

## Иммуномодулирующее влияние диоксида титана на фенотип лейкоцитов крови

Н.С. Аляхнович, В.В. Янченко, Д.А. Ребковец, Д.К. Новиков

Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск

## Immunomodulating influence of titanium dioxide on the blood leukocytes phenotype

N.S. Aliakhnovich, U.V. Yanchenko, D.A. Rebkovets, D.K. Novikov

Vitebsk State Medical University, Vitebsk

### Аннотация

**Цель.** Изучить влияние  $TiO_2$  на фенотип лейкоцитов крови.

**Материалы и методы исследования.** Исследовался эффект 0,0005 и 0,005 мг/мл  $TiO_2$  на экспрессию CD3, CD4, CD8, CD25, CD69, CD154, IL10, связанного с рецептором, на Т-лимфоцитах; CD19 на В-лимфоцитах; CD14 на моноцитах; CD63, CD203c на базофилах; рецептора FcεRI на эозинофилах 33 человек: 13 – с острой аллергопатологией (ОА) – острой крапивницей, отеком Квинке, обострением бронхиальной астмы (БА), 12 – с хронической аллергопатологией вне обострения (ХАВО) – контролируемой БА и/или хронической крапивницей, 8 – контрольной группы. Фенотипирование проводилось после инкубации цельной крови с  $TiO_2$  1 час при 20°C.

**Результаты исследования.** Добавление суспензии  $TiO_2$  к цельной гепаринизированной крови дозозависимо снижало экспрессию CD4 на CD25<sup>-</sup>Т-лимфоцитах ( $p < 0,01$ ), CD8 на CD25<sup>-</sup>Т-лимфоцитах ( $p < 0,05$ ), CD14 на моноцитах ( $p < 0,001$ ). 0,005 мг/мл  $TiO_2$  повышало число CD154<sup>+</sup>Т-лимфоцитов ( $p < 0,01$ ), снижало экспрессию CD19 на CD154<sup>-</sup>В-лимфоцитах ( $p < 0,05$ ) и плотность IL10, связанного с рецепторами, на CD19<sup>-</sup>лимфоцитах ( $p < 0,001$ ). При ОА количество CD19<sup>+</sup>CD154<sup>-</sup>В-лимфоцитов в крови было выше ( $p = 0,027$ ), а экспрессия CD69 на CD154<sup>-</sup>Т-лимфоцитах ниже ( $p = 0,027$ ), чем в контроле. В присутствии обеих концентраций  $TiO_2$  и в исходных образцах при ОА экспрессия CD154 на Т-лимфоцитах была ниже, чем при ХАВО ( $p < 0,05$ ). Добавление 0,0005 мг/мл  $TiO_2$  увеличивало экспрессию CD14 на моноцитах ( $p < 0,05$ ) при ХАВО, обеих концентраций – снижало количество CD14<sup>+</sup>моноцитов ( $p < 0,05$ ) при ОА и ХАВО, по сравнению с контролем.

В группе часто контактирующих с  $TiO_2$ , выявлено повышенное количество FcεRI<sup>+</sup>эозинофилов и плотность IL10, связанного с рецепторами, на CD19<sup>-</sup>лимфоцитах, как под действием обеих концентраций  $TiO_2$  ( $p < 0,05$ ), так и в исходных образцах ( $p < 0,05$ ). 0,005 мг/мл  $TiO_2$  повышало относительное количество CD3<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>Т-лимфоцитов ( $p = 0,022$ ), 0,0005 мг/мл  $TiO_2$  увеличивало плотность CD19 на CD154<sup>-</sup>В-лимфоцитах ( $p = 0,037$ ), а обе концен-

### Summary

**Aim.** To study the effect of  $TiO_2$  on the blood leukocyte phenotype.

**Materials and research methods.** The effect of 0.0005 and 0.005 mg/ml  $TiO_2$  on the expression of CD3, CD4, CD8, CD25, CD69, CD154, IL10 bound to the receptor on T-lymphocytes; CD19 on B lymphocytes; CD14 on monocytes; CD63, CD203c on basophils; FcεRI receptor on eosinophils was studied in 33 people: 13 – with acute urticaria, Quincke's edema, exacerbation of bronchial asthma (BA), 12 – with BA and / or chronic urticaria without exacerbation, 8 – control group. Phenotyping was carried out after incubation of whole blood with  $TiO_2$  for 1 hour at 20 °C.

**Results.** Adding a  $TiO_2$  suspension to whole heparinized blood dose-dependently reduced the expression of CD4 on CD25<sup>-</sup>T-cells ( $p < 0.01$ ), CD8 on CD25<sup>-</sup>T-cells ( $p < 0.05$ ), CD14 on monocytes ( $p < 0.001$ ). 0.005 mg/ml  $TiO_2$  increased the number of CD154<sup>+</sup>T cells ( $p < 0.01$ ), decreased the expression of CD19 on CD154<sup>-</sup>B cells ( $p < 0.05$ ) and the density of IL10 associated with the receptors on CD19<sup>-</sup>lymphocytes ( $p < 0.001$ ).

In acute allergic patients the number of CD19<sup>+</sup>CD154<sup>-</sup>B-lymphocytes in blood was higher ( $p = 0.027$ ), and the expression of CD69 on CD154<sup>-</sup>T-lymphocytes was lower ( $p = 0.027$ ) than in the control. In the presence of both  $TiO_2$  concentrations and in the initial samples in acute allergic patients the expression of CD154 on T-lymphocytes was lower than in patients with chronic allergy without exacerbation ( $p < 0.05$ ). The addition of 0.0005 mg/ml  $TiO_2$  increased the expression of CD14 on monocytes ( $p < 0.05$ ) in chronic allergy, both concentrations decreased the number of CD14<sup>+</sup>monocytes ( $p < 0.05$ ) in acute and chronic allergopathology compared with the healthy control.

In the group of frequently contacting with  $TiO_2$ , an increased number of FcεRI<sup>+</sup>eosinophils and a receptor-associated IL10 density on lymphocytes were detected both under the influence of both  $TiO_2$  concentrations ( $p < 0.05$ ) and in the initial samples ( $p < 0.05$ ). 0.005 mg/ml  $TiO_2$  increased the relative amount of CD3<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>T cells ( $p = 0.022$ ), 0.0005 mg/ml  $TiO_2$  increased the density of CD19 on CD154<sup>-</sup>B-cells ( $p = 0.037$ ), and both concentrations stimulated the expression of CD69 on CD154<sup>-</sup>T-lymphocytes ( $p < 0.05$ ) in the group often

трации стимулировали экспрессию CD69 на CD154<sup>+</sup>-Т-лимфоцитах ( $p < 0,05$ ) в группе, часто контактирующих с TiO<sub>2</sub>, по сравнению с контролем.

**Заключение.** TiO<sub>2</sub> оказывал иммуномодулирующее влияние на фенотип лейкоцитов крови *in vitro*, подавляя экспрессию главных маркеров лейкоцитов крови (CD4, CD8, CD14, CD19, плотность IL10, связанного с рецепторами), но повышая количество активных CD154<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов. При острой аллергопатологии регистрировался повышенный уровень CD19<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>-В-лимфоцитов в крови и сниженный – CD14<sup>+</sup>-моноцитов, при хронической – увеличивалась экспрессия активационных маркеров (CD69 и CD154) на Т-лимфоцитах и CD14 на моноцитах. Обследованные, постоянно контактирующие с TiO<sub>2</sub> *in vivo*, имели повышенное количество FcεRI<sup>+</sup>-эозинофилов и экспрессию CD19 на CD154<sup>+</sup>-В-лимфоцитах, CD69 на CD154<sup>+</sup>-Т-лимфоцитах, CD3CD45 на Т-лимфоцитах, IL10, связанного с рецепторами, на CD19<sup>+</sup>-лимфоцитах.

### Ключевые слова

Диоксид титана, фенотип лейкоцитов крови, аллергопатология, иммуномодуляция

### Введение

Диоксид титана (TiO<sub>2</sub>) – краситель белого цвета (E171) разрешен для использования в большинстве категорий продуктов питания, включая молочные продукты, кондитерские изделия (чаще – в составе покрытия для конфет или украшения), жевательные резинки, напитки, приправы, соусы и другие [1]. Также TiO<sub>2</sub> поступает в организм человека с лекарственными, косметическими и гигиеническими средствами (солнцезащитные крема), кроме того, он входит в состав зубочелюстных протезов и медицинских металлоконструкций [1, 2]. До недавнего времени считали, что TiO<sub>2</sub> – инертный краситель, не оказывающий действия на клетки человека.

Причиной, по которой требуется особое внимание в отношении использования TiO<sub>2</sub>, является большой объем его производства и потребления (около 4 миллионов тонн в год), которые продолжают увеличиваться [3]. Например, в Нидерландах или в Германии количество употребленного перорального TiO<sub>2</sub> составляет от 0,5 до 1,1 мг/кг массы тела в день для взрослых и до 1,4–3,2 мг/кг массы тела в день для детей [4, 5]. Другой причиной настороженного отношения к белому красителю является широкий диапазон распределения частиц TiO<sub>2</sub> по размеру в составе пищевой добавки E171 (от 30 до 300 нм), в том числе 17–36% наночастиц (НЧ) с диаметром менее 100 нм [1]. НЧ характеризуются высоким отношением поверхности к массе, из-за чего проявляют повышенную биологическую активность и способность проникать через биологические

in contact with TiO<sub>2</sub>, compared with the control.

**Conclusion.** TiO<sub>2</sub> had an immunomodulatory effect on the blood leukocyte phenotype *in vitro*, inhibiting the expression of the main markers of blood leukocytes (CD4, CD8, CD14, CD19, the density of IL10 associated with receptors), but increasing the number of active CD154<sup>+</sup>-T-lymphocytes. In acute allergopathology there was an increased level of CD19<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>-B-lymphocytes and a reduced level of CD14<sup>+</sup>-monocytes in the blood, in chronic – an increased expression of activation markers (CD69 and CD154) on T-lymphocytes and CD14 on monocytes. The constant contact with TiO<sub>2</sub> *in vivo* increased the number of FcεRI<sup>+</sup>-eosinophils and the expression of CD19 on CD154<sup>+</sup>-B-lymphocytes, CD69 on CD154<sup>+</sup>-T-lymphocytes, CD3CD45 on T-lymphocytes and IL10 associated with receptors, on CD19<sup>+</sup>-lymphocytes.

### Keywords

Titanium dioxide, blood leukocyte phenotype, allergopathology, immunomodulation

барьеры, в том числе слизистую оболочку кишечника [6].

Несколько десятилетий назад наноразмерные частицы TiO<sub>2</sub> стали успешно применяться в покрытиях упаковочных материалов, так как лучше защищают от механического повреждения и микробного загрязнения и превосходят частицы большего размера в отношении оптимизации цвета, текстуры и консистенции [6]. При этом безопасность использования НЧ TiO<sub>2</sub> в пищевых и фармацевтических продуктах и допустимое количество его потребления без вредных эффектов для здоровья остается актуальным вопросом [7, 8].

Биологическая активность НЧ TiO<sub>2</sub> кроме прочих факторов зависит от пути экспозиции [9]. При попадании частиц TiO<sub>2</sub> в организм в качестве пищевой добавки E171 через желудочно-кишечный тракт они связываются с белками и ферментами, изменяя их свойства и характеристики в различных условиях pH-среды [10]. Показано, что муцин абсорбирует частицы TiO<sub>2</sub> и снижает их склонность к агрегации и осаждению из-за уменьшения электростатического и гидрофобного отталкивания (измерено с помощью электрофореза, изотермического титрования, микроскопического и калориметрического анализа) [11]. Взаимодействие TiO<sub>2</sub>-белок может увеличить способность частиц проникать через слой слизи. Связывание с белками является важным фактором для клеточного поглощения НЧ TiO<sub>2</sub> [12], прохождения через эпителий транс-клеточным путем (эндоцитозом) или парацел-

люлярно через межклеточные соединения. При этом  $TiO_2$  может оказывать токсические эффекты на клетки, изменять их функцию, поступать в кровообращение или участвовать в М-клеточном транцитозе макромолекул [10].

Дополнительным вариантом попадания НЧ  $TiO_2$  в желудочно-кишечный тракт является вдыхание и дальнейшее проглатывание слизи из дыхательных путей. В эксперименте при поступлении  $TiO_2$  ингаляционно 30-50% НЧ, меченных радиоизотопами, обнаружены в кишечнике [3].

Частицы  $TiO_2$  взаимодействуют с белками лимфы и крови – сывороточным альбумином, аполипопротеинами, белками комплемента и другими [13, 14]. Было обнаружено, что бычий сывороточный альбумин лучше стабилизирует суспензию НЧ  $TiO_2$ , чем вода или фосфатно-солевой буфер [15]. Более того, связывание  $TiO_2$  с белками или клетками усиливает его антигенные свойства [16, 17].

Среди патологических эффектов, описанных для частиц  $TiO_2$ , наиболее распространенным является окислительный стресс с последующим повреждением клеточной мембраны, развитием воспалительного ответа и мутацией генов [18, 19, 20].

Пероральное введение частиц  $TiO_2$  разных размеров способствовало увеличению количества дендритных клеток в Пейеровых бляшках и уменьшало количество регуляторных Т-клеток и Т-хелперов за счет дозозависимого цитотоксического и антипролиферативного эффекта. Частицы  $TiO_2$  стимулировали секрецию  $IFN-\gamma$  в Пейеровых бляшках и увеличивали продукцию  $IFN-\gamma$  и  $IL-17$  в селезенке. Длительное (в течение 100 дней) непрерывное поступление  $TiO_2$  с питьевой водой вызывало опухолевое поражение толстой кишки у крыс [21].

Вопрос о влиянии  $TiO_2$  на лиганд-рецепторное взаимодействие в организме человека поможет изучить молекулярные аспекты иммунологии простых веществ в условиях их постоянного поступления с пищей и лекарствами.

*Цель.* Изучить влияние диоксида титана в разных концентрациях на фенотип лейкоцитов крови.

### Материалы и методы исследования

В исследовании приняли участие 33 человека, из них 25 пациентов (76%) аллергологического отделения – 13 (52%) человек находились в остром периоде заболевания (острая крапивница, отек Квинке, обострение бронхиальной астмы), 12 (48%) – плановые пациенты (бронхиальная астма,

контролируемая форма, хроническая крапивница вне обострения), 8 человек (24%) – контрольная группа – относительно здоровые люди. Средний возраст обследованных составил 42 [38; 46] года. Соотношение по полу – 25 женщин (76%) и 8 мужчин (24%).

Все участники заполняли анкету о наличии и частоте контактов с продуктами и средствами, содержащими  $TiO_2$  (употребление жевательных резинок, сладостей, использование солнцезащитных кремов), а также о реакциях на металлические изделия, косметику, гигиенические и лекарственные средства ранее в их жизни. Соответственно ответам респонденты были разделены на группы: «часто и редко контактирующие с  $TiO_2$ », «угрожаемые по непереносимости  $TiO_2$  и нет».

Наличие CD-маркеров и рецепторов на  $CD45^+$ -лейкоцитах цельной крови определялось проточной цитофлюориметрией. Сравнивалась экспрессия  $CD3$ ,  $CD4$ ,  $CD8$  на Т-лимфоцитах;  $CD19$  на В-лимфоцитах;  $CD14$  на моноцитах; маркеров активации базофилов –  $CD63$ ,  $CD203c$ ; маркеров активации лимфоцитов –  $CD25$ ,  $CD69$ ,  $CD154$ ; рецептора  $Fc\epsilon RI$  для иммуноглобулина Е на эозинофилах; количество  $IL10$ , связанного с рецептором, на лимфоцитах, до и после воздействия разных концентраций диоксида титана.

Мы исследовали влияние диоксида титана в усредненном количестве, потребляемом человеком с продуктами питания за сутки [2], – 0,0005 мг/мл (рабочая концентрация (РК)) и 0,005 мг/мл (предельно допустимая концентрация (ПДК)), в пересчете – 0,5 и 5 мг/кг массы тела. Учитывая тот факт, что  $TiO_2$  нерастворим в воде, но при добавлении к сыворотке, плазме, панкреатическому соку, альбумину образует относительно стабильную суспензию [14], мы изучали его действие в цельной гепаринизированной крови. Суспензии  $TiO_2$  двух концентраций готовились на физиологическом растворе. В качестве контроля использовали пробы без добавления  $TiO_2$ . Фенотипирование клеток производилось на проточном цитометре Cytomics FC 500 (Beckman Coulter Inc., США) после инкубации образцов цельной крови с суспензией  $TiO_2$  в течение 1 часа при 20°C. В каждом образце подсчитывалось не менее 30 000 клеток. Статистические расчеты проводились в программе STATISTICA 10.0 параметрическими и непараметрическими методами с учетом типа распределения данных.

### Результаты исследования

По данным анкетирования 30 человек (3 человека не участвовали в опросе) сформированы

группы «часто и редко контактирующие с TiO<sub>2</sub>» (употребление жевательных резинок и/или сладостей более 1 раза в неделю, использование солнцезащитного крема и средств декоративной косметики). Оказалось, что большинство респондентов потенциально часто контактируют с диоксидом титана – 21 (70%) обследованных. Только 9 (30%) человек отрицали частое потребление и использование средств, содержащих E171. Соотношение женщин и мужчин внутри этих групп составило 70 на 30 %.

Анализ по группам пациентов, «угрожаемых по непереносимости TiO<sub>2</sub> и нет», показал, что 19 (63%) имели данные о наличии лекарственной аллергии и/или контактной аллергии на металлы. 37% не имели отягощенного аллергоанамнеза по лекарственной и/или контактной аллергии.

Фенотипирование лейкоцитов показало, что TiO<sub>2</sub> в концентрациях 0,0005 мг/мл и 0,005 мг/мл уменьшал экспрессию CD4 маркеров на CD25<sup>-</sup>-Т-лимфоцитах (T-test: p<sub>пдк-к</sub> < 0,001, p<sub>рк-к</sub> = 0,008). При этом более высокая концентрация TiO<sub>2</sub> снижала экспрессию CD4 в большей степени (T-test: p<sub>пдк-рк</sub> = 0,01) (Табл. 1).

После воздействия на клетки цельной крови в течение 1 часа TiO<sub>2</sub> в концентрациях 0,0005 мг/мл и 0,005 мг/мл уменьшал плотность CD8 на CD25<sup>-</sup>-Т-лимфоцитах (T-test: p<sub>пдк-к</sub> = 0,03, p<sub>рк-к</sub> = 0,047) (Табл. 1).

TiO<sub>2</sub> в обеих концентрациях оказывал дозозависимое иммуносупрессивное действие на экспрессию CD14 на моноцитах крови (T-test: p<sub>пдк-к</sub> < 0,001, p<sub>рк-к</sub> < 0,001, p<sub>пдк-рк</sub> = 0,011).

Суспензия TiO<sub>2</sub> в максимальной концентрации (0,005 мг/мл) уменьшала плотность IL10, связанного с рецепторами, на CD19<sup>-</sup>-лимфоцитах, по сравнению с исходными образцами (T-test: p<sub>пдк-к</sub> = 0,001) и меньшей концентрацией (0,0005 мг/мл) (p<sub>пдк-рк</sub> = 0,01) (Табл. 1).

Максимальная среднесуточная концентрация суспензии TiO<sub>2</sub> (0,005 мг/мл) увеличивала количество Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер активации – CD154, по сравнению с контрольными пробами (Wilcoxon test: p<sub>пдк-к</sub> = 0,01) (Табл. 1). Аналогично, добавление 0,005 мг/мл TiO<sub>2</sub> к цельной крови снижало экспрессию CD19 на CD154<sup>-</sup>-В-лимфоцитах (Wilcoxon test: p<sub>пдк-к</sub> = 0,005) (Табл. 1).

Имелась избирательность влияния TiO<sub>2</sub>. Абсолютное количество CD25<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>, CD63<sup>+</sup>CD203c<sup>+</sup>, CD63<sup>+</sup>, CD203c<sup>-</sup> - позитивных клеток, а также эозинофилов с FcεRI под действием 0,005 мг/мл и 0,0005 мг/мл TiO<sub>2</sub> не изменялось, по сравнению с контрольными пробами.

Таким образом, TiO<sub>2</sub> в концентрациях (0,0005 и 0,005 мг/мл), в среднем ежедневно поступающих в организм человека перорально, при инкубировании в течение 1 часа с цельной кровью оказывал дозозависимое иммуносупрессивное действие, снижая количество CD4 и CD8 маркеров на CD25<sup>-</sup>-Т-лимфоцитах, CD14 - на моноцитах крови, по сравнению с контрольными пробами. Кроме того, максимально поступающее количество TiO<sub>2</sub> (5 мг/кг) за сутки снижало экспрессию CD19 на CD154<sup>-</sup>-В-лимфоцитах, уменьшало плотность IL10, связанного с рецепторами, на CD19<sup>-</sup>-лимфоцитах и увеличивало количество CD154<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов *in vitro*.

При сравнении показателей экспрессии поверхностных молекул на лейкоцитах крови у пациентов аллергологического отделения с острым (1) или хроническим (2) заболеванием вне обострения и контрольной группой (0) получены следующие результаты.

Абсолютное количество CD19<sup>+</sup>CD154<sup>-</sup>-В-лимфоцитов в контрольных пробах без добавления TiO<sub>2</sub> между тремя группами различалось

**Таблица 1. Влияние суспензии TiO<sub>2</sub> на фенотип лейкоцитов крови**

Маркер, единицы измерения	Концентрация TiO <sub>2</sub>		
	ПДК, 0,005 мг/мл M [-ДИ; +ДИ]	РК, 0,0005 мг/мл M [-ДИ; +ДИ]	Контроль M [-ДИ; +ДИ]
CD4 на CD25 <sup>-</sup> -Т-лимфоцитах, %	5,4 [4,7; 6,1] <sup>***к</sup>	5,5 [4,8; 6,2] <sup>**к, пдк</sup>	5,7 [4,9; 6,4]
CD8 на CD25 <sup>-</sup> -Т-лимфоцитах, %	25,6 [23,0; 28,3] <sup>*к</sup>	25,9 [23,7; 28,1] <sup>*к</sup>	26,4 [24,1; 28,9]
CD14 на моноцитах, %	20,8 [18,9; 22,6] <sup>***к</sup>	21,4 [19,6; 23,2] <sup>***к, *пдк</sup>	22,3 [20,4; 24,1]
CD19 на CD154 <sup>-</sup> -В-лимфоцитах, %	2,1 [1,8; 2,4] <sup>**к</sup>	2,2 [2,0; 2,5]	2,3 [2,0; 2,6]
IL10, связанный с рецепторами, на CD19 <sup>-</sup> -лимфоцитах, %	4,1 [3,2; 4,2] <sup>***к</sup>	4,2 [3,3; 4,4] <sup>*пдк</sup>	4,3 [3,4; 4,6]
CD154 <sup>+</sup> -Т-лимфоциты, кл.	3709 [979; 6439] <sup>**к</sup>	3480 [1017; 5944]	3343 [938; 5747]

Примечание: \* – p < 0,05; \*\* – p < 0,01; \*\*\* – p < 0,001, РК - рабочая концентрация, ПДК - предельно допустимая концентрация

(Kruskal-Wallis ANOVA:  $p=0,038$ ): при остром (1) аллергическом заболевании было самым высоким, в контрольной группе (0) – самым низким (Рис. 1). Между количеством CD19<sup>+</sup>CD154<sup>-</sup>-В-лимфоцитов у пациентов с острым или хроническим аллергическим заболеванием и контрольной группой установлены значимые различия (M-U:  $p_{к1-0}=0,027$ ,  $p_{к2-0}=0,049$ ).

У пациентов с острой крапивницей, отеком Квинке или обострением бронхиальной астмы экспрессия CD154 на Т-лимфоцитах была значительно ниже, чем у обследованных с хроническими аллергическими болезнями вне обострения, как в присутствии TiO<sub>2</sub>, так и в образцах без его добавления (M-U:  $p_{пдк}=0,028$ ,  $p_{рк}=0,018$ ,  $p_{к}=0,018$ ) (Рис. 2).

Экспрессия активационного маркера CD69 на CD154<sup>-</sup>-Т-лимфоцитах при острой аллергопатологии также была значительно ниже, чем при хронических аллергических заболеваниях вне обострения (M-U:  $p_{к}=0,018$ ) (Рис. 3).

Между группами пациентов с острой или хронической аллергопатологией и контрольной в пробах с TiO<sub>2</sub> наблюдались значимые различия в количестве CD14<sup>+</sup>-моноцитов (Kruskal-Wallis ANOVA:  $p_{пдк}=0,044$ ,  $p_{рк}=0,007$ ) и экспрессии CD14 на моноцитах (Kruskal-Wallis ANOVA:  $p_{рк}=0,032$ ) (Рис. 4, Рис. 5).

В присутствии 0,0005 мг/мл и 0,005 мг/мл TiO<sub>2</sub> число CD14<sup>+</sup>-моноцитов крови было наименьшим при остром аллергическом заболевании (M-U:  $p_{рк1-2}=0,034$ ,  $p_{рк1-0}=0,014$ ) и низким при

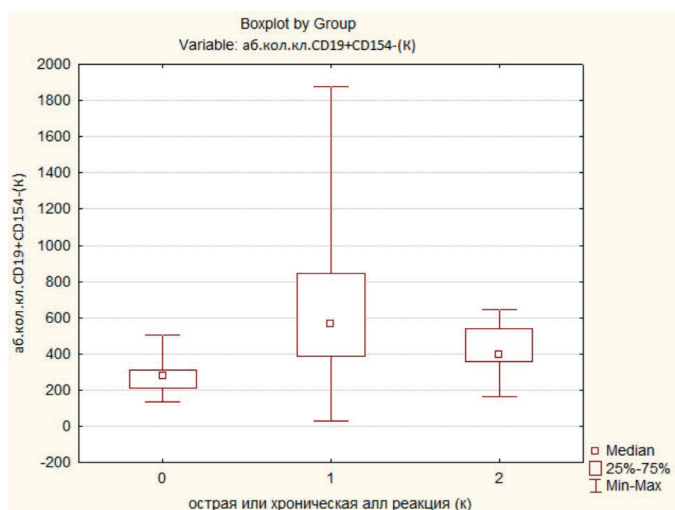


Рис. 1. Количество CD19<sup>+</sup>CD154<sup>-</sup>-В-лимфоцитов у пациентов с острым (1) или хроническим (2) аллергическим заболеванием и обследованными контрольной группы (0) в исходных образцах

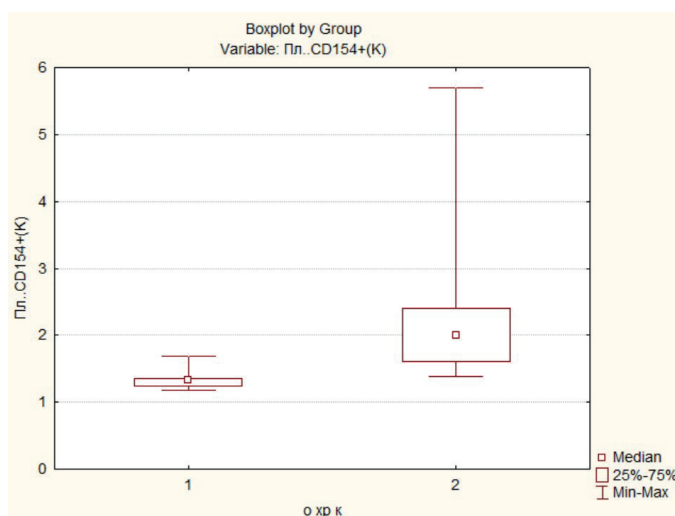


Рис. 2. Экспрессия CD154 на Т-лимфоцитах у пациентов с острым (1) или хроническим (2) аллергическим заболеванием

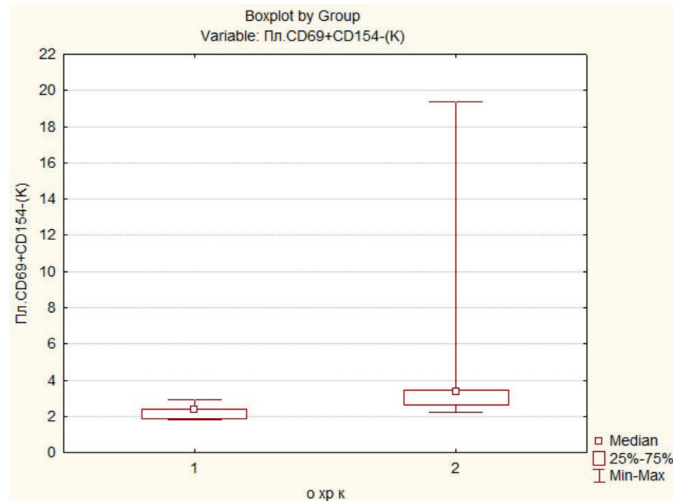


Рис. 3. Экспрессия CD69 на CD154<sup>+</sup>-Т-лимфоцитах у пациентов с острым (1) или хроническим (2) аллергическим заболеванием в исходных образцах крови

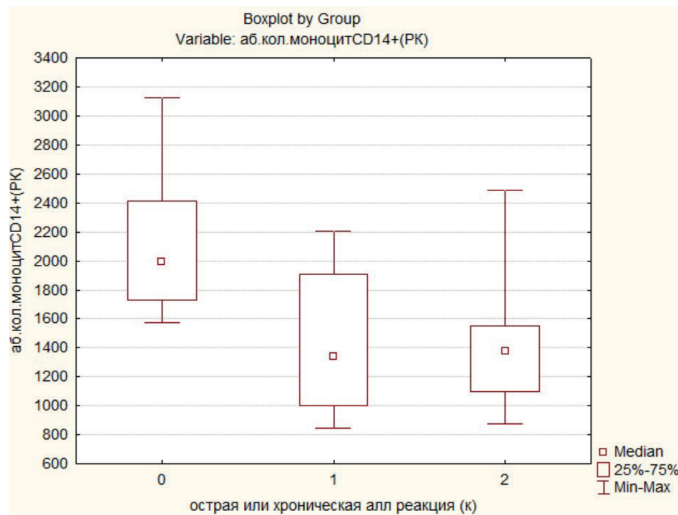


Рис. 4. Количество CD14<sup>+</sup>-моноцитов у пациентов с острым (1) или хроническим (2) аллергическим заболеванием и обследованных контрольной группы (0) под воздействием 0,005 мг/мл TiO<sub>2</sub>

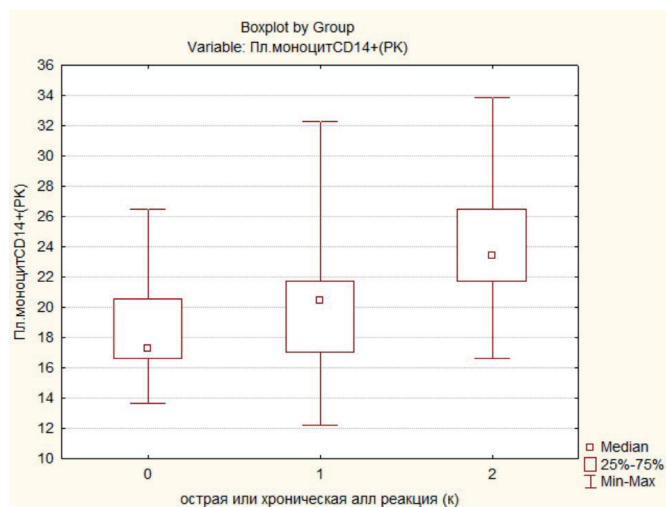


Рис. 5. Экспрессия CD14 на моноцитах у пациентов с острым (1) или хроническим (2) аллергическим заболеванием и обследованных контрольной группы (0) под воздействием 0,0005 мг/мл TiO<sub>2</sub>

хронической аллергопатологии вне обострения (М-У:  $p_{pk0-2}=0,002$ ,  $p_{пдк0-2}=0,011$ ), по сравнению с контрольной группой (Рис. 4).

В то же время экспрессия CD14 на моноцитах под воздействием 0,0005 мг/мл  $TiO_2$  при хроническом аллергическом заболевании была наибольшей, по сравнению с пациентами с острой аллергией и контрольной группой (М-У:  $p_{pk1-2}=0,034$ ,  $p_{pk0-2}=0,025$ ) (Рис. 5).

Между другими исследованными маркерами лейкоцитов крови достоверных различий внутри групп не обнаружено.

Таким образом, при острых аллергических заболеваниях (острая крапивница, отек Квинке, обострение бронхиальной астмы) количество  $CD19^+CD154^-$ -В-лимфоцитов максимальное, при хронической аллергопатологии повышено, по сравнению с контрольной группой в исходных образцах. В то же время экспрессия CD69 на  $CD154^-$ -Т-лимфоцитах при острой аллергопатологии снижалась, по сравнению с хроническим аллергическим заболеванием вне обострения в образцах без  $TiO_2$ , а экспрессия CD154 на Т-лимфоцитах – как в присутствии  $TiO_2$ , так и в исходных образцах. В присутствии  $TiO_2$  при острой и хронической аллергопатологии снижалось количество  $CD14^+$ -моноцитов, при хронической – увеличивалась экспрессия CD14 на моноцитах, по сравнению с контрольной группой.

Обнаружены различия в фенотипах лейкоцитов крови обследованных, часто и редко контактирующих с  $TiO_2$ . Они сохранялись, как при воздействии  $TiO_2$ , так и в исходных образцах (Табл. 2).

Как при инкубации с  $TiO_2$ , так и в контрольных образцах без добавления  $TiO_2$  количество эозинофилов, экспрессирующих рецептор FcεRI, было выше в группе часто контактирующих с  $TiO_2$ , по сравнению с контролем (М-У:  $p_{пдк}=0,014$ ,  $p_{pk}=0,017$ ,  $p_k=0,013$ ) (Табл. 2).

Во всех образцах плотность IL10, связанного с рецептором, увеличивалась у обследованных, часто контактирующих с  $TiO_2$  (Т-test:  $p_{пдк}=0,016$ ,  $p_{pk}=0,027$ ,  $p_k=0,025$ ) (Табл. 2).

Инкубация с 0,0005 мг/мл  $TiO_2$  вызывала повышение экспрессии CD19 на  $CD154^-$ -В-лимфоцитах в большей степени у обследованных, часто контактирующих с  $TiO_2$  (Т-test:  $p_{pk}=0,037$ ), по сравнению с аналогичной в группе лиц, редко контактирующих с E171 (Табл. 2).

Добавление  $TiO_2$  в обеих концентрациях стимулировало экспрессию CD69 на  $CD154^-$ -Т-лимфоцитах в группе, часто контактирующих с E171, по сравнению с контролем (Т-test:  $p_{pk}=0,048$ ,  $p_{пдк}=0,037$ ) (Табл. 2).

В присутствии 0,005 мг/мл  $TiO_2$  плотность  $CD3^+CD45^+$  на Т-лимфоцитах была выше в группе, часто контактирующих с E171 (Т-test:  $p_{пдк}=0,022$ ) (Табл. 2).

**Таблица 2. Различие в экспрессии маркеров на клетках крови в группах «часто контактирующие с  $TiO_2$ » и «редко контактирующие с  $TiO_2$ »**

Экспрессия лейкоцитарных маркеров, единицы измерения (концентрация $TiO_2$ )	Группа, количество обследованных, контактирующих с $TiO_2$	
	часто	редко
	n=21	n=9
Количество FcεRI <sup>+</sup> -эозинофилов, кл. (ПДК)	179 [107; 250]*	79 [39; 119]
Количество FcεRI <sup>+</sup> -эозинофилов, кл. (PK)	169 [90; 248]*	87 [8; 165]
Количество FcεRI <sup>+</sup> -эозинофилов, кл. (K)	184 [100; 269]*	86 [29; 143]
	n=21	n=9
Плотность IL10, связанного с рецепторами, % (ПДК)	4,4 [2,4; 5,7]*	3,5 [2,7; 4,2]
Плотность IL10, связанного с рецепторами, % (PK)	4,4 [2,6; 6,3]*	3,6 [2,8; 4,4]
Плотность IL10, связанного с рецепторами, % (K)	4,5 [2,8; 6,3]*	3,7 [2,9; 4,5]
	n=17	n=6
Плотность CD19 на $CD154^-$ -В-лимфоцитах, % (PK)	2,4 [2,1; 2,7]*	1,8 [1,6; 2,0]
	n=5	n=3
Плотность $CD69^+CD154^-$ на Т-лимфоцитах, % (ПДК)	3,5 [2,4; 4,6]*	2,0 [2,0; 2,1]
Плотность $CD69^+CD154^-$ на Т-лимфоцитах, % (PK)	3,2 [2,4; 4,0]*	2,2 [1,8; 2,6]
	n=5	n=3
Плотность $CD3^+CD45^+$ на Т-лимфоцитах, % (ПДК)	7,1 [5,8; 8,3]*	4,9 [2,7; 7,1]

Примечание: \* –  $p < 0,05$  – различие, по сравнению, с обследованными, не контактирующими с диоксидом титана

Таким образом, обнаружено, что количество  $Fc\epsilon RI^+$ -эозинофилов и плотность  $IL10$ , связанного с рецепторами, на лимфоцитах выше в группе, часто контактирующих с  $TiO_2$ .

Среднесуточная концентрация  $TiO_2$  (0,0005 мг/мл) стимулировала экспрессию  $CD19$  на  $CD154^-$ -В-лимфоцитах, 0,005 мг/мл  $TiO_2$  увеличивало плотность  $CD3^+CD45^+$  на Т-лимфоцитах в группе, обе концентрации повышали плотность  $CD69$  на  $CD154^-$ -Т-лимфоцитах у часто контактирующих с  $E171$ .

В группах пациентов, угрожаемых по непереносимости  $TiO_2$  по данным анамнеза о наличии лекарственной гиперчувствительности и/или аллергии на металлы, фенотипирование лейкоцитов крови не выявило различий в экспрессии исследуемых маркеров.

### Выводы

1. Диоксид титана в концентрациях 0,005 и 0,0005 мг/мл снижал плотность  $CD4$  и  $CD8$  на  $CD25^-$ -Т-лимфоцитах,  $CD14$  на моноцитах; в концентрации 0,005 мг/мл ингибировал экспрессию  $CD19$  на  $CD154^-$ -В-лимфоцитах и плотность  $IL10$ , связанного с рецепторами, на  $CD19^-$ -лимфоцитах, но увеличивало количество  $CD154^+$ -Т-лимфоцитов *in vitro*.
2. Иммуномодулирующие эффекты диоксида титана имели дозозависимый характер – большая концентрация значительно изменяла экспрессию  $CD4$ ,  $CD8$ ,  $CD19$ ,  $CD14$ ,  $CD154$  маркеров лейкоцитов и  $IL10$ , связанного с рецепторами.

### Литература

1. Ropers M-H, Terrisse H, Mercier-Bonin M. et al. Titanium Dioxide as Food Additive, Application of Titanium Dioxide. *Magdalena Janus, IntechOpen*, 2017. DOI: 10.5772/intechopen.68883.
2. Weir A, Westerhoff P, Fabricius L. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ Sci Technol*. 2012;10:2242-2250. DOI: 10.1021/es204168d.
3. Shi H, Magaye R, Castranova V. et al. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology*. 2013;10:15. DOI: 10.1186/1743-8977-10-15.
4. Baranowska-Wójcik, E., Szwajgier, D., Oleszczuk, P. et al. Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles Exposure on Human Health – a Review. *Biological Trace Element Research*. 2020; 193: 118-129. DOI: 10.1007/s12011-019-01706-6.
5. Bachler G, von Goetz N, Hungerbuhler K. Using physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling for dietary risk assessment of titanium dioxide ( $TiO_2$ ) nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2015;9(3):373-380. DOI: 10.3109/17435390.2014.940404.
6. Winkler HC, Notter T, Meyer U. et al. Critical review of the safety assessment of titanium dioxide additives in food. *J*

3. Обнаружено, что при острой аллергопатологии (острая крапивница, отек Квинке, обострение бронхиальной астмы) было повышено количество  $CD19^+CD154^-$ -В-лимфоцитов и понижена экспрессия  $CD69$  на  $CD154^-$ -Т-лимфоцитах, по сравнению с контролем в исходных образцах крови. При добавлении 0,0005 и 0,005 мг/мл  $TiO_2$  и без него понижена экспрессия  $CD154$  на Т-лимфоцитах в группе пациентов с острой аллергопатологией, относительно хронической вне обострения. В присутствии 0,0005 мг/мл  $TiO_2$  при хронической аллергопатологии увеличивалась экспрессия  $CD14$  на моноцитах, а добавление 0,0005 мг/мл и 0,005 мг/мл  $TiO_2$  снижало количество  $CD14^+$ -моноцитов у пациентов с острым и хроническим аллергическим заболеванием.
4. В группе обследованных, часто контактирующих с  $E171$  (употребление жевательных резинок, сладостей, использование косметики и солнцезащитных кремов), было повышено количество  $Fc\epsilon RI^+$ -эозинофилов и плотность  $IL10$ , связанного с рецепторами, на лимфоцитах, как под действием обеих концентраций  $TiO_2$ , так и в исходных образцах. 0,0005 мг/мл  $TiO_2$  увеличивало экспрессию  $CD19$  на В-лимфоцитах, 0,005 мг/мл  $TiO_2$  повышало относительное количество  $CD3^+CD45^+$ -Т-лимфоцитов, а обе концентрации стимулировали экспрессию  $CD69$  на  $CD154^-$ -Т-лимфоцитах в группе, часто контактирующих с  $TiO_2$ , по сравнению с редко контактирующими с  $E171$ .

*Nanobiotechnology*. 2018;16(1):51. DOI: 10.1186/s12951-018-0376-8.

7. Jovanović B. Critical Review of Public Health Regulations of Titanium Dioxide, a Human Food Additive. *Integrated Environmental Assessment and Management*. 2015;11(1):10-20. DOI: 10.1002/ieam.1571.

8. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food. Scientific opinion on the re-evaluation of titanium dioxide (E 171) as a food additive. *EFSA Journal*. 2016;14(9):83. DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4545.

9. Berin MC, Sampson HA. Mucosal Immunology of Food Allergy. *Current biology*: CB. 2013;23(9):R389-R400. DOI: 10.1016/j.cub.2013.02.043.

10. Brun E, Barreau F, Veronesi G. Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. *Particle and Fibre Toxicology*. 2014;11:13. DOI: 10.1186/1743-8977-11-13.

11. Hualu Zhou, Janam K. Pandya, Yunbing Tan. Role of Mucin in Behavior of Food-Grade  $TiO_2$  Nanoparticles under Simulated Oral Conditions. *J. Agric. Food Chem*. 2019; 67: 5882–5890. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b01732.



12. Allouni ZE, Gjerdet NR, Cimpan MR. et al. The effect of blood protein adsorption on cellular uptake of anatase TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *International J. Nanomedicine*. 2015;10:687-695. DOI: 10.2147/IJN.S72726.
13. Deng ZJ, Mortimer G, Schiller T. Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles. *Nanotechnology*. 2009; 20(45): 455101. DOI: 10.1088/0957-4484/20/45/455101.
14. Аляхнович Н.С., Новиков Д.К. Взаимодействие диоксида титана с биологическими средами организма. *Иммунопатол., аллергол., инфектол.* 2016;1:37-42. DOI: 10.14427/jipai.2016.1.37.
15. Taurozzi JS, Hackley VA, Wiesner MR. A standardised approach for the dispersion of titanium dioxide nanoparticles in biological media. *Nanotoxicology*. 2013;7:4, 389-401. DOI: 10.3109/17435390.2012.665506.
16. Gefen T, Vaya J, Khatib S. The effect of haptens on protein-carrier immunogenicity. *Immunology*. 2015;144(1):116-126. DOI: 10.1111/imm.12356.
17. Аляхнович Н.С., Новиков Д.К. Красители в лекарствах и пищевых продуктах – потенциальные иммуномодуляторы. *Медицинская Иммунология*. 2019;2(21):312-322. DOI: 10.15789/1563-0625-2019-2-313-322.
18. Madl AK, Pinkerton KE. Health effects of inhaled engineered and incidental nanoparticles. *Crit Rev Toxicol*. 2009;39:629-658. DOI: 10.1080/10408440903133788.
19. Wang J, Li N., Zheng L. et al. P38-Nrf-2 Signaling Pathway of Oxidative Stress in Mice Caused by Nanoparticulate TiO<sub>2</sub>. *Biological Trace Element Research*. 2010;140(2):186-197. DOI: 10.1007/s12011-010-8687-0.
20. Masoud R, Bizouarn T, Trepout S. et al. Titanium Dioxide Nanoparticles Increase Superoxide Anion Production by Acting on NADPH Oxidase. *PLOS ONE*. 2015;10(12):e0144829. DOI: 10.1371/journal.pone.0144829.
21. Bettini S, Boutet-Robinet E, Cartier C. Food-grade TiO<sub>2</sub> impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. *Sci Rep*. 2017;7:40373. DOI: 10.1038/srep40373.

#### Сведения об авторах:

Аляхнович Наталья Сергеевна – к.м.н, доцент кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК Витебского государственного медицинского университета.

Янченко Владимир Вилиянович – доцент, к.м.н., доцент кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК Витебского государственного медицинского университета.

Ребковец Дарья Александровна – студентка 5 курса Витебского государственного медицинского университета.

Новиков Дмитрий Кузьмич – профессор, д.м.н, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК Витебского государственного медицинского университета.

Адрес для корреспонденции: 210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27, E-mail: all-vgmu@mail.ru тел. 8 (0212) 575380

Поступила 29.11.2019 г.