

## ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Шитикова А.М.<sup>1,2</sup>, Бельских Э.С.<sup>1</sup>, Атрощенко М.М.<sup>2</sup>, Звягина В.И.<sup>1</sup>, Матвеева И.В.<sup>1</sup>

### ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МИКРОПЛАСТИКА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ МОНОЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ПОМОЩИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ С ВИЗУАЛИЗАЦИЕЙ (ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ, 390026, г. Рязань, Россия;

<sup>2</sup>ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства» (ФГБНУ «ВНИИ коневодства»), 391105, Дивово, Рязанская обл., Россия

**Введение.** Известно, что микропластик способен вызывать воспалительные реакции, однако имеющиеся данные о воздействии частиц микропластика на иммунные клетки человека и о поглощении клетками частиц микропластика довольно ограничены, что обусловлено рядом недостатков существующих методов оценки эффектов микропластика.

**Цель** - исследовать влияние частиц полистирольного микропластика на жизнеспособность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека с использованием технологии проточной цитометрии с визуализацией Cytek®Amnis®Flowsight. **Материал и методы.** Исследование носило пилотный характер. Мононуклеары периферической крови здоровых доноров (n=6) подвергались *in vitro* воздействию полистирольного флуоресцентного микропластика диаметром 1,7-2,2 мкм в концентрации 25 мкг/мл в течение 1, 2 и 4 часов, параллельно проводилась серия контроля. Далее оценивалась жизнеспособность клеток и степень их контакта с микропластиком при помощи проточного цитометра с визуализацией Cytek®Amnis®Flowsight и программного обеспечения INSPIRE™.

**Результаты.** Удалось установить, что микропластик снижает общую жизнеспособность мононуклеаров после 2 часов *in vitro* инкубации, при этом снижается жизнеспособность моноядерных лейкоцитов крови, имевших прямой контакт с частицами микропластика на протяжении всего периода *in vitro* инкубации. На 4-ом часу инкубации наблюдается падение жизнеспособности мононуклеаров периферической крови при контакте с двумя и более частицами микропластика, что указывает на зависимость его неблагоприятного эффекта от числа частиц, контактирующих с клеткой.

**Выводы.** Воздействие полистирольного микропластика в концентрации 25 мкг/мл приводит к значимому снижению общей жизнеспособности моноядерных лейкоцитов крови человека уже после 2 часов *in vitro* инкубации. Наиболее выраженное снижение жизнеспособности мононуклеаров периферической крови наблюдается при контакте с двумя и более частицами микропластика. Проточная цитометрия с визуализацией является современным методом для оценки негативного влияния микропластика на клеточном уровне.

**Ключевые слова:** микропластик, мононуклеарные лейкоциты, проточная цитометрия с визуализацией

**Для цитирования:** Шитикова А.М., Бельских Э.С., Атрощенко М.М., Звягина В.И., Матвеева И.В. Оценка влияния микропластика на жизнеспособность моноядерных лейкоцитов периферической крови при помощи проточной цитометрии с визуализацией (пилотное исследование). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (8): 377-386.  
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-69-8-377-386>

**Для корреспонденции:** Шитикова Анна Михайловна, канд. биол. наук, доц., доцент кафедры биологической химии РязГМУ; ст. науч. сотр. лаб. криобиологии «ВНИИ коневодства»; e-mail: anyakudlaeva@mail.ru

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Благодарности.** Авторы благодарят сотрудников лаборатории криобиологии ФГБНУ «ВНИИ коневодства» и Марченко Г.А., руководителя направления проточной цитометрии, Cytek®, за оказанное содействие в выполнении исследования.

Поступила 29.03.2024

Принята к печати 01.06.2024

Опубликовано 01.08.2024

Shitikova A.M.<sup>1,2</sup>, Belskikh E.S.<sup>1</sup>, Atroshchenko M.M.<sup>2</sup>, Zvyagina V.I.<sup>1</sup>, Matveeva I.V.<sup>1</sup>

### EVALUATION OF THE EFFECT OF MICROPLASTIC ON THE VIABILITY OF BLOOD MONONUCLEAR LEUKOCYTES BY IMAGING FLOW CYTOMETRY (PILOT STUDY)

<sup>1</sup>Ryazan State Medical University, Ryazan, 390026, Ryazan, Russia;

<sup>2</sup>All-Russian Research Institute of Horse Breeding Russia, 391105, Ryazan region, Divovo, Russia

**Introduction.** It is known that microplastic can induce inflammatory reactions, but the available data on the effects of microplastic particles on human immune cells and on cellular uptake of microplastic particles are rather limited due to a number of shortcomings of existing methods for assessing microplastic effects.

**Aim.** To investigate the effect of polystyrene microplastic particles on the viability of human peripheral blood mononuclear leukocytes using Cytex®Amnis®Flowsight imaging flow cytometry technology.

**Material and methods.** This was a pilot study. Peripheral blood mononuclear cells from healthy donors (n=6) were exposed in vitro to polystyrene fluorescent microplastic 1.7-2.2 µm in diameter at a concentration of 25 µg/ml for 1, 2 and 4 hours; a series of controls were performed in parallel. Cell viability and the extent of cell contact with the microplastic were then assessed using an Cytex®Amnis®Flowsight imaging flow cytometer and INSPIRE™ software. It was found that microplastic reduces the total viability of mononuclear cells after 2 hours of in vitro incubation and reduces the viability of mononuclear blood leukocytes that had direct contact with microplastic particles throughout the whole in vitro incubation period. At the 4th hour of incubation, a drop in the viability of peripheral blood mononuclear leukocytes in contact with two or more particles of microplastic is observed, which shows the dependence of its adverse effect on the number of particles in contact with the cell.

**Conclusion.** Exposure to polystyrene microplastic at a concentration of 25 µg/mL leads to a significant decrease in the total viability of human blood mononuclear leukocytes after 2 hours of in vitro incubation. The most pronounced decrease in the viability of peripheral blood mononuclear leukocytes is observed in contact with two or more microplastic particles. Flow cytometry with visualization is a modern method to assess the negative effect of microplastic at the cellular level.

**Key words:** microplastic, mononuclear leukocytes, imaging flow cytometry

**For citation:** Shitikova A.M., Belskikh E.S., Atroshchenko M.M., Zvyagina V.I., Matveeva I.V. Evaluation of the effect of microplastic on the viability of blood mononuclear leukocytes by imaging flow cytometry (pilot study). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (8): 377-386 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-8-377-386>

**For correspondence:** Shitikova A.M., Candidate. Sci. Biol., associate professor, associate professor of the department of biological chemistry of Ryazan State Medical University; Senior Researcher at the Cryobiology Laboratory of All-Russian Research Institute of Horse Breeding; e-mail: anyakudlaeva@mail.ru

**Information about authors:**

Shitikova A.M., <https://orcid.org/0000-0002-4004-9058>;  
Belskikh E.S., <https://orcid.org/0000-0003-1803-0542>;  
Atroshchenko M.M., <https://orcid.org/0000-0001-6023-0332>;  
Zvyagina V.I., <https://orcid.org/0000-0003-2800-5789>;  
Matveeva I.V., <https://orcid.org/0000-0001-9475-8127>.

**Conflict of interest.** The authors declare absence of conflict of interest.

**Funding.** The study had no sponsor support.

**Acknowledgement.** The authors would like to thank the staff of the Cryobiology Laboratory of All-Russian Research Institute of Horse Breeding and G.A. Marchenko, Head of Flow Cytometry, Cytex®, for their assistance in the study.

Received 29.03.2024

Accepted 01.06.2024

Published 01.08.2024

**Введение.** На сегодняшний день проблема загрязнения микропластиком является одной из самых обсуждаемых экологических угроз. Согласно данным ООН, в мире было произведено более 9 млрд тонн пластика [1, 2], а в пандемию COVID-19 человечество ежемесячно выбрасывало миллиарды производимых из полимеров перчаток и масок для лица [3]. В ходе биодеградации, термоокислительной деструкции, механической фрагментации пластика образуются частицы, которые принято классифицировать в зависимости от их размера: нанопластик ≤0,1 мкм (НП), 0,1 мкм < микропластик <5 мкм (МП), 0,5 < мезопластик <5 см, 5 < макропластик <50 см и мегапластик >50 см [4,5]. Наиболее часто встречаются частицы МП из полиэтилена, полипропилена, поливинилхлорида и полистирола, при этом около 4 % от веса пластмасс приходится на добавки органического и неорганического происхождения, обладающие токсическими свойствами [6].

Установлено, что микропластик может попадать в организм человека через желудочно-кишечный тракт, кожу и дыхательные пути [7,8]. Ежегодно человек употребляет с пищей от 39 000 до 52 000 частиц МП [9]. В 2022 году впервые опубликованы результаты работы, продемонстрировавшие наличие микропластика в крови человека [4].

Судьба частиц микропластика в организме человека и последствия их действия все еще остаются спорными и малоизученными. Эффекты частиц МП могут быть обусловлены их физическими свойствами (размером, формой, длиной), химическими свойствами (наличием добавок и типом полимера), концентрацией или слоем микробной биопленки [10,11]. Считается, что эпителий ЖКТ млекопитающих способны пересекать частицы размером менее 150 мкм [10], а в дыхательные пути человека могут проникать частицы размером менее 135 мкм, раздражая альвеолы [8]. Установлено, что частицы МП размером около 10 мкм пересекают гематоэнцефалический барьер, клеточные мембраны и плаценту [10]. Считается, что накопление и распределение МП в органах обратно пропорционально размеру частиц, а депонирование частиц МП размером менее 20 мкм происходит в кишечнике, печени, почках [12]. Несмотря на отсутствие в мире единой (унифицированной) утвержденной методики обнаружения и количественного подсчета частиц МП в образцах [13], ряд исследований указывает на присутствие пластика в человеческом кале [14], плаценте [15], легких [16], печени [17], кишечнике [18]. В крови человека среднее значение суммарной концентрации частиц МП размером ≥700 нм составило 1,6 мкг/мл, при этом обнаруженный пластик был

представлен в большинстве полиэтилентерефталатом, полиэтиленом и полистиролом [19].

В ряде исследований подчеркивалась способность частиц МП и НП оказывать токсическое действие, вызывать хроническое воспаление и повышать риск развития новообразований [20 - 22]. Среди негативных эффектов МП выделяют также влияние на энергетический и липидный обмен, окислительный стресс и нейротоксические реакции [11]. Способность полистирольных частиц индуцировать продукцию АФК была обнаружена на клеточной линии Hs27 [23] и BEAS-2B [24]. У. Не и соавторы [25] показали цитотоксическое действие НП полистирола на клеточной линии HepG2, а на мононуклеарах периферической крови человека было показано, что микропластик индуцирует выработку цитокинов и хемокинов [11, 26 - 28].

Для изучения биологических эффектов МП на иммунные клетки крови в настоящее время используются различные методы и подходы. Известен подход в изучении эффектов МП на лимфоциты крови с использованием показателей, характеризующих нарушение стабильности клеточного ядра и коэффициента клеточного цитостаза, характеризующего процент снижения жизнеспособности клеток по результатам микроскопии окрашенных и фиксированных клеток [26]. J. Hwang и соавт. [27] оценивали биологические эффекты микропластика на клеточных линиях тучных клеток и фибробластов, а также мононуклеарах крови с использованием конфокальной микроскопии. Данные подходы имеют значимые ограничения, обусловленные особенностями подготовки к исследованию: необходимость фиксации клеток параформальдегидом, а также обработка тритоном X-100 непосредственно перед конфокальной визуализацией, что способно значимо исказить показатели жизнеспособности клеток. Также ограничением микроскопических методов анализа является невозможность исследовать популяции с большими выборками, содержащими тысячи событий, и использование не более 3-4 флуоресцентных меток [29].

Более точным представляется метод проточной цитометрии, основным преимуществом которого являются: 1) способность за короткий срок обрабатывать миллионы событий; 2) возможность одновременно использовать несколько флуоресцентных маркеров [29]. Так, Kinga Kik и соавт. [30] продемонстрировали, что полистериновые наночастицы различного диаметра способны оказывать токсическое влияние на мононуклеары человеческой крови, а S. Ballesteros и соавторы [28] выявили генотоксические эффекты МП по отношению к мононуклеарам и полиморфноядерным лейкоцитам. Ограничением конвенциональной проточной цитометрии является невозможность проследить биологические эффекты частиц МП при их прямом контакте в отдельных клетках, а для выявления интернализации частиц необходимо дополнительно использовать микроскопические методы исследования.

Проточная цитометрия с визуализацией (ПЦВ) — это гибридная технология, объединяющая преимущества цитометрии и микроскопии. ПЦВ позволяет значительно расширить объем выборки без привязки значений флуоресцентных параметров к их пространственным распределениям и морфологическим особенностям клетки [29]. Метод ПЦВ позволяет получать

качественные изображения анализируемых единичных клеток, что активно используется для исследования иммунопатогенеза ряда заболеваний [31]. Впервые метод ПЦВ для оценки влияния частиц МП на фагоцитоз и жизнеспособность был проведен на иммунных клетках атлантического лосося (*Salmo salar*) [32].

Мы предлагаем впервые использовать технологию Cytex @Amnis @Flowsight для оценки биологических эффектов МП на моноядерные лейкоциты (МЯЛ) периферической крови человека, которые наиболее доступны в рутинной клинической практике [33,34]. Таким образом, целью нашего исследования явилось изучение влияния частиц полистирольного микропластика диаметром 1,7-2,2 мкм на жизнеспособность МЯЛ периферической крови при помощи проточной цитофлуориметрии с визуализацией.

**Материал и методы.** Проведённое исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (протокол № 3 от 10.10.2022 г.) и соответствует требованиям Надлежащей Клинической Практики (GCP) и Хельсинской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования». В пилотное исследование были включены 6 здоровых доноров (3 мужчины, 3 женщины), давшие добровольное информированное согласие на участие в исследовании, возраст участников составил 34,5 [31,75;35,5] года, 95% CI (31,00-37). Критериями исключения явились злоупотребление алкоголем и наркотическими веществами, острые воспалительные и хронические заболевания в фазе обострения и неполной ремиссии, сахарный диабет 1-го и 2-го типа, онкологические заболевания и болезни крови, беременность и период лактации. Взятие крови осуществляли однократно натощак путём венепункции с помощью вакуумных систем для забора крови из кубитального доступа с использованием пробирок Vacutainer® СРТ™ - ВД с разделительным гелем, гепарином и фиколлоном, от каждого донора исследовался один образец крови. Центрифугировали пробирки Vacutainer® СРТ™ - ВД при 3000 об/мин в течение 30 минут. Аккуратно забирали слой с мононуклеарами автоматической пипеткой и дважды отмывали в среде теплого PBS путем центрифугирования при 1600 об/мин в течение 10 минут. После выделения мононуклеарных лейкоцитов полученную суспензию ресуспендировали в 1 мл среды RPMI-1640, содержащей L-глутамин и 10% эмбриональную бычью сыворотку. Далее измеряли концентрацию мононуклеарных лейкоцитов, доводили её до 500 тысяч клеток в 1 мл. Полученную суспензию делили на контрольный (без добавления частиц микропластика) и опытный образцы (с добавлением частиц полистирольного микропластика Polystyrene Fluorescent Particles 1,7-2,2 мкм, Light Yellow, High Intensity (Spherotech, USA) в конечной концентрации 25 мкг/мл), которые инкубировали в термостате при 37 °С. Взятие биоматериала на анализ жизнеспособности происходил через 1, 2 и 4 часа инкубации. За 15 минут до конца инкубации добавляли CD-45 PE (Cloud-Clone Corp.), за 5 минут до конца инкубации добавляли 7-AAD (Biolegend) в количестве, соответствующем рекомендациям производителя. Инкубация происходила в темноте. Цитометрические исследова-

ния проводились на проточном цитометре с визуализацией Cytek®Amnis®Flowsight (Cytek Biosciences, USA) при помощи голубого лазера (488 нм, 60 мВт), на средней скорости потока с использованием программного обеспечения INSPIRE™. Анализировали

10000 событий при помощи программного обеспечения IDEAS®6.3.

На рис. 1 представлена стратегия гейтирования при анализе жизнеспособности CD-45 положительных клеток, контактирующих с частицами микропластика.

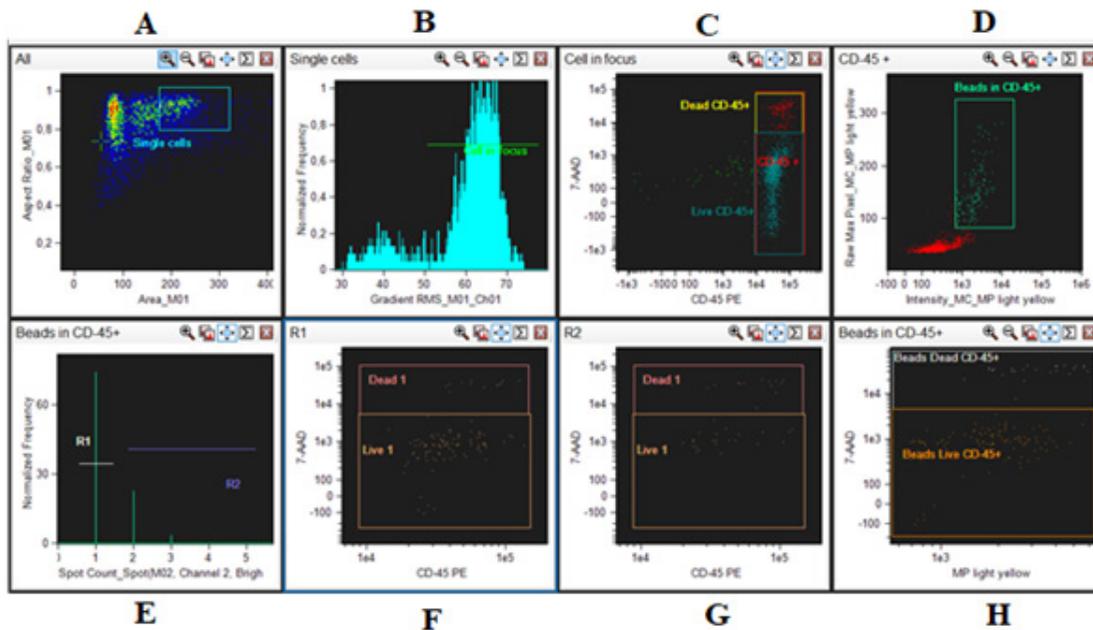


Рис. 1. Жизнеспособность МЯЛ крови при контакте с частицами микропластика.

А - выделение области единичных клеток (Single cells) по таким признакам как Area (площадь) и Aspect Ratio (коэффициент сжатия), соответствующим морфологии МЯЛ;

В - выделение клеток в фокусе с использованием функции gradient RMS, которая помогает выбирать высококачественные изображения со среднеквадратичными значениями выше 50;

С - выделение CD-45- положительных клеток, их разделение на живые/мертвые при помощи витального красителя 7-AAD;

Д - выделение CD-45-положительных клеток, контактирующих с частицами микропластика с использованием функции Internalization Wizard;

Е - гистограмма, показывающая количество CD-45- положительных клеток, контактирующих с 1-ой частицей МП (R1) и 2-мя и более частицами МП (R2), полученная при помощи Spot Wizard;

Ф - разделение CD-45- положительных клеток, контактирующих с 1 частицей МП (R1) на живые/мертвые при помощи витального красителя 7-AAD;

Г - разделение CD-45- положительных клеток, контактирующих с 2-мя и более частицами (R2) на живые/мертвые при помощи витального красителя 7-AAD;

Н - Разделение CD-45- положительных клеток, контактирующих с частицами МП на живые/мертвые при помощи витального красителя 7-AAD.

Для контрольных образцов стратегия гейтирования включает только графики А, В, С (см. рис.1).

Статистическую обработку проводили с использованием программы GraphPad Software, США. При помощи критерия Шапиро-Уилка проверяли соответствие выборок нормальному распределению. Поскольку распределение было отличным от нормального, для оценки статистической значимости использовали непараметрический критерий Краскелла-Уоллиса, для поправки на множественное сравнение использовали двухэтапный метод Бенджамини-Кригера-Иекутелли, отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Жизнеспособность CD45+ МЯЛ, выделенных с помощью BD CPT, за периоды инкубации 1, 2 и 4 часа отражена в табл. 1. Результаты представлены в виде Me (95% CI)

Период от 1 до 4-х часов инкубации сопровождался

сопоставимым уровнем жизнеспособности исследуемых клеток с незначительным снижением показателя на 4-ом часу инкубации. Таким образом, относительно небольшое снижение жизнеспособности клеток позволило предположить возможность оценки воздействия микропластика на показатель жизнеспособности при четырехчасовом воздействии.

Жизнеспособность клеток, подвергшихся экспозиции микропластиком также статистически значимо снижалась спустя 4 часа инкубации по сравнению с 1-м и 2-м часом.

Сравнение показателей жизнеспособности в общем пуле клеток контрольной и опытных образцов выявило статистически значимое падение жизнеспособности только на 2-м часу инкубации, однако наблюдалось достоверное снижение доли жизнеспособных МЯЛ, имевших контакт с микропластиком на всех временных промежутках *in vitro* инкубации (рис. 2).

Таблица 1

Уровень жизнеспособных CD45<sup>+</sup> МЯЛ в течение 1, 2 и 4 часов (ч) в контрольных образцах (контроль, А) и в образцах с микропластиком 25 мкг/мл (МП, в)

Показатель	Время инкубации, ч		
	1 час	2 часа	4 часа
Доля жизнеспособных CD45 <sup>+</sup> МЯЛ в контрольных образцах, %	94,55 [94,0;95,6] 95% CI (93,7-95,6)	95,65 [94,90;96,53] 95% CI (94,3-96,6)	88,55 [88,25;89,95] 95% CI (87,8-91,6) p <sub>1-4</sub> =0,0455 p <sub>2-4</sub> =0,0031
Доля жизнеспособных CD45 <sup>+</sup> МЯЛ в образцах с МП 25 мкг/мл, %	93,75 [92,98;94,85] 95% CI (92,9-95,6)	93,0 [91,43;93,78] 95% CI (91,2-94,3) <sup>#</sup>	88,6 [85,7;89,18] 95% CI (85,4-90,0) p <sub>1-4</sub> =0,0041 p <sub>2-4</sub> =0,0110

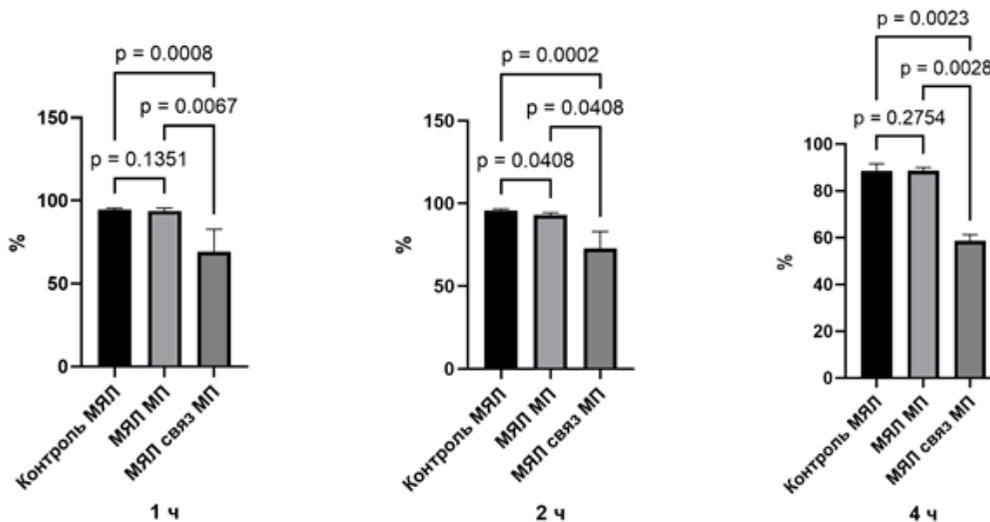


Рис. 2. Процент жизнеспособных CD45<sup>+</sup>лейкоцитов в течение 1, 2 и 4-х часов инкубации с микропластиком.

Результаты на графиках представлены в виде Me (95% CI). Точное значение *p* отражено над столбцами в графиках. Контроль МЯЛ - доля жизнеспособных CD45<sup>+</sup> МЯЛ в контрольных образцах, МЯЛ МП - доля жизнеспособных CD45<sup>+</sup> МЯЛ в образцах с МП 25 мкг/мл, МЯЛ связь МП- доля жизнеспособных клеток, проконтактировавших с частицами МП от общего числа CD45<sup>+</sup> МЯЛ.

Далее была проведена оценка количества клеток, проконтактировавших с частицами МП. Мы выявили тенденцию к снижению процентного содержания CD45<sup>+</sup> клеток, связанных с частицами МП после 1-го часа инкубации, что отражено в табл. 2. Вместе с тем наблюдалась тенденция к падению жизнеспособности клеток, имеющих контакт с МП, на 4-м часу инкубации.

Таблица 2

Доля от общего числа CD45<sup>+</sup> МЯЛ проконтактировавших с частицами микропластика и относительное количество жизнеспособных клеток среди МЯЛ, проконтактировавших с частицами микропластика

Показатель	Время инкубации, ч		
	1 час	2 часа	4 часа
Доля клеток от общего числа CD45 <sup>+</sup> МЯЛ, проконтактировавших с частицами МП, %	5,8 [3,55;7,1] 95% CI (3,4-8,9)	4,15 [3,33;4,73] 95% CI (2,8-5,7)	4,4 [3,88;5,88] 95% CI (3,2-7,6)
Доля жизнеспособных клеток, проконтактировавших с частицами МП от общего числа CD45 <sup>+</sup> МЯЛ, %	64,30 [69,30;74,78] 95% CI (56,2-82,8)	63,60 [72,75;78,98] 95% CI (62,1-83,1)	58,60 [52,10;60,93] 95% CI (45,8-61,3)

В этой связи было сделано предположение, что наличие тенденции могло быть обусловлено различным количеством частиц, которое может быть связано с клеткой. Неоспоримым преимуществом проточной цитометрии с

визуализацией является получение графических изображений, позволяющих отличить клетки без контакта с микропластиком (рис.3, А), контактирующие с 1 частицей (рис.3, В), с 2-мя (рис.3, С), 3-мя и более частицами (рис.3, D).

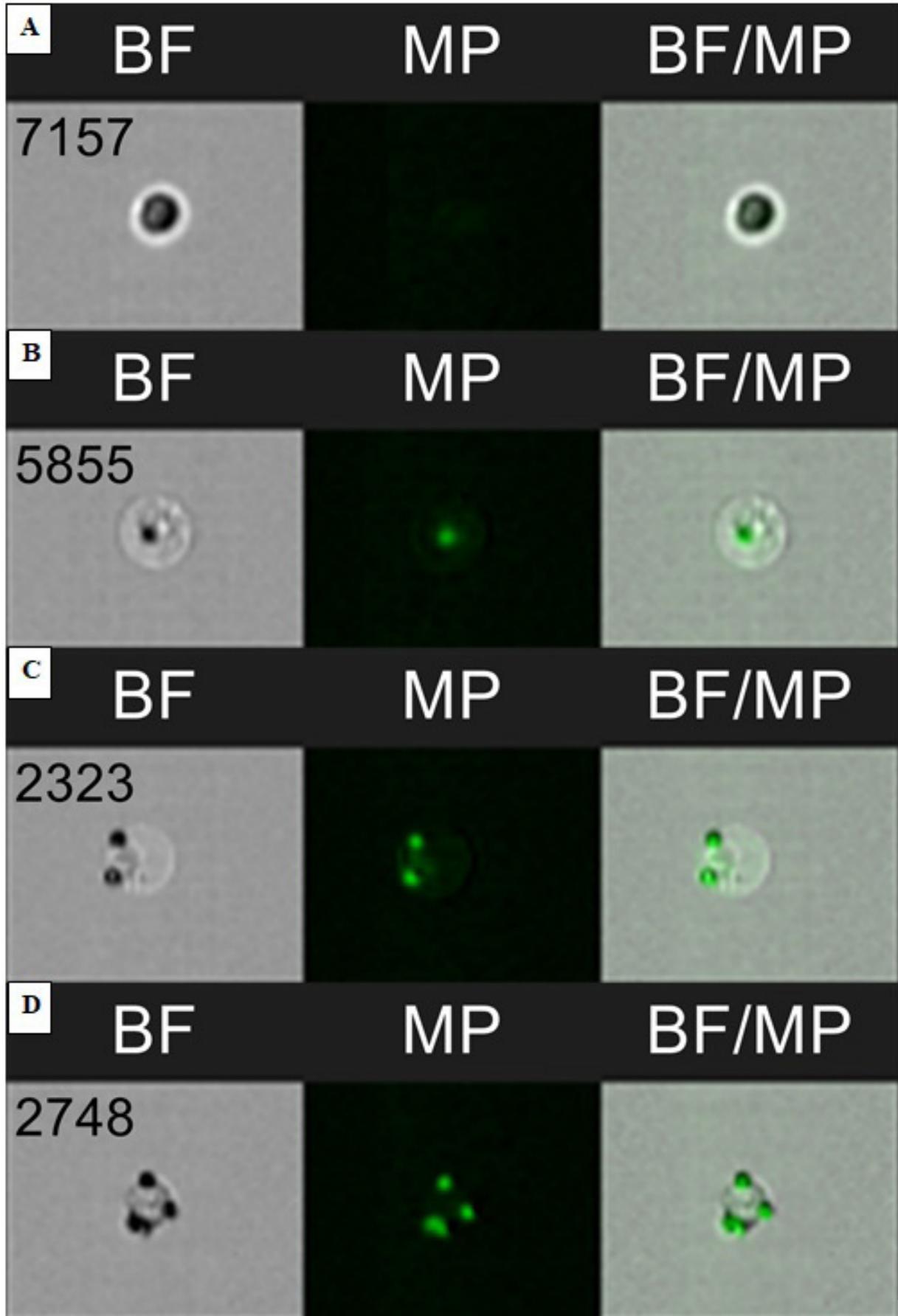


Рис. 3. Мононуклеарные лейкоциты без контакта с микропластиком (А), контактирующие с 1 частицей (В), с 2-мя частицами (С), с 3-мя частицами (D).

Мы проанализировали, менялось ли количество клеток, связанных с 1 частицей и 2-мя и более частицами в течение 1,2 и 4-х часов инкубации, что отражено в табл. 3. Оказалось, что относительное содержание кле-

ток, связанных с 1-й частицей статистически значимо выше на протяжении всего времени инкубации, чем связанных с 2-мя и более частицами. Результаты представлены в виде Me (95% CI).

Таблица 3

Относительное количество CD45<sup>+</sup> МЯЛ, проконтактировавших с частицами микропластика в зависимости от количества частиц и времени инкубации и динамика их жизнеспособности

Число проконтактировавших частиц	Время инкубации, ч		
	1 час	2 часа	4 часа
<b>Относительное количество CD45<sup>+</sup> МЯЛ, проконтактировавших с частицами МП</b>			
1 частица	4,72 [2,89;5,96] 95% CI (2,52-6,51)	3,66 [2,85;3,99] 95% CI (2,58-4,87)	3,50 [3,33;4,23] 95% CI (2,93-5,77)
2+ частицы	0,89 [0,78;1,79] 95% CI (0,64-2,71) $p_{1,2+}=0,0043$	0,53 [0,36;0,79] 95% CI (0,19-0,89) $p_{1,2+}=0,0022$	0,96 [0,56;1,733] 95% CI (0,3-2,0) $p_{1,2+}=0,0022$
<b>Относительное количество живых CD45<sup>+</sup> МЯЛ, проконтактировавших с частицами МП</b>			
1 частица	67,55 [58,35;77,08] 95% CI (56,7-87,2)	66,15 [51,13;75,73] 95% CI (38,90-77,90)	58,0 [52,53;62,05] 95% CI (40,6-67,0)
2+ частицы	45,24 [28,01;70,0] 95% CI (26,32-72,31)	40,63 [26,98;72,76] 95% CI (22,22-83,33)	27,88 [22,6; 36,76] 95% CI (22,22-37,93) $p_{1,2+}=0,0022$

При сравнении показателей жизнеспособности в зависимости от количества связанных частиц было установлено, что на 4-м часу инкубации достоверно снижалась жизнеспособность клеток, имеющих контакт с 2-мя и более частицами по сравнению с клетками, проконтактировавшими с 1-й частицей.

**Обсуждение.** Мононуклеарные лейкоциты крови представляют собой смешанную популяцию миелоидных и лимфоидных клеток. Миелоидные клетки включают моноциты, дендритные клетки и макрофаги. Лимфоидные клетки включают В-клетки, Т-клетки и НК-киллеры. Большинство МЯЛ (70-90%) - это лимфоциты, не обладающие способностью к фагоцитозу. В исследовании S. Ballesteros и соавторов [28] при действии полистирольных частиц нано- и микропластика повреждение ДНК наблюдалось в моноцитах и полиморфноядерных клетках, но в лимфоцитах повреждений обнаружено не было. В то время как моноциты демонстрировали самое высокое поглощение полистирольных частиц, лимфоциты демонстрировали значительную интернализацию [28]. В связи с этим в данном пилотном исследовании мы не ставили цель оценить фагоцитирующую активность МЯЛ крови по отношению к частицам микропластика. Наряду с этим, предложенный нами метод может использоваться в дальнейших исследованиях для выявления негативного действия частиц МП в отдельных субпопуляциях клеток крови, в том числе для оценки фагоцитоза и влияния МП на субклеточные структуры. Установленное нами значимое снижение жизнеспособности МЯЛ, имевших контакт с МП (см. табл. 1), могло быть объяснено, в том числе физическим взаимодействием между микросферами МП и клеточной мембраной, приводящим к её повреждению. Так, известно, что непосредственный контакт клеточной мембраны с МП связан с продукцией активных форм кислорода (АФК) из-за

нарушения равновесия химических реакций в клетках [27, 35]. Полученные нами результаты демонстрируют, что наиболее неблагоприятное действие на жизнеспособность проявляется при контакте клетки более чем с одной частицей (см. табл. 3). Эти данные позволяют дополнить представления о влиянии МП на жизнеспособность клеток, имеющиеся на сегодняшний день.

Ограничением проведенного исследования является короткий промежуток времени инкубации, недостаточный для выделения из пластика токсичных веществ, таких как пластификаторы и мономеры. Тем не менее, в исследовании V. Paget и соавт. [36] был выявлен генотоксический эффект полистирольных наночастиц на линии легочных эпителиальных клеток (Calu-3) и в макрофагах (THP-1) уже через 1,2 и 4 часа. A. Salimi и соавт. [35] обнаружили цитотоксичность МП из поливинилхлорида ПВХ на лимфоцитах крови человека в течение 3-х часового воздействия, которая была связана с образованием внутриклеточных активных форм кислорода, повреждением лизосомальных мембран, падением митохондриального мембранного потенциала. Хотя мы и выявили небольшое снижение жизнеспособности в общей суспензии мононуклеаров крови после 2-х часового воздействия частиц МП, длительное воздействие потенциально может вызвать более выраженный эффект. Кроме того, используемый в исследовании МП был сферической формы и не подвергался непосредственному воздействию окружающей среды, механической деструкции и характеризовался отсутствием микроорганизмов и загрязняющих веществ. Актуальным представляется исследование эффектов МП, подвергшихся механическому воздействию, поскольку острые края частиц при контакте с клеткой вызывают механические повреждения мембраны и скорый биохимический ответ [11].

Кроме того, в дальнейших исследованиях следует

оценить влияние различных концентраций МП. Так, S. Ballesteros и соавт. [28] исследовали влияние пластика на лейкоциты периферической крови человека в концентрации пластика 1,10,25,50,100 мкг/мл, причем наибольшая экспрессия провоспалительных цитокинов наблюдалась в концентрации 25 мкг/мл. Н. Çobanoglu и соавт. [37] оценивали эффекты частиц полистирольного МП крупного диаметра 10–45 мкм с концентрацией 25, 50, 100, 250 и 500 мкг/мл, генотоксическое действие по отношению к МЯЛ периферической крови были зафиксировано в высоких концентрациях–250 и 500 мкг/мл. Y. Park и соавт. [32] работали с низкой концентрацией МП 0.05 мкг/мл, средней– 5 мкг/мл и высокой– 50 мкг/мл. Мы исследовали концентрацию полистирольного МП 25 мкг/мл, несколько превосходящую ту, что обнаружена в крови человека (1,6 мкг/мл) [19]. Полученные результаты помогли выявить некоторые первичные сдвиги, наблюдаемые в жизнеспособности МЯЛ периферической крови.

**Заключение.** В ходе проведенного исследования было обнаружено, что воздействие полистирольного микропластика (1,7–2,2 мкм, Light Yellow, High Intensity (Spherotech) в концентрации 25 мкг/мл приводит к значимому снижению общей жизнеспособности моноядерных лейкоцитов крови человека после 2-х часов *in vitro* инкубации, при этом снижается жизнеспособность моноядерных лейкоцитов крови, имевших прямой контакт с частицами МП на протяжении всего периода *in vitro* инкубации. На 4-м часу инкубации наблюдается падение жизнеспособности мононуклеаров периферической крови при контакте с двумя и более частицами МП, что указывает на зависимость показателя жизнеспособности от числа проконтактировавших с клеткой частиц МП. Проточная цитометрия с визуализацией является современным методом для оценки негативного влияния МП на клеточном уровне.

## ЛИТЕРАТУРА

- Hirt N., Body-Malapel M. Immunotoxicity and intestinal effects of nano- and microplastics: a review of the literature. *Particle and Fibre Toxicology*. 2020; 17: 57. DOI: 10.1186/s12989-020-00387-7.
- De Marco G., Conti G.O., Giannetto A., Cappello T., Galati M., Iaria C., et al. Embryotoxicity of polystyrene microplastics in zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Research*. 2022; 208: 112552. DOI: 10.1016/j.envres.2021.112552.
- Prata J. C., Silva A. L., Walker T. R., Duarte A. C., Rocha-Santos T. COVID-19 pandemic repercussions on the use and management of plastics. 2020; 54(13): 7760–5. DOI: 10.1021/acs.est.0c02178.
- Facciola A., Visalli G., Pruiti Ciarello M., Di Pietro A. Newly Emerging Airborne Pollutants: Current Knowledge of Health Impact of Micro and Nanoplastics. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021; 18: 2997. DOI: 10.3390/ijerph18062997.
- Lebreton L., Slat B., Ferrari F., Sainte-Rose B., Aitken J., Marthouse R., et al. Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. *Scientific Reports*. 2018; 8: 4666. DOI: 10.1038/s41598-018-22939-w.
- European Food Safety Authority (EFSA). "Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood." EFSA Journal 14.6 (2016): e04501. DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4501.
- Zhang Q., Xu E.G., Li J., Chen Q., Ma L., Zeng, E.Y., Shi H. A Review of Microplastics in Table Salt, Drinking Water, and Air: Direct Human Exposure. *Environ. Sci. Technol*. 2020; 54: 3740–51. DOI: 10.1021/acs.est.9b04535.
- Revel M., Châtel A., Mouneyrac C. Micro(nano)plastics: A threat to human health? *Curr. Opin. Environ. Sci. Health*. 2018; 1: 17–23. DOI: 10.1016/j.coesh.2017.10.003.
- Cox K.D., Covernton G.A., Davies H.L., Dower J.F., Juanes F., Das S.E. Human Consumption of Microplastics. *Environ. Sci. Technol*. 2019; 53: 7068–74. DOI: 10.1021/acs.est.9b01517.
- Campanale C., Massarelli C., Savino I., Locaputo V., Uricchio V.F. A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2020; 17: 1212. DOI: 10.3390/ijerph17041212.
- Han, S., Bang, J., Choi, D., Hwang, J., Kim, T., Oh, Y. et al. Surface pattern analysis of microplastics and their impact on human-derived cells. *ACS Applied Polymer Materials*. 2020; 2(11): 4541–50. DOI: 10.1021/acsapm.0c00645.
- Deng Y., Zhang Y., Lemos B., Ren H. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Sci. Rep*. 2017; 7: 46687. DOI: 10.1038/srep46687.
- Ершова А. А., Еремина Т. Р., Дунаев А. Л., Макева И. Н., Татаренко Ю. А. Исследование загрязнения микропластиком морей российской Арктики и Дальнего Востока. *Арктика: экология и экономика*. 2021; 11(2): 164. DOI: 10.25283/2223-4594-2021-2-164-177.
- Schwabl P., Köppel S., Königshofer P., Bucsiacs T., Trauner M., Reiberger T. et al. Detection of various microplastics in human stool: a prospective case series. *Annals of internal medicine*. 2019; 171(7): 453–7. DOI: 10.7326/M19-0618.
- Ragusa A., Svelato A., Santacroce C., Catalano P., Notarstefano V., Carnevali, O. et al. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment international*. 2021; 146: 106274. DOI: 10.1016/j.envint.2020.106274.
- Amato-Lourenço L. F., Carvalho-Oliveira R., Júnior G. R., dos Santos Galvão L., Ando R. A., Mauad T. Presence of airborne microplastics in human lung tissue. *Journal of Hazardous Materials*. 2021; 416: 126124. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.126124.
- Horvatits T., Tamminga M., Liu B., Sebode M., Carambia A., Fischer, L. Microplastics detected in cirrhotic liver tissue. *EBioMedicine*. 2022; 82. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.104147.
- Ibrahim Y. S., Tuan Anuar S., Azmi A. A., Wan Mohd Khalik W. M. A., Lehata S., Hamzah S. R. et al. Detection of microplastics in human colostomy specimens. *JGH open*. 2021; 5(1): 116–21. DOI: 10.1002/jgh3.12457.
- Leslie H. A., Van Velzen M. J., Brandsma S. H., Vethaak A. D., Garcia-Vallejo J. J., Lamoree M. H. Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environment international*. 2022; 163: 107199.
- Ferrante M., Cristaldi A., Oliveri Conti G. Oncogenic Role of miRNA in Environmental Exposure to Plasticizers: A Systematic Review. *Journal of Personalized Medicine*. 2021; 11: 500. DOI: 10.3390/jpm11060500.
- Elsaesser A., Howard CV. Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012; 64: 129–137. https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.09.001.
- Smith M, Love D.C., Rochman C.M., Neff R.A. Microplastics in Seafood and the Implications for Human Health. *Current Environmental Health Reports*. 2018; 5: 375–86. DOI: 10.1007/s40572-018-0206-z.
- Poma A., Vecchiotti G., Colafarina S., Zarivi O., Aloisi M., Arrizza L. *In vitro* genotoxicity of polystyrene nanoparticles on the human fibroblast Hs27 cell line. *Nanomaterials*. 2019; 9(9): 1299. DOI: 10.3390/nano9091299.
- Dong C. D., Chen C. W., Chen Y. C., Chen H. H., Lee, J. S., Lin, C. H. Polystyrene microplastic particles: In vitro pulmonary toxicity assessment. *Journal of hazardous materials*. 2020; 385: 121575. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2019.121575.
- He Y., Li J., Chen J., Miao X., Li G., He Q. et al. Cytotoxic effects of polystyrene nanoplastics with different surface functionalization on human HepG2 cells. *Science of the Total Environment*. 2020; 723: 138180. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138180.
- Jangsun H., Daheui C., Seora H., Jung S.Y., Jonghoon C., Jinkee H. Potential Toxicity of Polystyrene Microplastic Particles. *Scientific Reports*. 2020; 10(1): 7391. DOI: 10.1038/s41598-020-64464-9.
- Hwang J., Choi D., Han S., Jung S. Y., Choi J., Hong, J. Potential toxicity of polystyrene microplastic particles. *Scientific reports*. 2020; 10(1): 7391. https://doi.org/10.1038/s41598-020-64464-9.
- Ballesteros S., Domenech J., Bargaui I., Cortés C., Marcos R., Hernández A. Genotoxic and immunomodulatory effects in human white blood cells after ex vivo exposure to polystyrene nanoplastics. *Environmental Science: Nano*. 2020; 7(11): 3431–46. DOI: 10.1039/

DOEN00748J

29. Basiji D., Lau A., Wong T., Shum H. C., Wong K., Tsia K. et al. Imaging flow cytometry: methods and protocols. N. S. Barteneva, I. A. Vorobjev (Eds.). Springer New York, 2016.
30. Kik K., Bukowska B., Krokosz A., Sicińska P. Oxidative Properties of Polystyrene Nanoparticles with Different Diameters in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (*In Vitro* Study). *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22: 4406. DOI: 10.3390/ijms22094406.
31. Купцова, Д. Г., Радыгина, Т. В., Мурашкин, Н. Н., Петричук, С. В. Активность транскрипционного фактора NF-κB в лимфоцитах у детей с псориазом. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2021; 66(54): 34-5.
32. Park Y., Abihssira-García I. S., Thalmann S., Wiegertjes G. F., Barreda D. R., Olsvik P. A. et al. Imaging flow cytometry protocols for examining phagocytosis of microplastics and bioparticles by immune cells of aquatic animals. *Frontiers in Immunology.* 2020; 11: 203. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00203.
33. Бельских Э. С., Урясьев О. М., Звягина В. И., Фалетрова, С. В. Исследование окислительного стресса и функции митохондрий в мононуклеарных лейкоцитах крови у больных с хроническим бронхитом и с хронической обструктивной болезнью легких. *Наука молодых – Eruditio Juvenium.* 2018; 6(2): 203-10. DOI: 10.23888/HMJ201862203-210.
34. Бельских Э. С., Урясьев О. М., Звягина В. И., Фалетрова С. В. Сукцинат и сукцинатдегидрогеназа моноядерных лейкоцитов крови как маркеры адаптации митохондрий к гипоксии у больных при обострении хронической обструктивной болезни легких. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова.* 2020; 28(1): 13-20. DOI: 10.23888/PAVLOVJ202028113-20.
35. Salimi A., Alavehzadeh A., Ramezani M., Pourahmad, J. Differences in sensitivity of human lymphocytes and fish lymphocytes to polyvinyl chloride microplastic toxicity. *Toxicology and Industrial Health.* 2022; 38(2): 100-11. DOI: 10.1177/074823372111065832.
36. Paget V., Dekali S., Kortulewski T., Grall R., Gamez C., Blazy K. et al. Specific uptake and genotoxicity induced by polystyrene nanobeads with distinct surface chemistry on human lung epithelial cells and macrophages. *PLoS One.* 2015; 10(4): e0123297. DOI: 10.1371/journal.pone.0123297.
37. Çobanoğlu H., Belivermiş M., Sıkdokur E., Kılıç Ö., Çayır, A. Genotoxic and cytotoxic effects of polyethylene microplastics on human peripheral blood lymphocytes. *Chemosphere.* 2021; 272: 129805. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.129805.
- 10.1016/j.coesh.2017.10.003.
9. Cox K.D., Covernton G.A., Davies H.L., Dower J.F., Juanes F., Dudas S.E. Human Consumption of Microplastics. *Environ. Sci. Technol.* 2019; 53: 7068–74. DOI: 10.1021/acs.est.9b01517.
10. Campanale C., Massarelli C., Savino I., Locaputo V., Uricchio V.F. A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2020; 17: 1212. DOI: 10.3390/ijerph17041212.
11. Han, S., Bang, J., Choi, D., Hwang, J., Kim, T., Oh, Y. et al. Surface pattern analysis of microplastics and their impact on human-derived cells. *ACS Applied Polymer Materials.* 2020; 2(11): 4541-50. DOI: 10.1021/acsapm.0c00645.
12. Deng Y., Zhang Y., Lemos B., Ren H. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Sci Rep.* 2017; 7: 46687. DOI: 10.1038/srep46687.
13. Ershova A. A., Eremina T. R., Dunaev A. L., Makeeva I. N., Tatarenko Yu. A. Investigation of microplastic pollution of the seas of the Russian Arctic and the Far East. *Arktika: ekologiya i ekonomika.* 2021; 11(2): 164. DOI: 10.25283/2223-4594-2021-2-164-177. (in Russian)
14. Schwabl P., Köppel S., Königshofer P., Bucsecs T., Trauner M., Reiberger T. et al. Detection of various microplastics in human stool: a prospective case series. *Annals of internal medicine.* 2019; 171(7): 453-7. DOI: 10.7326/M19-0618.
15. Ragusa A., Svelato A., Santacroce C., Catalano P., Notarstefano V., Carnevali, O. et al. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment international.* 2021; 146: 106274. DOI: 10.1016/j.envint.2020.106274.
16. Amato-Lourenço L. F., Carvalho-Oliveira R., Júnior G. R., dos Santos Galvão L., Ando R. A., Mauad T. Presence of airborne microplastics in human lung tissue. *Journal of Hazardous Materials.* 2021; 416: 126124. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.126124.
17. Horvatits T., Tamminga M., Liu B., Sebode M., Carambia A., Fischer, L. Microplastics detected in cirrhotic liver tissue. *EBioMedicine.* 2022; 82. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.104147.
18. Ibrahim Y. S., Tuan Anuar S., Azmi A. A., Wan Mohd Khalik W. M. A., Lehata S., Hamzah S. R. et al. Detection of microplastics in human colostomy specimens. *JGH open.* 2021; 5(1): 116-21. DOI: 10.1002/jgh3.12457.
19. Leslie H. A., Van Velzen M. J., Brandsma S. H., Vethaak A. D., Garcia-Vallejo J. J., Lamoree M. H. Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environment international.* 2022; 163: 107199.
20. Ferrante M., Cristaldi A., Oliveri Conti G. Oncogenic Role of miRNA in Environmental Exposure to Plasticizers: A Systematic Review. *Journal of Personalized Medicine.* 2021; 11: 500. DOI: 10.3390/jpm11060500.
21. Elsaesser A., Howard CV. Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2012; 64: 129–37. DOI: 10.1016/j.addr.2011.09.001.
22. Smith M., Love D.C., Rochman C.M., Neff R.A. Microplastics in Seafood and the Implications for Human Health. *Current Environmental Health Reports.* 2018; 5: 375–86. DOI: 10.1007/s40572-018-0206-z.
23. Poma A., Vecchiotti G., Colafarina S., Zarivi O., Aloisi M., Arrizza L. *In vitro* genotoxicity of polystyrene nanoparticles on the human fibroblast Hs27 cell line. *Nanomaterials.* 2019; 9(9): 1299. DOI: 10.3390/nano9091299.
24. Dong C.D., Chen C.W., Chen Y.C., Chen H.H., Lee J.S., Lin C.H. Polystyrene microplastic particles: In vitro pulmonary toxicity assessment. *Journal of hazardous materials.* 2020; 385: 121575. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2019.121575.
25. He Y., Li J., Chen J., Miao X., Li G., He Q. et al. Cytotoxic effects of polystyrene nanoplastics with different surface functionalization on human HepG2 cells. *Science of the Total Environment.* 2020; 723: 138180. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138180.
26. Jangsun H., Daheui C., Seora H., Jung S.Y., Jonghoon C., Jinkee H. Potential Toxicity of Polystyrene Microplastic Particles. *Scientific Reports.* 2020; 10(1): 7391. DOI: 10.1038/s41598-020-64464-9.
27. Hwang J., Choi D., Han S., Jung S. Y., Choi J., Hong, J. Potential toxicity of polystyrene microplastic particles. *Scientific reports.* 2020; 10(1): 7391. DOI: 10.1038/s41598-020-64464-9.
28. Ballesteros S., Domenech J., Bargañuilla I., Cortés C., Marcos R., Hernández A. Genotoxic and immunomodulatory effects in human white blood cells after *ex vivo* exposure to polystyrene nanoplastics. *Environmental Science: Nano.* 2020; 7(11): 3431-46. DOI: 10.1039/

## REFERENCES

1. Hirt N., Body-Malapel M. Immunotoxicity and intestinal effects of nano- and microplastics: a review of the literature. *Particle and Fibre Toxicology.* 2020; 17: 57. DOI: 10.1186/s12989-020-00387-7
2. De Marco G., Conti G.O., Giannetto A., Cappello T., Galati M., Iaria C., et al. Embryotoxicity of polystyrene microplastics in zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Research.* 2022; 208: 112552. DOI: 10.1016/j.envres.2021.112552.
3. Prata, J. C., Silva, A. L., Walker, T. R., Duarte, A. C., Rocha-Santos, T. COVID-19 pandemic repercussions on the use and management of plastics., 2020; 54(13): 7760-5. DOI: 10.1021/acs.est.0c02178.
4. Facciola A., Visalli G., Pruiti Ciarello M., Di Pietro A. Newly Emerging Airborne Pollutants: Current Knowledge of Health Impact of Micro and Nanoplastics. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2021; 18: 2997. DOI: 10.3390/ijerph18062997.
5. Lebreton L., Slat B., Ferrari F., Sainte-Rose B., Aitken J., Marthouse R., et al. Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. *Scientific Reports.* 2018; 8: 4666. DOI: 10.1038/s41598-018-22939-w.
6. European Food Safety Authority (EFSA). "Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood." *EFSA Journal.* 14.6 (2016): e04501. DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4501.
7. Zhang Q., Xu E.G., Li J., Chen Q., Ma L., Zeng, E.Y., Shi H. A Review of Microplastics in Table Salt, Drinking Water, and Air: Direct Human Exposure. *Environ. Sci. Technol.* 2020; 54: 3740–51. DOI: 10.1021/acs.est.9b04535.
8. Revel M., Châtel A., Mouneyrac C. Micro(nano)plastics: A threat to human health? *Curr. Opin. Environ. Sci. Health.* 2018; 1: 17–23. DOI:

- DOEN00748J.
29. Basiji D., Lau A., Wong T., Shum H. C., Wong K., Tsia K. et al. Imaging flow cytometry: methods and protocols. N. S. Barteneva, I. A. Vorobjev, eds. Springer New York; 2016.
  30. Kik K., Bukowska B., Krokosz A., Sicińska P. Oxidative properties of polystyrene nanoparticles with different diameters in human peripheral blood mononuclear cells (*In Vitro Study*). *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22: 4406. DOI: 10.3390/ijms22094406.
  31. Kuptsova D. G., Radygina T. V., Murashkin N. N., Petrichuk S. V. The activity of transcription factor NF-KB in lymphocytes in children with psoriasis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2021; 66(S4): 34-5. (in Russian)
  32. Park Y., Abihssira-García I. S., Thalmann S., Wiegertjes G. F., Barreda D. R., Olsvik P. A. et al. Imaging flow cytometry protocols for examining phagocytosis of microplastics and bioparticles by immune cells of aquatic animals. *Frontiers in Immunology.* 2020; 11: 203. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00203.
  33. Bel'skikh E. S., Uryas'ev O. M., Zvyagina V. I., Faletrova, S. V. Investigation of oxidative stress and mitochondrial function in mononuclear blood leukocytes in patients with chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. *Nauka molodykh – Eruditio Juvenium.* 2018; 6(2): 203-10. DOI: 10.23888/HMJ201862203-210. (in Russian)
  34. Bel'skikh E. S., Uryas'ev O. M., Zvyagina V. I., Faletrova S. V. Succinate and succinate dehydrogenase of mononuclear leukocytes as markers of mitochondrial adaptation to hypoxia in patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Rossiyskiy mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova.* 2020; 28(1): 13-20. DOI: 10.23888/PAVLOVJ202028113-20. (in Russian)
  35. Salimi A., Alavehzadeh A., Ramezani M., Pourahmad, J. Differences in sensitivity of human lymphocytes and fish lymphocytes to polyvinyl chloride microplastic toxicity. *Toxicology and Industrial Health.* 2022; 38(2): 100-11. DOI: 10.1177/07482337211065832.
  36. Paget V., Dekali S., Kortulewski T., Grall R., Gamez C., Blazy K. et al. Specific uptake and genotoxicity induced by polystyrene nanobeads with distinct surface chemistry on human lung epithelial cells and macrophages. *PLoS One.* 2015; 10(4): e0123297. DOI: 10.1371/journal.pone.0123297.
  37. Çobanoğlu H., Belivermiş M., Sıkdokur E., Kılıç Ö., Çayır, A. Genotoxic and cytotoxic effects of polyethylene microplastics on human peripheral blood lymphocytes. *Chemosphere.* 2021; 272: 129805. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.129805.