

## Влияние пищевых красителей на секрецию цитокинов клетками крови больных аллергическими заболеваниями

Н.С. Аляхнович

Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск, Беларусь

## Food dyes effect on the blood cells cytokine secretion in allergic patients

N.S. Aliakhnovich

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

### Аннотация

**Цель.** Выяснить влияние пищевых красителей (ПК) на немедленную и замедленную секрецию цитокинов клетками крови больных с аллергическими заболеваниями.

**Материалы и методы.** Обследовано 38 человек с аллергической бронхиальной астмой в сочетании с аллергическим ринитом, средний возраст – 37 [31;43] лет. 28 человек (74%) отмечали непереносимость пищи, 25 человек (66%) – непереносимость ПК; 13 – не отмечали реакций на ПК в анамнезе (группа сравнения). Определяли секрецию цитокинов после инкубации 3 и 24 часа крови больных со смесью 0,01% и 0,001% растворов ПК – тартразина (E102), кармуазина (E122), понсо (E124), сансета (E110) и диоксида титана (E171). Концентрации (0,001% и 0,01%) растворов красителей соответствовали принятым нормам допустимого их суточного поступления в организм человека. Контрольные пробы сравнения ставили с митогеном конконавином А (Кон А) (0,02 мг/мл) и 0,9% физиологическим раствором (ФР). В надосадочной жидкости крови, используя стандартные ИФА тест-системы определяли уровни ИЛ-1 $\beta$ , ИФН- $\gamma$ , ИЛ-17, ИЛ-6.

**Результаты.** 3-часовая инкубация цельной крови с 0,001% раствором смеси пяти ПК в 100% и с 0,01% раствором – в 42% случаев стимулировала секрецию ИЛ-17, по сравнению с ФР. Растворы ПК чаще ингибировали (в 58%), чем стимулировали (в 17%) немедленную секрецию ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6, по сравнению с ФР; в равных количествах ингибировали и стимулировали секрецию ИФН- $\gamma$  (в 33%) в обеих концентрациях. У больных с отягощенным анамнезом по ПК растворы красителей ингибировали немедленную секрецию ИЛ-1 $\beta$ , в отличие от аналогичных проб в группе сравнения. Стимулирование секреции ИЛ-17 под действием 0,001% растворов ПК, по сравнению с ФР, наблюдалось в группах больных, как с отягощенным, так и с неотягощенным анамнезом по ПК.

После 24-часовой инкубации крови с 0,001% раствором тартразина (Т) увеличивалась секреция ИЛ-17 (в 80%), с 0,01% раствором – в 50%; обе его концентрации ингибировали секрецию ИЛ-6 (в 50%). 0,001% и 0,01% растворы Т

### Summary

**The aim.** To assess food dyes (FD) effect on the immediate and delayed blood cells cytokines secretion in allergic patients.

**Materials and methods.** The study involved 38 people with allergic asthma combined with allergic rhinitis, the average age – 37 [31; 43] years. 28 people (74%) reported food intolerance, 25 (66%) – FD intolerance; 13 – did not report reactions to the FD in anamnesis – the group of comparison. Cytokine secretion was determined after 3 and 24 hours blood incubation with a mixture of 0.01% and 0.001% FD solutions – Tartrazine (E102), Carmuazine (E122), Ponce (E124), Sunset (E110) and Titanium dioxide (E171). The FD solutions concentrations (0.001% and 0.01%) consistent with the norms of acceptable daily intake in humans. The levels of IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-6 were determined in the supernatant using standard ELISA test systems.

**Results.** 3-hour incubation of whole blood with 0.001% solution of five FD mixture in 100% and with 0.01% solution – in 42% cases stimulated secretion of IL-17, compared with 0,9% NaCl. FD solutions more often inhibited (58%) than stimulated (17%) immediate secretion of IL-1 $\beta$  and IL-6, compared to 0,9% NaCl; in equal amounts inhibited and stimulated secretion of IFN- $\gamma$  (33%) in both concentrations. A mixture of FD stimulated secretion of IFN- $\gamma$  stronger, than Con A at 0.001% concentration – in 4 (50%) cases, in 0.01% concentration – in 3 (37.5%) cases. Patients with a FD allergy observed for immediate inhibition of IL-1 $\beta$ , unlike similar samples in the control group. Stimulation of IL-17 secretion by 0.001% FD solution in comparison with 0,9% NaCl was observed in both groups.

After 24-hour blood incubation with 0.001% tartrazine (T) solution secretion of IL-17 increased in 80%; with 0.01% solution – in 50%; both concentrations inhibited the secretion of IL-6 (50%). 0.001% and 0.01% T solutions more often inhibited than stimulated secretion of IL-1 $\beta$  (27% vs. 8%) and secretion of IFN- $\gamma$  (in 46-54% vs. 8%, respectively) compared with 0,9% NaCl. Patients with FD allergy were observed for significant increasing secretion of IL-17 and decreasing secretion of IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 after 24 hour incubation with

чаще ингибировали, чем стимулировали секрецию ИЛ-1 $\beta$  (в 27% против 8% случаев) и секрецию ИФН- $\gamma$  (в 46-54% против 8% случаев соответственно), по сравнению с ФР. У больных сотягощенным анамнезом по ПК, 0,001% раствор Т стимулировал секрецию ИЛ-17, но ингибировал секрецию ИЛ-1 $\beta$ , ИФН- $\gamma$ , ИЛ-6 после 24-часовой инкубации, в отличие от группы без отягощенного анамнеза по ПК, в которой наблюдалось только уменьшение секреции ИФН- $\gamma$  под действием 0,01% раствора Т, по сравнению с ФР. Кон А после инкубации в течение 3 часов и 24 часов вызывал более сильную секрецию ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-17, ИЛ-6, чем растворы ПК.

**Выводы.** Пищевые красители в гигиенически допустимых дозах оказывают немедленные и замедленные эффекты на клетки крови. Они вызывают секрецию ИЛ-17, участвующего в развитии аллергического воспаления, ингибируют выделение цитокинов ИЛ-6 и ИФН- $\gamma$ . Оказывают иммуномодулирующий эффект на немедленную секрецию ИЛ-1 $\beta$ , ИФН- $\gamma$ .

### **Ключевые слова**

Пищевые красители, секреция цитокинов, ИЛ-1 $\beta$ , ИФН- $\gamma$ , ИЛ-17, ИЛ-6.

Широкое применение пищевых красителей (ПК) для придания цвета продуктам продовольствия и оболочкам лекарственных средств, связано с их высокой устойчивостью к изменениям рН среды и действию кислот, стабильностью к нагреванию и свету, большой окрашивающей способностью, легкостью дозирования, устойчивостью окраски при хранении продукта. В большинстве случаев они дешевле натуральных красителей [1].

Поступая практически ежедневно в организм человека, т.е. оказывая хроническое воздействие пищевые добавки, ПК в частности, воздействуют на клетки человека, вызывая отдаленные последствия в работе всех органов и систем. Важнейшее значение в предупреждении острых токсических эффектов, а также тератогенного, канцерогенного и мутагенного эффектов приобретает гигиеническая регламентация чужеродных веществ на основе токсикологических критериев, принятых международными организациями ООН, ВОЗ, ФАО. К таким показателям относятся предельно допустимая концентрация (ПДК в мг/кг) вещества, которое при ежедневном воздействии не сможет вызвать заболеваний или отклонений в состоянии здоровья [1].

Максимально разрешенные дозы синтетических ПК в индивидуальном виде или суммарно в смесях составляют 500 мг/кг, рекомендуемые – 10–50 мг/кг готового пищевого продукта в зависимости от красителя и вида окрашиваемой

0.001% Т solution, in comparison with 0,9% NaCl, the group without FD anamnesis - 0.01 % Т solution more often inhibited IFN- $\gamma$ , than physiological solution. Con А after 3 and 24 hours incubation caused stronger secretion of IL-1 $\beta$ , IL-17, IL-6, than the FD solutions.

**Conclusions.** FD in hygienically permissible doses have immediate and delayed effects on the blood cells. They cause the secretion of IL-17 involved in allergic inflammation, inhibit the release of cytokines IL-6 and IFN- $\gamma$  and immunomodulate the immediate secretion of IL-1 $\beta$ .

### **Keywords**

Food dyes, cytokines secretion, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-6.

продукции. Среди продуктов с наибольшим количеством ПК оказались кондитерские изделия и сыр. В безалкогольных напитках красители применяются в количестве 50–100 мг/дм<sup>3</sup>, в фруктовых консервах - до 300 мг/кг [1].

Для нерастворимого в воде пигмента титана диоксида (Е171), широко применяющегося в белых и окрашенных глазурах, оболочках и порошкообразных продуктах, ПДК в продуктах питания составляет 100 мг/кг [2].

Критериев, регламентирующих наличие ПК в оболочках лекарственных средств и окрашенных капсулах, несмотря на их повсеместное применение, не разработано [3].

Появление сообщений о патологических реакциях при употреблении и применении ПК [4], требуют тщательного изучения их патологических свойств. В литературе описаны случаи бронхообструкции, крапивницы, отеков и анафилаксии при пероральном потреблении ПК [5]. Нами ранее показаны иммуномодулирующие эффекты как отдельных пищевых красителей: тартразина, диоксида титана, кармуазина, понсо, сансета, так их смесей, что отражает их реальное поступление в организм человека в составе продуктов и оболочек лекарственных средств. ПК увеличивают пероксидазную активность слюны после пероральной провокационной пробы [6] и полоскательного теста [7,8], изменяют экспрессию рецепторов к IgE на поверхности базофилов после употреблении per os [9], изменяют

экспрессию CD25 на лейкоцитах при инкубации *in vitro* [10] и влияют на фагоцитарные функции лейкоцитов [11]. Обнаружены антитела классов IgA, IgE, IgG к ПК в крови и слюне больных с аллергическими заболеваниями [4, 12].

Ранее обнаружено, что смесь ПК (тартразина (E102), кармуазина (E122), понсо (E124), сансета желтого (E110)) индуцирует секрецию ФНО $\alpha$  клетками крови при инкубации в течение суток и секрецию ИЛ-6 после 3 часов инкубации, но не вызывает быстрого выброса ИФН- $\alpha$  и ИЛ-4. ИЛ-2 в надосадочной жидкости после инкубации клеток крови со смесью ПК в течение 3 часов как повышался, так и снижался, что подтверждает их иммуномодулирующий эффект [10].

В настоящем исследовании мы оценивали влияние смеси ПК тартразина (E102), кармуазина (E122), понсо (E124), сансета желтого (E110) и диоксида титана (E171) в двух концентрациях на секрецию цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИФН- $\gamma$ , ИЛ-17, ИЛ-6 после 3-часовой инкубации с клетками цельной крови (немедленная секреция) и влияние монорастворов тартразина на секрецию цитокинов после 24 часов инкубации (замедленная секреция).

ИЛ-1 $\beta$  – провоспалительный многофункциональный цитокин. Почти все микробы и их продукты [13] и множество неинфекционных агентов стимулируют транскрипцию и синтез ИЛ-1 $\beta$ . Связываясь с рецепторами на поверхности клеток, он индуцирует костимуляцию Т-лимфоцитов, пролиферацию В-клеток, рост фибробластов, экспрессию молекул адгезии, стимулирует продукцию других цитокинов ауто- и паракринными путями [14]. ИЛ-1 $\beta$  известен как индуктор нейтрофильного воспаления при многих заболеваниях, в том числе при замедленной кожной гиперчувствительности и УФ-дерматите [15].

ИЛ-6 – мультифункциональный цитокин, который участвует не только в развитии иммунного ответа, но также регулирует гемопоэз, воспаление, костный метаболизм [16]. ИЛ-6 активирует Т-хелперы 17 типа и регулирует ответы В-лимфоцитов и Т-регуляторных клеток. ИЛ-6 вовлечен в патогенез как аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит, болезнь Крона, волчанка), так и аллергических (бронхиальная астма) [17]. На модели бронхиальной астмы показано, что ИЛ-6, передавая сигналы через рецепторный комплекс, состоящий из растворимого и мембранного компонента, контролирует баланс между эффекторными Т-клетками и Т-регуляторами. У больных с бронхиальной астмой наблюдается увеличение количества рас-

творимого компонента рецептора, что связывают с усилением продукции цитокинов Т-хелперами 2 типа. Мембранный фрагмент рецептора подавляет развитие и функциональную активность Т-регуляторов и индуцирует созревание наивных Т-хелперов под действием ИЛ-4, способствуя гиперреактивности дыхательных путей [18].

ИЛ-17 играет важную роль в воспалении и иммунном ответе. Продуцируемый уникальной субпопуляцией Т-хелперов 17 типа, ИЛ-17 обладает провоспалительными свойствами и вызывает выделение хемокинов, металлопротеаз и антимикробных пептидов мезенхимальными и миелоидными клетками. Это ведет к аккумуляции нейтрофилов в очагах воспаления и связывает врожденный и приобретенный иммунный ответ *in vivo*. Большинство исследований подтверждают, что ИЛ-17 увеличивает воспаление в тканях путем стимулирования секреции ИЛ-6, ФНО- $\alpha$  и других цитокинов [19]. Влияя на циклооксигеназу 2, усиливает выделение простагландина E2 и NO различными видами клеток [20]. Увеличение секреции ИЛ-17 влияет на развитие аллергии, аутоаллергических болезней, реакций отторжения трансплантата и даже развитие опухолей [19].

ИФН- $\gamma$  – важная молекула в работе врожденного и приобретенного иммунитета с большим количеством функций, в основном относящихся к Т-хелперному ответу 1 типа. Он продуцируется большим количеством клеток в ответ на выделение ИЛ-12, а также микробных стимулов (зимозан, липополисахарид,  $\beta$ -глюкан). ИФН- $\gamma$  активирует макрофаги, усиливая их фагоцитарную и бактерицидную активность и способствует дифференцировке наивных Т-хелперов по первому пути. ИФН- $\gamma$  усиливает экспрессию МНС молекул первого и второго класса и повышает видимость патогенов для организма. Кроме того, ИФН- $\gamma$  увеличивает количество и активность лимфоцитов в тканях, индуцирует активацию компонентов комплемента и переключение синтеза субклассов иммуноглобулина G, оказывает прямой антивирусный эффект [21].

Как известно уровни цитокинов в крови зависят от множества факторов и постоянно изменяются. Даже у здоровых доноров эти показатели могут выходить за пределы «референтных» значений, которые указываются в инструкциях производителей наборов реагентов, предназначенных для количественного определения цитокинов в биологических жидкостях человека и культуральных средах [22]. По этой причине в ходе нашего исследования мы сравнивали уровень цитокинов после инкубации с растворами

ПК с уровнем - в пробах с физиологическим раствором и конконовалином А после инкубации в тех же условиях.

Анализируя эффекты ПК на секрецию цитокинов, можно составить представление об их влиянии на клетки системы иммунитета и течение болезней.

**Цель:** оценить влияние пищевых красителей на немедленную и замедленную секрецию цитокинов клетками крови лиц с аллергическими заболеваниями.

### Материалы и методы

Обследовано 38 человек (29 женщин, 9 мужчин) с верифицированными по международным критериям аллергическими заболеваниями (бронхиальная астма в сочетании с аллергическим ринитом). Средний возраст обследуемых лиц составил 37 [33;41] лет. 28 человек (74%) отмечали наличие пищевой непереносимости в анамнезе. 25 человек (66%) указывали на непереносимость ПК (исследуемая группа); 13 человек (34%), отрицавшие реакции на ПК, составили контрольную группу.

Оценка содержания и количества цитокинов в надосадочной жидкости цельной крови, взятой утром, натощак, проводилась с использованием стандартных ИФА тест-систем для определения ИЛ-1 $\beta$  (каталожный номер А-8766), ИФН- $\gamma$  (каталожный номер А-8752), ИЛ-6 (каталожный номер А-8768) ЗАО «Вектор-Бест», РФ и ИЛ-17 (каталожный номер КАС1591), Invitrogen, BioSource Europe S.A., Belgium. «Референтные» значения спонтанной и ФГА индуцированной секреции (через 24 часа), определенные производителями ИФА наборов, представлены в таблице 1.

Влияние ПК на секрецию цитокинов клетками крови оценивали путем инкубации крови в течение 3 часов (немедленная секреция) с 0,001% и 0,01% смесью взятых в равных частях растворов тартразина (Е102), кармуазина (Е122), понсо

(Е124), сансета (Е110) и диоксида титана (Е171) у 12 человек (8 женщин, 4 мужчины, средний возраст 38 [29;47] лет).

Цельная кровь 26 человек (21 женщины, 5 мужчин, средний возраст 37 [31;42] лет) инкубировалась с 0,001% и 0,01% растворами тартразина (Е102) в течение 24 часов (замедленная секреция).

Данные по допустимому суточному поступлению (ДСП) (англ. ADI – acceptable daily intake) использовались для расчета концентраций растворов ПК. ДСП – количество вещества, выражаемое в миллиграммах на 1 кг массы тела в сутки, ежедневное поступление которого в организм человека в течение всей жизни, не оказывает негативного влияния на здоровье человека [2].

Для изучаемых ПК нормы ДСП составили: тартразин (Е102) - 7,5 - 12,5 мг/кг [1], кармуазин (Е122) - 4 мг/кг, понсо (Е124) - 4 мг/кг, сансет желтый (Е110) - 2,5 мг/кг. Для титана диоксида (Е171) ДСП не уточнено. Имеющиеся данные по ПДК в пищевых продуктах составляют 0,1 г/кг, по сравнению с остальными ПК, для которых ПДК 0,05-0,5 мг/кг [2].

Расчет концентрации проводился на примере тартразина (Е102). ДСП для тартразина составляет в среднем 10 мг/кг=10 мкг/мл. Следовательно, на 0,5 мл крови понадобится 5 мкг тартразина или 0,5 мл 0,001% раствора тартразина (5 мкг). Мы использовали также 0,01% концентрацию для сравнения, учитывая суммарное поступление ПК не только в составе пищи, а также в составе оболочек лекарственных средств, жевательных резинок и т.д.

Для приготовления 500 мкл 0,001% и 0,01% смесей 5 ПК использовались 0,001% и 0,01% растворы каждого ПК в равных частях (по 100 мкл каждого). Таким образом, содержание каждого ПК в смеси равнялось 1/5 от первоначального.

Изучение секреции цитокинов проводилось по одинаковой методике с различием по времени инкубации в термостате (3 и 24 часа): к 500 мкл

**Таблица 1. Уровни спонтанной и митоген-индуцированной продукции цитокинов клетками цельной крови условно здоровых доноров (n=68) при использовании наборов «ЦИТОКИН-СТИМУЛ-БЕСТ»**

| Цитокины      | Уровень цитокинов, продуцируемых клетками цельной крови, пг/мл |  |                |  |
|---------------|--|--|----------------|--|
|               | Спонтанный   |  | Индуцированный |  |
|               | Медиана  | Диапазон квартильных отклонений (25-75%) | Медиана        | Диапазон квартильных отклонений (25-75%) |
| ИЛ-1 $\beta$  | 20   | 5-50                                     | 1623           | 707-4325                                 |
| ИЛ-6          | 140  | 30-280                                   | 29200          | 11450-42220                              |
| ИЛ-17         | 3  | 2-5                                      | 45             | 18-205                                   |
| ИФН- $\gamma$ | 0  | 0-6                                      | 1337           | 281-4335                                 |



цельной гепаринизированной крови, полученной для стандартного лабораторного обследования, добавляли по 500 мкл 0,001% смеси 5 ПК или 500 мкл 0,01% смеси 5 ПК или использовали 500 мкл 0,01%/0,001% раствора тартразина. В пробах сравнения гепаринизированную кровь смешивали с 500 мкл митогена конконавалина А (Кон А) (0,02 мг/мл) – положительный контроль или 500 мкл 0,9% физиологического раствора (ФР) – отрицательный контроль.

Использование цельной крови, воссоздает условия естественного поступления ПК в организм, позволяет моделировать физиологические условия действия ПК на клетки крови, в отличие от методов с применением очищенной лейкоцусуспензии. Тем более, что доказано связывание ПК в комплексы с белками, а также изменение свойств и характеристик лейкоцитов крови [23].

Инкубацию смеси крови и красителей проводили при 37°С в термостате в течение 3 часов (группа 1) или 24 часов (группа 2). После этого пробы центрифугировали при 1500 об/мин 10 мин. Собирали надосадочную жидкость и методом ИФА определяли в ней концентрацию цитокинов ИЛ-1β, ИФН-γ, ИЛ-17, ИЛ-6. При высоком содержании цитокинов, надосадочную жидкость разводили. Результат умножали на

степень разведения. Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 10,0. Сравнение параметрических переменных проводилось парным Т-Тестом Стьюдента; непараметрических - парным тестом Вилкоксона со степенью достоверности  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

### 1. Анализ немедленной секреции цитокинов под влиянием смеси 5 пищевых красителей

Уровень немедленной секреции ИЛ-1β у обследованных был высоким, как при стимуляции Кон А, инкубации со смесью ПК, так и в контрольных пробах с ФР. Обнаружено, что инкубация цельной крови с растворами ПК ингибировала секрецию клетками крови ИЛ-1β, по сравнению с ФР. Кон А вызывал более сильную секрецию ИЛ-1β, по сравнению с 0,001% и 0,01% растворами ПК (Табл. 2).

В 6 (50%) случаях секреция ИЛ-1β повышалась на 20-60% при увеличении концентрации ПК в растворе (от 0,001% к 0,01%); в 2 (17%) - понижалась на 55-76%, в 4 (33%) - не изменялась.

0,01% раствор ПК стимулировал секрецию ИЛ-1β на 41% и 500%, по сравнению с ФР (с 428 до 606 пг/мл и с 69 до 411 пг/мл) у 2 человек (17%);

**Таблица 2. Уровни цитокинов надосадочной жидкости после 3-часовой инкубации с растворами пищевых красителей**

| Цитокины        | Статистические показатели  | Растворы, n=12   |   |  |                    |
|-----------------|----------------------------|--|---|--|--------------------|
|                 |                            | Пищевые красители  |   | Кон А  | ФР (контроль)      |
|                 |                            | 0,001%   | 0,01%   |  |                    |
| ИЛ-1β,<br>пг/мл | М [+ДИ;-ДИ]                | 843<br>[439;1247]*   | 882<br>[522;1242]*  | 1259<br>[913;1605]   | 1130<br>[740;1519] |
|                 | Мин/Макс                   | 0/1758   | 0/1707  | 0/1889   | 68/1871            |
|                 | Достоверность различий (р) | $p_{ИЛ-1\beta - ФР} = 0,01$ ;<br>$p_{ИЛ-1\beta - Кон} < 0,001$ | $p_{ИЛ-1\beta - ФР} = 0,047$ ;<br>$p_{ИЛ-1\beta - Кон} < 0,001$ | $p > 0,05$   |                    |
| ИФН-γ,<br>пг/мл | М [+ДИ;-ДИ]                | 66[0;144]  | 21 [0;47]   | 4 [1;8]**  | 21 [2;40]          |
|                 | Мин/Макс                   | 0/332  | 0/108   | 0/13   | 0/107              |
|                 | р                          | $p > 0,05$   | $p > 0,05$  | $p_{ИФН-γ - ФР} = 0,02$                                      |                    |
| ИЛ-17,<br>пг/мл | М [+ДИ;-ДИ]                | 8 [3;13]**   | 5 [0;10]  | 8 [3;13]**   | 3 [0;6]            |
|                 | Мин/Макс                   | 1/23   | 0/22  | 0/23   | 0/15               |
|                 | р                          | $p_{ИЛ-17 - ФР} = 0,002$ ;<br>$p_{ИЛ-17 - 0,01\%ПК} = 0,01$    | $p > 0,05$  | $p_{ИЛ-17 - ФР} = 0,002$ ;<br>$p_{ИЛ-17 - 0,01\%ПК} = 0,004$ |                    |
| ИЛ-6,<br>пг/мл  | М [+ДИ;-ДИ]                | 904<br>[708;1101]**  | 929<br>[839;1019]*  | 1043<br>[983;1102]   | 1027<br>[888;1165] |
|                 | Мин/Макс                   | 0/1128   | 631/1099  | 856/1249   | 584/1302           |
|                 | р                          | $p_{ИЛ-6 - ФР} = 0,04$ ;<br>$p_{ИЛ-6 - Кон} = 0,03$            | $p_{ИЛ-6 - Кон} = 0,01$   | $p > 0,05$   |                    |

где\* - парный Т-Тест Стьюдента для параметрических переменных; \*\* - непараметрический парный тест Вилкоксона.

0,001% р-р ПК стимулировал секрецию ИЛ-1 $\beta$  на 136%, по сравнению с ФР (с 69 до 152 пг/мл), у 1 человека (8%).

У 7 человек (58%) инкубация со смесью ПК различной концентрации ингибировала выброс ИЛ-1 $\beta$  на 27-100%, по сравнению с ФР (от 1871-191 до 1451-0 пг/мл).

Содержание ИФН- $\gamma$  в надосадочной жидкости крови после 3-часовой инкубации с ФР у 7 человек (58%) было выше 6 пг/мл (Табл. 1), причем у 1 человека (8%) достигало 107 пг/мл.

Инкубация с растворами ПК увеличивала выброс ИФН- $\gamma$  в 2-200 раз (от 27 до 332 пг/мл) у 4 человек (33%) при уровнях в контрольных пробах с ФР от 2 до 40 пг/мл.

0,001% раствор ПК стимулировал секрецию ИФН- $\gamma$  в большей степени, чем 0,01% (Табл. 2). В концентрации 0,001% смесь ПК стимулировала выброс ИФН- $\gamma$  в 4 (50%) случаях, в 0,01% концентрации – в 3 (37,5%) случаях, в отличие от Кон А, который не оказывал такого воздействия через 3 часа инкубации (Рис. 1).

У 4 человек (33%) уровень ИФН- $\gamma$  после инкубации с 0,01% и 0,001% растворами ПК уменьшался до 6 пг/мл при количестве в пробе с ФР от 17 до 107 пг/мл.

Секреция ИЛ-17 в контрольной пробе с ФР была выше 5 пг/мл у 3 человек (25%), у остальных ниже 5 пг/мл (Табл. 3).

Инкубация с 0,001% раствором смеси ПК в течение 3 часов стимулировала секрецию ИЛ-17 у всех обследованных, по сравнению с ФР, причем уровень ИЛ-17 увеличивался от 0-14,5 пг/

мл до 1,4-23,2 пг/мл (Табл. 2, 3; Рис.2). В то же время, 0,01% раствор ПК стимулировал секрецию ИЛ-17 в 5 (42%) случаев, по сравнению с ФР, но в меньшей степени, чем 0,001% раствор ПК. Инкубация с Кон А вызывала больший выброс цитокина ИЛ-17, чем инкубация с 0,01% ПК или с ФР (Табл. 2, 3).

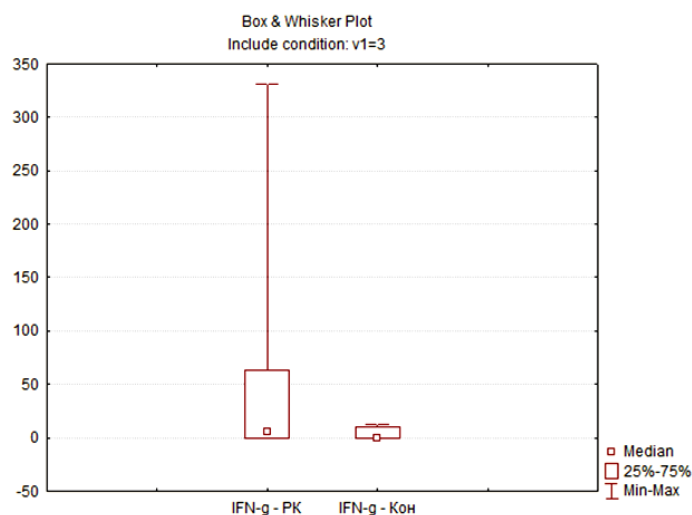
Секреция ИЛ-6 после 3 часов инкубации наблюдалась во всех пробах, причем в среднем более высокое содержание ИЛ-6 регистрировалось в пробах с ФР и Кон А. При инкубации с растворами ПК в среднем происходило ингибирование выделения ИЛ-6, по сравнению с ФР и Кон А (Табл. 2). Кон А не стимулировал секрецию ИЛ-6 больше, чем ФР в контрольных пробах.

У 5 человек (42%) наблюдалось ингибирование выделения ИЛ-6 на 15-25% 0,001% раствором ПК, у 7 человек (58%) – на 10-25% 0,01% раствором ПК при уровне в пробах с ФР - 1302-853 пг/мл.

В 4 (57%) случаях 0,01% раствор ПК сильнее ингибировал секрецию ИЛ-6, чем 0,001% раствор ПК, в остальных случаях - в равной степени.

У 2 человек (17%) 0,01% и 0,001% растворы ПК стимулировали секрецию ИЛ-6 (прирост на 12-26%), по сравнению с контрольными пробами с ФР.

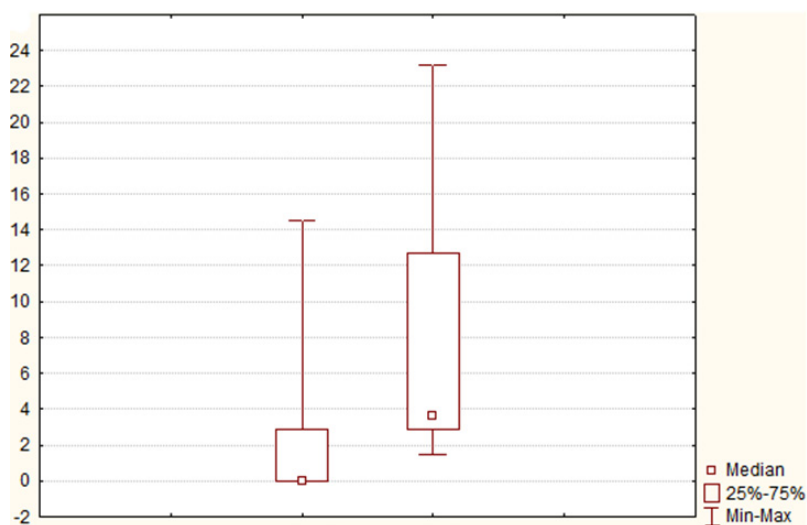
Таким образом, смесь ПК через 3 часа инкубации в термостате у всех обследованных вызывала немедленную секрецию цитокина ИЛ-17, 0,001% раствор ПК сильнее и чаще стимулировал секрецию ИЛ-17, чем 0,01% раствор. 0,01% раствор ПК чаще ингибировал, чем стимулировал немедленную секрецию ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6 (в 58%,



**Рис. 1.** Немедленная секреция ИФН- $\gamma$  под влиянием 0,001% раствора пищевых красителей, по сравнению с раствором Кон А

**Таблица 3. Уровни ИЛ-17 в надосадочной жидкости крови (пг/мл) после 3-часовой инкубации со смесью пищевых красителей**

| № больных                                       | Растворы          |        |         |                  |
|---|-------------------|--------|---------|------------------|
|   | Пищевые красители |        | Кон А   | ФР<br>(контроль) |
|   | 0,001%            | 0,01%  |         |                  |
| 1   | 3,6               | 0,0    | 3,6     | 0,0              |
| 2   | 3,6               | 0,0    | 2,9     | 0,0              |
| 3   | 12,3              | 0,0    | 7,2     | 5,1              |
| 4   | 21,0              | 21,7   | 23,2    | 14,5             |
| 5   | 3,6               | 3,6    | 5,1     | 0,0              |
| 6   | 13,0              | 9,4    | 15,2    | 11,6             |
| 7   | 23,2              | 19,6   | 21,7    | 0,0              |
| 8   | 2,9               | 0,0    | 2,2     | 0,0              |
| 9   | 2,2               | 0,7    | 5,8     | 0,0              |
| 10  | 1,4               | 2,2    | 2,2     | 0,0              |
| 11  | 2,9               | 1,4    | 10,1    | 0,7              |
| 12  | 5,8               | 0,7    | 0,0     | 0,0              |
| Достоверность различий по сравнению с контролем | p=0,002           | p>0,05 | p=0,002 |                  |



**Рис. 2. Влияние 0,001% раствора пищевых красителей (справа) на выброс ИЛ-17, по сравнению с контрольными пробами с физиологическим раствором (слева).**

по сравнению с 17% случаев). В равных количествах случаев 0,01% и 0,001% растворы ПК ингибировали и стимулировали секрецию ИФН- $\gamma$  (в 33%).

## 2. Анализ замедленной секреции цитокинов под действием растворов тартразина (Т)

Уровни цитокинов в надосадочной жидкости после 24-часовой инкубации в пробах с ФР, Кон

А и разными концентрациями Т представлены в таблице 4.

Аналогично с 3-часовой инкубацией со смесью ПК, 24-часовая инкубация с Т, Кон А и ФР вызывала сильную секрецию исследуемых цитокинов (Табл. 3, 4). Инкубация с Т в течение 24 часов повторяла эффекты смеси ПК в течение 3 часов инкубации: 0,001% раствор Т вызывал ингибирование секреции ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6, по сравне-

нию с ФР, стимулировал секрецию ИЛ-17. Кроме того, 24-часовая инкубация с 0,01% раствором Т ингибировала секрецию ИФН- $\gamma$ , по сравнению с ФР и Кон А ( $p < 0,05$ ) (Табл. 4).

С учетом каждого отдельного обследуемого: 0,001% раствор Т чаще ингибировал (в 7 (27%) случаев, чем стимулировал – в 2 (8%) случаях) секрецию ИЛ-1 $\beta$ , по сравнению с ФР (Табл.4). 0,01% раствор Т, а также Кон А в равном числе случаев стимулировали (в 4 (15%)) и ингибировали (в 7 (27%)) секрецию ИЛ-1 $\beta$ . 0,001% раствор Т ингибировал секрецию ИФН- $\gamma$  на 31-100%, по сравнению с ФР (с 567-8,4 до 461-0 пг/мл) у 12 человек (46%); 0,01% - на 20-100% (с 1091-8,4 до 0-318 пг/мл) в 14 (54%) случаях.

Стимуляция секреции ИФН- $\gamma$  0,001% раствором Т, по сравнению с ФР, наблюдалась в 2 (8%) случаях с 95-254 до 269-403 пг/мл.

У 8 (80%) обследованных после инкубации крови в течение 24 часов с 0,001% раствором Т наблюдалась стимуляция секреции ИЛ-17, по сравнению с ФР в 2 и более раз и повышение его количества с 0-5,8 до 3,6-13,0 пг/мл. 0,01% раствор ПК стимулировал секрецию ИЛ-17 в 5 (50%) случаях, но в меньшей степени, чем 0,001% раствор.

Ингибирование секреции ИЛ-6 на 12-35% под действием 0,01% и 0,001% растворов Т выявлено в 5 (50%) случаях (с 1786-1028 до 1115-737 пг/мл); стимуляция – в 1 (10%) на 31% (с 811 до 1063 пг/мл) под действием 0,01% раствора Т.

### 3. Сравнение подгрупп больных с наличием/отсутствием отягощенного анамнеза по непереносимости пищевых красителей

Выделение такого рода подгрупп оказалось непростой задачей, так как большинство обследованных не связывали проявления аллергических болезней (приступы удушья, ринит, чихание, зуд кожи) с непереносимостью пищевых продуктов, и тем более входящих в их состав ПК. Среди тех лиц, которые находили подобную связь или имели эпизод аллергической реакции на яркоокрашенные продукты, преобладала повышенная настороженность ко всем пищевым добавкам, а не отдельным видам ПК. Не существует стандартизированных методов выявления сенсibilизации к ПК. В связи с чем, группы с непереносимостью ПК и сравнения были выделены на основе анамнезов участников исследования.

Найти различий между средними уровнями цитокинов в надосадочной жидкости после 3- и 24-часовой инкубации с ПК в обозначенных группах не удалось.

При сравнении проб с ПК (предполагаемым аллергеном) и ФР (контрольных) внутри выделенных групп оказалось, что через 3 часа инкубации в группе больных с отягощенным анамнезом по ПК уровни ИЛ-1 $\beta$  в пробах с 0,001% раствором ПК были достоверно ниже, чем в пробах с ФР ( $p < 0,05$ ), в отличие от аналогичных проб в

**Таблица 4. Уровни цитокинов надосадочной жидкости крови после 24-часовой инкубации с растворами тартразина**

| Цитокины                 | Показатели  | Растворы, n=26 (для ИЛ-1 $\beta$ и ИФН- $\gamma$ ), n=12 (для ИЛ-17 и ИЛ-6) |  |   |                  |
|--------------------------|-------------|---|--|---|------------------|
|                          |             | Пищевой краситель тартразин   |  | Кон А                                     | ФР<br>(контроль) |
|                          |             | 0,001%  | 0,01%  |   |                  |
| ИЛ-1 $\beta$ ,<br>пг/мл  | М [+ДИ;-ДИ] | 556[393;719] *  | 744[536;953]   | 612[438;787]*                             | 704[526;881]     |
|                          | Мин/Макс    | 0/1652  | 147/1819   | 0/1728                                    | 298/1889         |
|                          | p           | $p^{\text{ИЛ-1}\beta - \text{ФР}} = 0,02$                                   | $p > 0,05$   | $p^{\text{ИЛ-1}\beta - \text{ФР}} = 0,03$ |                  |
| ИФН- $\gamma$ ,<br>пг/мл | М [+ДИ;-ДИ] | 74[13;135]  | 46[10;82]*   | 157[43;272]                               | 130[30;230]      |
|                          | Мин/Макс    | 0/461   | 0/317  | 0/1089                                    | 0/1091           |
|                          | p           | $p > 0,05$  | $p^{\text{ИФН-}\gamma - \text{ФР}} = 0,001$<br>$p^{\text{ИФН-}\gamma - \text{Кон}} = 0,03$ | $p > 0,05$                                |                  |
| ИЛ-17,<br>пг/мл          | М [+ДИ;-ДИ] | 7 [4;10]*   | 5 [2;8]  | 10 [5;15]*                                | 4 [1;7]          |
|                          | Мин/Макс    | 2/17  | 1/13   | 2/24                                      | 0/14             |
|                          | p           | $p^{\text{ИЛ-17} - \text{ФР}} = 0,02$                                       | $p > 0,05$   | $p^{\text{ИЛ-17} - \text{ФР}} = 0,02$     |                  |
| ИЛ-6,<br>пг/мл           | М [+ДИ;-ДИ] | 816 [591;1042]*   | 997[898;1096]  | 895 [719;1071]                            | 1095 [901;1289]  |
|                          | Мин/Макс    | 0/1159  | 737/1161   | 351/1204                                  | 810/1786         |
|                          | p           | $p^{\text{ИЛ-6} - \text{ФР}} = 0,01$  | $p > 0,05$   | $p > 0,05$                                |                  |

где\* - непараметрический парный тест Вилкоксона.



контрольной группе обследованных без отягощенного анамнеза по ПК.

Как у больных, отмечающих реакции на ПК, так и их отрицающих, инкубация с 0,001% раствором ПК в течение 3 часов сильнее стимулировала секрецию ИЛ-17, по сравнению с ФР ( $p < 0,05$ ). Средние уровни цитокинов ИЛ-6 и ИФН- $\gamma$  после 3 часов инкубации с растворами ПК, по сравнению с ФР, среди больных с отягощенным анамнезом по ПК и без него, не различались.

Секреция цитокинов в исследуемых группах больше различалась через 24 часа инкубации с растворами ПК: в группе больных с отягощенным анамнезом по ПК 0,001% раствор Т ингибировал секрецию ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6, стимулировал секрецию ИЛ-17, по сравнению с ФР ( $p < 0,05$ ). Кроме того, в группе больных с непереносимостью ПК по анамнезу секреция ИФН- $\gamma$  в пробах с 0,01% и 0,001% растворами Т была ниже, чем в пробах с ФР, в отличие от группы сравнения, где различия наблюдались только между 0,001% раствором Т и ФР ( $p < 0,05$ ).

Полученные результаты указывают на возможность влияния ПК на секрецию цитокинов, как у людей с отягощенным по ПК анамнезом, так и у людей без клинических проявлений непереносимости пищевых добавок.

При постоянном поступлении ПК в организм человека и их накоплении, ПК могут оказывать эффект на клетки крови, проявляющийся как в развитии аллергического воспаления под действием ИЛ-17, так и в ингибировании выделения цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ИФН- $\gamma$  и способствовать развитию иммунодефицитов.

Большинство пищевых добавок не является пластическим материалом для организма человека, но оказываются биологически активными веществами [1, 23]. Некоторые из них могут проявлять токсические свойства, но большинство при постоянном не дозируемом поступлении оказывают скрытые отсроченные эффекты, в том числе иммуномодулирующие. Проблеме безопасности пищевых красителей уделяется не достаточное внимание. Применение пищевых добавок, как всяких чужеродных ингредиентов пищевых продуктов, требует строгой регламентации и специального контроля. Безвредность пищевых добавок определяется на основе сравнительных исследований, предпринимаемых такими структурами, как Объединенный комитет экспертов по пищевым добавкам (ОКЭПД) ФАО – ВОЗ и Научным комитетом по продуктам питания (НКПП) Европейского Союза. В случае

исследований негенотоксичных воздействий добавки считают, что есть порог воздействия на организм человека, ниже которого вещество не проявляет никакого отрицательного эффекта. Объединенный комитет экспертов по пищевым добавкам ФАО – ВОЗ рекомендовал использовать интегральный коэффициент запаса, равный 100. Коэффициент гарантирует безопасность с учетом различной чувствительности человека и животных, индивидуальных различий, сложности оценки потребленного количества продукта, возможности синергического действия пищевых добавок и т.д. [1].

Тем не менее, остаются не регламентированными допустимые количества ПК при использовании их в фармацевтической промышленности [3]. Существуют пробелы в знаниях по суммарному поступлению некоторых широко используемых ПК (например, диоксида титана) [3, 23]. Более того, использование пищевых добавок в соответствии с допустимыми нормами (ДСП, ПДК и др.) не защищают человека от развития отсроченных влияний на организм и систему иммунитета в частности.

## Выводы

1. У больных аллергическими заболеваниями установлены высокие уровни секреции ИЛ-1 $\beta$  (100% случаев), ИФН- $\gamma$  (58% случаев), ИЛ-17 (25% случаев), ИЛ-6 (100% случаев) в надосадочной жидкости после 3 часов и 24 часов инкубации цельной крови с физиологическим раствором.
2. 0,001% и 0,01% растворы пищевых красителей чаще ингибировали секрецию ИЛ-1 $\beta$  клетками цельной крови больных аллергическими заболеваниями: через 3-часа инкубации ингибирование наблюдалось в 58% случаев, стимуляция – 17%; через 24-часа – ингибирование в 27% случаев, стимуляция наблюдалась в 8% случаев.
3. Инкубация крови в течение 3 часов с 0,001% раствором смеси пищевых красителей вызвала выделение ИФН- $\gamma$  сильнее, чем физиологический раствор в 33% случаев. Через 24 часа инкубации оба раствора тартразина чаще ингибировали секрецию ИФН- $\gamma$  (46-56% случаев).
4. 0,001% раствор смеси пищевых красителей и 0,001% раствор тартразина стимулировали немедленную и замедленную секрецию ИЛ-17 клетками цельной крови в 100 и 42% случаев соответственно; 0,01% растворы - в 80% и 50% случаев соответственно.

5. Под влиянием 0,001% и 0,01% растворов пищевых красителей чаще происходило ингибирование (в 42-58% - через 3 часа и в 50% - через 24 часа), чем стимуляция (17% случаев - через 3 часа и в 10% - через 24 часа) секреции ИЛ-6, по сравнению с физиологическим раствором.
6. Конконавалин А после инкубации в течение 3 часов и 24 часов вызывал более сильную секрецию ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-17, ИЛ-6, чем растворы пищевых красителей, стимулировал се-

крецию ИФН- $\gamma$  только через 24-часовой инкубации.

7. Растворы изученных пищевых красителей и их смеси в допустимых суточных концентрациях изменяли немедленную и замедленную секрецию цитокинов лейкоцитами крови больных аллергией. Эти эффекты наблюдались в группах больных с отягощенным и не отягощенным анамнезом по непереносимости красителей, что, вероятно, обусловлено их индивидуальной чувствительностью к пищевым красителям.

## Литература

1. Лапина Т.П. Пищевые и биологически активные добавки: учеб. пособие; Томск: Томский межвузовский центр дист. образ. 2005: 96 с.
2. Пищевые добавки энциклопедия [Электронный ресурс] / авт.-сост. Л.А. Сарафанова. СПб.: Гиорд, 2004. Режим доступа: [http://deus1.com/dobavki\\_pischevye-1.html](http://deus1.com/dobavki_pischevye-1.html). Дата доступа: 26.05.2016.
3. Аляхнович Н.С., Новиков Д.К. Распространенность, применение и патологические эффекты диоксида титана. Вестник ВГМУ. 2016; №2, Т.15:7-16.
4. Титова Н.Д. Пищевые добавки как алиментарные аллергены. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2008; №2:41-46.
5. Титова Н.Д. Аллергические и неаллергические реакции на добавки в пищу и лекарствах. Аллергология и иммунология 2010; №3, Т.11:250-259.
6. Аляхнович Н.С., Янченко В.В., Новиков Д.К. Метод диагностики аллергии на пищевые красители по увеличению пероксидазной активности в слюне. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2015; №3:108-114.
7. Аляхнович Н.С., Новиков Д.К., Карпук И.Ю. и др. Трансбуккальный метод диагностики аллергии по увеличению пероксидазной активности в слюне. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2015; №4:35-43.
8. Аляхнович Н.С., Лауцкая Е.С. Сенсibilизация гранулоцитов слюны к пищевому красителю тартразину в аллергенспецифическом тесте – реакции выброса миелопероксидазы. Медицинская иммунология. 2015; № 3s; Т. 17:62-63.
9. Аляхнович Н.С. Влияние провокационной пробы с аллергеном на IgE+CD203c+ базофилы крови. Вестник ВГМУ. 2016; №.3; Т.15:60-67.
10. Титова Н.Д. Иммуномодулирующие эффекты пищевых красителей: стимуляция лимфоцитов и индукция секреции цитокинов. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2011; №2:81-90.
11. Титова Н.Д. Модуляция фагоцитоза под влиянием пищевых красителей. Российский иммунологический журнал 2011; № 2; Т.5(14):156-162.
12. Титова Н.Д. Клиническое значение sIgA-антител в слюне к пищевым добавкам у детей с аллергическими заболеваниями. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2011; №2:63-69.
13. Rivera-Mariani FE, Vysyaraju K, Negherbon J et al. Comparison of the interleukin-1 $\beta$ -inducing potency of allergenic spores from higher fungi (Basidiomycetes) in a cryopreserved human whole blood system. International archives of allergy and immunology. 2014;163(2):154-162.
14. Zhang T, Guo C-J, Li Y et al. Interleukin-1 $\beta$  induces macrophage inflammatory protein-1 $\beta$  expression in human hepatocytes. Cellular immunology. 2003;226(1):45-53.
15. Hoffman HM, Wanderer AA. Inflammasome and IL-1 $\beta$ -Mediated Disorders. Current Allergy and Asthma Reports. 2010;10(4):229-235.
16. Hirano T. Interleukin 6 in autoimmune and inflammatory diseases: a personal memoir. HONJO T, ed. Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and Biological Sciences. 2010;86(7):717-730.
17. Peters AT, Kato A, Zhang N, et al. Evidence for altered activity of the il-6 pathway in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. The Journal of allergy and clinical immunology. 2010;125(2):397-403.e10.
18. Doganci A, Eigenbrod T, Krug N et al. The IL-6R  $\alpha$  chain controls lung CD4+CD25+Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. J. of Clinical Investigation. 2005;115(2):313-325.
19. Xu S, Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. Cellular and Molecular Immunology. 2010;7(3):164-174.
20. Trajkovic V, Stosic-Grujicic S, Samardzic T et al. Interleukin-17 stimulates inducible nitric oxide synthase activation in rodent astrocytes. J Neuroimmunol. 2001;119:183-191.
21. Smith NLD, Denning DW. Clinical implications of interferon- $\gamma$  genetic and epigenetic variants. Immunology. 2014;143(4):499-511.
22. Зайцева Г.А., Вершинина О.А., Матрохина О.И. и др. Цитокиновый статус доноров крови и её компонентов. Фундаментальные исследования. – 2011; 3:61-65.
23. Аляхнович Н.С., Новиков Д.К. Взаимодействие диоксида титана с биологическими средами организма. Иммунопатология, аллергология, инфектология – 2016. - №1: 37-42.
24. Аляхнович Н.С., Новиков Д.К. Пищевой краситель и фармацевтик диоксид титана как патоген. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2015; №1: 71-77.

## Сведения об авторах:

Аляхнович Наталья Сергеевна – ассистент кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК Витебского государственного медицинского университета. 210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27, E-mail: all-vgtmu@mail.ru

Поступила 27.09.2016 г.