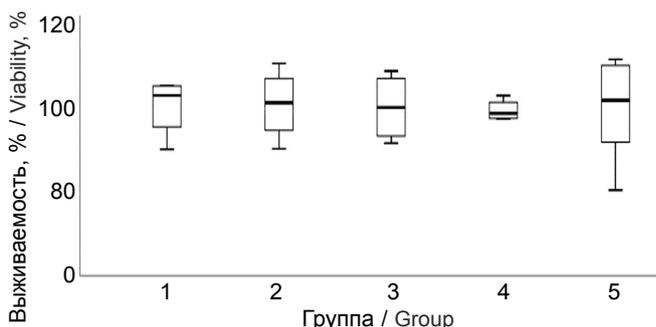


Рис. 1. Диаграмма выживаемости клеток после 24 ч инкубации с микрочастицами полистирола (300 нм), %. Номера групп приведены в соответствии с табл. 1.

Fig. 1. Diagram of cell survival after 24 h incubation with polystyrene microparticles (300 nm), %. The group numbers are given in accordance with Table 1.

Таблица 2 / Table 2

Схема распределения клеток гепатомы мыши МН-22а по экспериментальным группам при исследовании комбинированного влияния микрочастиц полистирола (300 нм) и акриламида

Scheme of distribution of mouse hepatoma МН-22а cells by experimental groups when studying the combined effect of polystyrene microparticles (300 nm) and acrylamide

Добавление микрочастиц полистирола в питательную среду Adding polystyrene microparticles to the nutrient medium	Концентрация акриламида, моль/л Concentration of acrylamide, mol/L	Количество лунок в группе, штук Number of holes in the group, pieces	Номер группы с суффиксом Group number with the suffix
Нет No	10.0	3	1А
	1.00	3	2А
	0.1	3	3А
	0.01	3	4А
	0.001	3	5А
	0.0001	3	6А
	0.00001	3	7А
	0.000001	3	8А
	0	3	9 (контрольная) 9 (control)
	0	3	10 (вода, 1 : 100) 10 (water, 1 : 100)
Да Yes	10.0	3	1АР
	1.00	3	2АР
	0.1	3	3АР
	0.01	3	4АР
	0.001	3	5АР
	0.0001	3	6АР
	0.00001	3	7АР
	0.000001	3	8АР

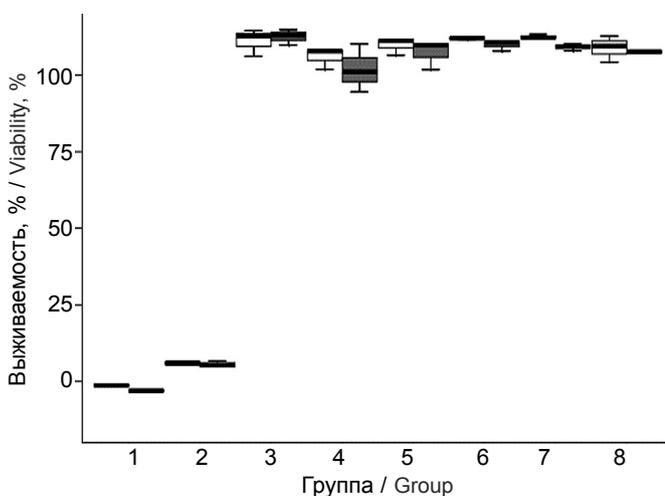


Рис. 2. Диаграмма распределения относительной выживаемости клеток по группам через 24 ч после комбинированной обработки клеток, %. Цветовое обозначение: белый (левые ящики кластеров) – обработка акриламидом (А); серый цвет (правые ящики кластеров) – обработка неокрашенными микрочастицами полистирола размером 300 нм (0,025%) и акриламидом (АР). Номера групп приведены в соответствии с табл. 2.

Fig. 2. Diagram of the distribution of relative cell survival by groups 24 hours after combined cell treatment, %. Colour designation: white (left boxes of clusters) – treatment with acrylamide (A); gray (right boxes of clusters) – treatment with unpainted polystyrene microparticles measuring 300 nm (0.025%) and acrylamide (AR). The group numbers are given in accordance with Table 2.

Таблица 3 / Table 3

Схема распределения клеток гепатомы мыши МН-22а по экспериментальным группам при исследовании комбинированного влияния микрочастиц полистирола (300 нм) и этанола

Scheme of distribution of mouse hepatoma МН-22а cells by experimental groups when studying the combined effect of polystyrene microparticles (300 nm) and ethanol

Добавление микрочастиц полистирола в питательную среду Adding polystyrene microparticles to the nutrient medium	Концентрация этанола, % Concentration of ethanol, %	Количество лунок в группе, штук Number of holes in the group, pieces	Номер группы с суффиксом Group number with the suffix
Нет No	40.00	3	1Е
	20.00	3	2Е
	10.00	3	3Е
	5.00	3	4Е
	2.50	3	5Е
	1.25	3	6Е
	0.625	3	7Е
	0.3125	3	8Е
	0	3	11 (контрольная) 11 (control)
	0	3	12 (вода, 1 : 100) 12 (water, 1 : 100)
Да Yes	40.00	3	1ЕР
	20.00	3	2ЕР
	10.00	3	3ЕР
	5.00	3	4ЕР
	2.50	3	5ЕР
	1.25	3	6ЕР
	0.625	3	7ЕР
	0.3125	3	8ЕР

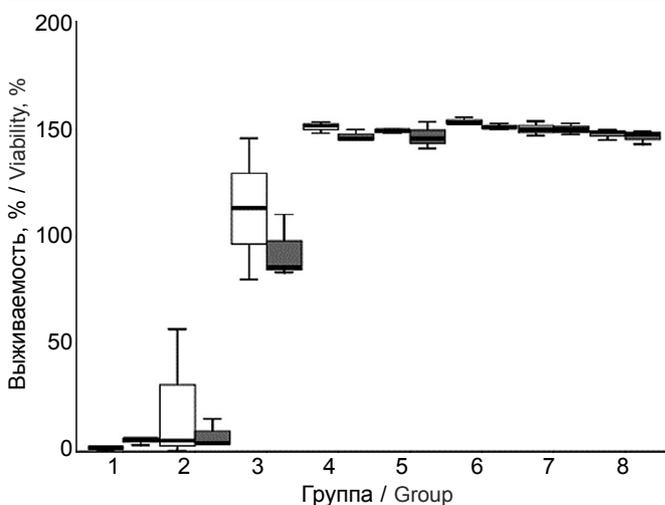


Рис. 3. Диаграмма распределения относительной выживаемости клеток по группам через 24 ч после комбинированной обработки клеток, %. Цветовое обозначение: белый (левые ящики кластеров) – обработка этанолом (Е); серый цвет (правые ящики кластеров) – обработка неокрашенными микрочастицами полистирола размером 300 нм (0,025%) и этанолом (ЕР). Номера групп приведены в соответствии с табл. 3.

Fig. 3. Diagram of the distribution of relative cell survival by groups 24 hours after combined cell treatment, %. Colour designation: white (left boxes of clusters) – ethanol treatment (E); gray (right boxes of clusters) – treatment with unpainted polystyrene microparticles measuring 300 nm (0.025%) and ethanol (EP). The group numbers are given in accordance with Table 3.

обнаружены между парами групп: 2А и 9 (U -критерий Манна – Уитни $< 0,001$; $p = 0,05$), 2АР и 10 (U -критерий Манна – Уитни $< 0,001$; $p = 0,05$).

Результаты исследований комбинированного влияния микропластици полистирола и акриламида и отдельно акриламида на относительную выживаемость клеток МН-22а через 24 ч после начала эксперимента представлены на рис. 2.

Сравнение с помощью критерия Манна – Уитни групп клеток, подвергшихся комбинированной обработке акриламидом в любой из испытываемых концентраций и микропластиками полистирола (0,025%), с группами после обработки только акриламидом в той же концентрации не выявило статистически значимых различий ($p > 0,05$). Снижение количества живых клеток на 50% (IC50) через 24 ч после начала эксперимента наблюдалось при рассчитанной концентрации акриламида 0,6830 моль/л без добавления микропластика и при концентрации акриламида 0,7157 моль/л (на 0,03 моль/л выше) после обработки микропластиком, что при отсутствии статистических различий между группами с одинаковыми номерами становится несущественным.

Для оценки потенцирующего действия неокрашенных микропластици полистирола (диаметр 300 нм, концентрация 0,025%) на цитотоксические свойства этанола выполнена экспериментальная обработка культуры клеток гепатомы мыши (табл. 3).

Число живых клеток в экспериментальных группах 1Е, 2Е, 1ЕР и 2ЕР при концентрациях этанола 20 и 40% независимо от добавления в лунки с культурой клеток микропластици полистирола не имеет статистически значимых отличий как от группы контроля, так и между парами групп с одинаковым номером и различающиеся суффиксом ($p > 0,05$). Также статистически значимых отличий по выживаемости клеток не обнаружено при сравнении с помощью критериев Краскела – Уоллиса и Манна – Уитни остальных экспериментальных групп (3–8), экспонированных к одинаковым концентрациям этанола и отличающихся лишь наличием микропластици полистирола в питательной среде ($p > 0,05$). Результаты комбинированной обработки клеток этанолом и микропластиком представлены на рис. 3.

Снижение количества живых клеток на 50% (IC50) через 24 ч после начала эксперимента наблюдалось при рассчитанной концентрации этанола 12,92% без добавления микропластика и при концентрации этанола 10,77% после обработки микропластиком, что на 2,15% меньше, но не является значимым.

Обсуждение

Для первичного поискового исследования был выбран образец коммерческих неокрашенных микропластици полистирола сферической формы с диаметром 300 нм, которые, по данным литературных источников, могут проникать внутрь клетки [19, 21]. При выполнении поставленной цели первостепенной задачей являлась оценка цитотоксичности выбранного вида и размера микропластика для установления максимальной нецитотоксичной концентрации при 24-часовом режиме обработки культуры клеток. Исследование выживаемости клеточных популяций в экспериментальных группах 1–4 относительно контрольной группы 5, представленных на диаграмме (см. рис. 1), демонстрирует низкую токсичность исследуемого микропластика по отношению к клеткам гепатомы мыши МН-22а в выбранных условиях. Таким образом, микропластици полистирола сферической формы с диаметром 300 нм в диапазоне концентраций 0,000025–0,025% не оказывают выраженного влияния на метаболическую активность и выживаемость гепатоцитов мыши при оценке с помощью МТТ-теста, что указывает на отсутствие свойств острой цитотоксичности у исследованных частиц, но не исключает наличие иной токсической активности, не исследованной в пилотных экспериментах.

В результате установления экспериментальным путём наибольшей нетоксичной концентрации, при которой вы-

живаемость культуры гепатоцитов МН-22а не отличается от контрольной группы (0,025%), стала возможной оценка потенцирующего воздействия микропластици полистирола с диаметром частиц 300 нм при комбинированном воздействии с распространёнными токсикантами (акриламид и этанол), поступающими в организм человека преимущественно алиментарным путём.

Отсутствие статистически значимых различий между относительной выживаемостью в группах 9 (контрольная) и 10 (вода в соотношении 1 : 100) указывает на то, что добавленный растворитель (вода дистиллированная) в составе коммерческой суспензии с микропластици полистирола не влияет на биологическое состояние культуры клеток, и фактом его добавления в лунки можно пренебречь при конечном разведении 1 : 100 и более в питательной среде.

По результатам анализа данных, полученных в ходе эксперимента с комбинированной обработкой клеток акриламидом и микропластиком, установлено, что в питательной среде микропластици полистирола сферической формы с диаметром 300 нм при концентрации 0,025% не воздействуют на профиль цитотоксичности акриламида в диапазоне концентраций от 10^{-6} до 10 моль/л по отношению к клеткам гепатомы мыши МН-22а. Это указывает на инертность испытываемого объекта и отсутствие наблюдаемых воздействий по отношению к метаболическим превращениям акриламида.

Этанол является распространённым компонентом в составе алкогольных напитков и лекарственных препаратов, что послужило выбором его в качестве интересующего нас вещества, на цитотоксичность которого может повлиять поступление микропластика в организм человека. Мы предполагаем, что вероятной причиной внутривнутригрупповых колебаний в численности живых клеток при концентрациях этанола более 20% может являться высокая летучесть паров этилового спирта и нестабильность его растворов в условиях эксперимента. При этом концентрации этанола 20 и 40% должны были быть выбраны для получения более полной информации о профиле токсического действия этанола на выбранной клеточной культуре. По результатам исследования потенцирующего эффекта от добавки микропластици полистирола в питательную среду к культурам клеток при обработке этанолом с диапазоном концентраций от 0,3125 до 40% не было обнаружено статистически значимых различий. Однако снижение показателя IC50 на 2,15% этанола в присутствии микропластици полистирола (300 нм) может выражать тенденцию к потенцирующему действию микропластика и является предпосылкой для продолжения экспериментального исследования при комбинированном воздействии с ксенобиотиками, имеющими более высокий класс опасности.

Ограничения исследования. Исследование выполнено на клеточной культуре гепатоцитов мыши МН-22а (монослой), культивированных в соответствии с требованиями паспорта культуры и обработанных микропластици полистирола размером 300 нм и их смесями с акриламидом и этанолом только в течение 24 ч в микропланшетном формате.

Заключение

На основании проведённого анализа источников литературы были выполнены поисковые экспериментальные исследования цитотоксичности неокрашенных микропластици полистирола на культуре клеток гепатомы мыши МН-22а. Результаты МТТ-теста показали низкую цитотоксичность неокрашенных микропластици полистирола с диаметром 300 нм при концентрациях 0,025; 0,0025; 0,00025 и 0,000025%, что не исключает необходимости анализа проявлений других токсических свойств, в том числе предполагаемых исследователями, как на клеточной культуре, так и с использованием лабораторных животных.

Основная серия поисковых экспериментов была посвящена изучению потенцирующего воздействия микропластици полистирола с диаметром 300 нм в наивысшей concentra-

ции (0,025%), нетоксичной для клеточной линии МН-22а, в комбинированных режимах обработки с акриламидом или с этанолом. При анализе результатов комбинированного способа заправки одного из видов микропластиков полистирола с часто встречающимися в пище токсикантами (акриламид, этанол) не обнаружено статистически значимого потенциру-

ющего воздействия выбранных микропластиков на проявления цитотоксичности акриламида и этанола при 24-часовом режиме обработки клеток, что может быть следствием низкой химической активности микропластика при высокой гидрофобности и, возможно, пространственным разобщением с метаболическими превращениями акриламида и этанола.

Литература

(п.п. 1, 4–15, 18–23, 27 см. References)

- Ефимова И.В., Чубаренко И.П. Фрагментация пластикового мусора в прибойной зоне моря: лабораторный эксперимент на примере пенополистирола. *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Науки о Земле*. 2018; 18(1): 10–3. <https://doi.org/10.18500/1819-7663-2018-18-1-10-13> <https://elibrary.ru/ypcdti>
- Горбунова Ю.А., Есюкова Е.Е. Выбросы макроводорослей и морских трав на российской части юго-восточного побережья Балтийского моря. *Известия КГТУ*. 2020; (59): 24–34. <https://doi.org/10.46845/1997-3071-2020-59-24-34> <https://elibrary.ru/dumkmh>
- Алексеева А.В., Савостикова О.Н. Методические подходы к повышению надежности оценки факторов риска здоровью при использовании полимерных материалов в системе питьевого водоснабжения. *Анализ риска здоровью*. 2022; (2): 38–47. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2022.2.04> <https://elibrary.ru/hsunmg>
- Гмошинский И.В., Шипелин В.А., Хотимченко С.А. Микропластики в пищевой продукции: происхождение, свойства и возможные риски. *Медицина труда и экология человека*. 2022; (2): 224–42. <https://doi.org/10.24412/2411-3794-2022-10216>
- Гельштейн В.И. Прогрессия перевиваемых мышинных гепатом. *Цитология*. 1971; (23): 3–14.
- Алексянц Ю.Т., Басмаджян М.Е., Мовсисян К.С., Манухян Л.А., Геворкян С.К. Линия перевиваемых клеток, полученная из перевиваемой мышинной гепатомы. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1972; (5): 94–5.
- Мамаева С.Е. *Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека*. М.: Научный мир; 2002.

References

- Unice K.M., Weeber M.P., Abramson M.M., Reid R.C.D., van Gils J.A.G., Markus A.A., et al. Characterizing export of land-based microplastics to the estuary – Part I: Application of integrated geospatial microplastic transport models to assess tire and road wear particles in the Seine watershed. *Sci. Total Environ.* 2019; 646: 1639–49. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.368>
- Efimova I.V., Chubarenko I.P. Fragmentation of plastic garbage in the surf zone of the sea: a laboratory experiment on the example of expanded polystyrene. *Izvestiya Saratovskogo universiteta. Novaya seriya. Seriya: Nauki o Zemle*. 2018; 18(1): 10–3. <https://doi.org/10.18500/1819-7663-2018-18-1-10-13> <https://elibrary.ru/ypcdti> (in Russian)
- Gorbutnova Yu.A., Esiyukova E.E. Emissions of macroalgae and seagrass in the Russian part of the south-east Baltic Sea coast. *Izvestiya KGTU*. 2020; (59): 24–34. <https://doi.org/10.46845/1997-3071-2020-59-24-34> <https://elibrary.ru/dumkmh> (in Russian)
- Wright S.L., Kelly F.J. Plastic and human health: a micro issue? *Environ. Sci. Technol.* 2017; 51(12): 6634–47. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00423>
- Senathirajah K., Attwood S., Bhagwat G., Carbery M., Wilson S., Palanisami T. Estimation of the mass of microplastics ingested – A pivotal first step towards human health risk assessment. *J. Hazard. Mater.* 2021; 404(Pt. B): 124004. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124004>
- Cho Y., Shim W.J., Jang M., Han G.M., Hong S.H. Abundance and characteristics of microplastics in market bivalves from South Korea. *Environ. Pollut.* 2019; 245: 1107–16. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.091>
- Van Cauwenbergh L., Janssen C.R. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environ. Pollut.* 2014; 193: 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.06.010>
- Karami A., Golieskardi A., Keong Choo C., Larat V., Galloway T.S., Salamatinia B. The presence of microplastics in commercial salts from different countries. *Sci. Rep.* 2017; 7: 46173. <https://doi.org/10.1038/srep46173>
- Kosuth M., Mason S.A., Wattenberg E.V. Anthropogenic contamination of tap water, beer, and sea salt. *PLoS One*. 2018; 13(4): e0194970. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194970>
- Yang D., Shi H., Li L., Li J., Jabeen K., Kolandhasamy P. Microplastic pollution in table salts from China. *Environ. Sci. Technol.* 2015; 49(22): 13622–7. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03163>
- Mason S.A., Welch V.G., Neratko J. Synthetic polymer contamination in bottled water. *Front. Chem.* 2018; 6: 407. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00407>
- Schymanski D., Goldbeck C., Humpf H.U., Fürst P. Analysis of microplastics in water by micro-Raman spectroscopy: Release of plastic particles from different packaging into mineral water. *Water Res.* 2018; 129: 154–62. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.011>
- Dessi C., Okoffo E.D., O'Brien J.W., Gallen M., Samanipour S., Kaserzon S., et al. Plastics contamination of store-bought rice. *J. Hazard. Mater.* 2021; 416: 125778. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125778>
- Oliveri Conti G., Ferrante M., Banni M., Favara C., Nicolosi I., Cristaldi A., et al. Micro- and nano-plastics in edible fruit and vegetables. The first diet risks assessment for the general population. *Environ. Res.* 2020; 187: 109677. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109677>
- Wagner M., Oehlmann J. Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2009; 16(3): 278–86. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0107-7>
- Alekseeva A.V., Savostikova O.N. Methodical approaches to raising the reliability of health risk assessment when using polymer materials in drinking water supply. *Анализ риска здоровью*. 2022; (2): 38–47. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2022.2.04> <https://elibrary.ru/gzpcbi>
- Gmoshinskiy I.V., Shipelin V.A., Khotimchenko S.A. Microplastics in food: origin, properties and possible risks. *Meditsina truda i ekologiya cheloveka*. 2022; (2): 224–42. <https://doi.org/10.24412/2411-3794-2022-10216> (in Russian)
- Lackmann C., Velki M., Šimić A., Müller A., Braun U., Ečimović S., et al. Two types of microplastics (polystyrene-HBCD and car tire abrasion) affect oxidative stress-related biomarkers in earthworm *Eisenia andrei* in a time-dependent manner. *Environ. Int.* 2022; 163: 107190. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107190>
- Hwang J., Choi D., Han S., Jung S.Y., Choi J., Hong J. Potential toxicity of polystyrene microplastic particles. *Sci. Rep.* 2020; 10(1): 7391. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64464-9>
- Fleury J.B., Baulin V.A. Microplastics destabilize lipid membranes by mechanical stretching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2021; 118(31): e2104610118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2104610118>
- Shin H., Kwak M., Lee T.G., Lee J.Y. Quantifying the level of nanoparticle uptake in mammalian cells using flow cytometry. *Nanoscale*. 2020; 12(29): 15743–51. <https://doi.org/10.1039/d0nr01627f>
- Aderem A., Underhill D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17: 593–623. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.593>
- Tabata, Y., Ikada Y. Phagocytosis of polymer microspheres by macrophages. In: *New Polymer Materials. Advances in Polymer Science – Issue 94*. Berlin, Heidelberg; 1990: 107–41. <https://doi.org/10.1007/BFb0043062>
- Gel'shtein V.I. Progression of transplanted mouse hepatitis. *Tsitologiya*. 1971; (23): 3–14. (in Russian)
- Aleksanyan Yu.T., Basmadzhyan M.E., Movsenyan K.S., Manukhyan L.A., Gevorkyan S.K. A line of transferable cells obtained from a transferable mouse hepatoma. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*. 1972; (5): 94–5. (in Russian)
- Mamaeva S.E. *Atlas of Chromosomes of Permanent Human Cell Lines [Atlas khromosom postoyannykh kletochnykh linii cheloveka]*. Moscow: Nauchnyi mir; 2002. (in Russian)
- Azawi S., Piaszinski K., Balachandran M., Liehr T., Rincic M. Molecular cytogenetic characterization of two murine liver cancer cell lines: МН-22А and Hepa 1-6. *J. Genet. Genomes*. 2021; 5(1): 1–6. <https://doi.org/10.37421/2684-4567.2021.5.121>

Сведения об авторах

Кудряков Эльдар Ренатович, мл. науч. сотр. отд. токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», 450106, Уфа, Россия. E-mail: e.kudryakov@yandex.ru

Каримов Денис Олегович, канд. мед. наук, зав. отд. токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», 450106, Уфа, Россия.

Гизатуллина Алина Анваровна, мл. науч. сотр. отд. токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», 450106, Уфа, Россия.

Original article

Каримов Денис Дмитриевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отд. токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», 450106, Уфа, Россия.

Байгильдин Самат Сагадатович, канд. биол. наук, науч. сотр. отд. токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», 450106, Уфа, Россия.

Якупова Татьяна Георгиевна, мл. науч. сотр. отд. токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», 450106, Уфа, Россия.

Information about the authors

Eldar R. Kudoyarov, junior researcher, Dept. of toxicology and genetics with an experimental laboratory animal clinic of the Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, 450106, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-2092-1021> E-mail: e.kudoyarov@yandex.ru

Denis O. Karimov, MD, PhD, head of the Dept. of toxicology and genetics with an experimental laboratory animal clinic Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, 450106, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0003-0039-6757>

Alina A. Gizatullina, junior researcher, Dept. of toxicology and genetics with an experimental laboratory animal clinic of the Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, 450106, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-7321-0864>

Denis D. Karimov, MD, PhD, senior researcher, Dept. of toxicology and genetics with an experimental laboratory animal clinic of the Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, 450106, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-1962-2323>

Samat S. Baygildin, MD, PhD, researcher, Dept. of toxicology and genetics with an experimental laboratory animal clinic of the Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, 450106, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-1856-3173>

Tatyana G. Yakupova, junior researcher, Dept. of toxicology and genetics with an experimental laboratory animal clinic of the Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, 450106, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-1236-8246>