

Стимуляция диоксидом титана фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови

Н.С. Аляхнович

Витебский государственный медицинский университет, г.Витебск

Titanium dioxide stimulates phagocytes activity of blood neutrophils

N.S. Aliakhnovich

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Аннотация

Цель. Оценка влияния TiO_2 на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови.

Материалы и методы исследования. Обследовано 17 человек - 10 человек с верифицированной по международным критериям atopической бронхиальной астмой (ж/м - 5/5, средний возраст - 38[28;48] лет), вторая группа (контрольная) 7 человек - здоровые добровольцы (ж/м - 3/4, средний возраст - 23[21;26] лет).

У всех обследованных подсчитывался фагоцитарный индекс и активность нейтрофилов в НСТ-тесте. В исследуемые пробы добавляли 0,008% раствор TiO_2 (из расчета на 1 мг/кг массы тела), контрольные пробы ставились с добавлением физиологического раствора, стандартные - со взвесью убитого *Staphylococcus aureus*. Все пробы инкубировались 30 минут при 37°C, готовые мазки микрофотографировались с подсчетом количества формазаноположительных гранулоцитов в НСТ-тесте и клеток, поглотивших 1 и более частиц *Stf*, на 100 гранулоцитов. Результаты исследования. TiO_2 стимулировал фагоцитоз стафилококка нейтрофилами крови у 53% обследованных на 8-30% ($p=0,02$). Под влиянием TiO_2 активность фагоцитов значительно увеличивалась, по сравнению с таковой в спонтанном НСТ-тесте ($p=0,0001$), но была ниже, чем при индукции стафилококком ($p=0,049$).

У обследуемых с аллергопатологией TiO_2 стимулировал фагоцитоз стафилококка и активность нейтрофилов в НСТ-тесте также эффективно, как и культура стафилококка (31,2% по сравнению с 34,3%).

В группе здоровых людей раствор TiO_2 усиливал активность нейтрофилов в НСТ-тесте, по сравнению с ФР (в среднем и в 71% случаев на 10-18%), но в меньшей степени, чем культура стафилококка (24%, по сравнению с 39,7%). Среди здоровых людей имелась корреляция между отягощенной наследственностью по аллергии и величиной активности нейтрофилов в НСТ-тесте с TiO_2 (0,78).

Выводы. Установлено, что 0,008 % раствор TiO_2 стимулировал активность нейтрофилов в НСТ-тесте, как больных atopической бронхиальной астмой, так и здоровых людей

Summary

The aim. Evaluation of the TiO_2 effect on the phagocytic activity of peripheral blood neutrophils.

Materials and methods. 17 people were examined - 10 people with atopical bronchial asthma (m/f - 5/5, mean age - 38 [28, 48]), verified according to the international criteria, the second group (control) - 7 people - healthy controls (m/f - 3/4, mean age - 23 [21; 26] years).

The phagocytic index and neutrophil activity in the NBT-test were calculated for all the examined patients. 0.008% solution of TiO_2 (based on 1 mg / kg of body weight) was added to the test-samples, control samples were added with the physiological solution, standard samples - with a suspension of killed *Staphylococcus aureus*. All the samples were incubated for 30 minutes at 37°C, the ready smears were microscopied with counting the amount of formazan-positive granulocytes in the NST-test and cells that absorbed 1 or more *Stf* particles per 100 granulocytes.

Results. TiO_2 stimulated phagocytosis of staphylococcus with blood neutrophils in 53% of the examined patients by 8-30% ($p = 0.02$). Under the influence of TiO_2 activity of phagocytes significantly increased, in comparison with that in spontaneous NST-test ($p = 0.0001$), but was lower than induction by staphylococcus ($p = 0.049$).

In patients with allergopathology, TiO_2 stimulated phagocytosis of staphylococcus and neutrophil activity in the NBT-test was also effective, as was the culture of staphylococcus aureus (31.2% compared to 34.3%).

In the healthy group, the TiO_2 solution increased the activity of neutrophils in the NST-test, compared with the physiological solution (on average and in 71% of cases by 10-18%), but not so than the culture of staphylococcus (24%, compared to 39, 7%). Among healthy people, there was a correlation between the hereditary of allergy and the neutrophil activity in the NBT-test with TiO_2 (0.78).

Conclusions. It was found that 0.008% solution of TiO_2 stimulated the activity of neutrophils in the NBT-test, both in patients with atopical bronchial asthma and healthy people after 30 minutes of incubation in a thermostat. In patients

после 30 минут инкубации в термостате. У больных с аллергией TiO_2 усиливал фагоцитоз стафилококка, а также метаболическую активность нейтрофилов наравне со стафилококком. Обнаружена сильная корреляция между отягощенной наследственностью по аллергии и усилением метаболической активности фагоцитов крови в НСТ-тесте с TiO_2 у здоровых лиц.

Ключевые слова

Диоксид титана, TiO_2 , фагоцитоз, НСТ-тест

В настоящее время растет интерес к изучению воздействия пищевых красителей на систему иммунитета человека. В отношении тартразина, кармуазина, понсо, сансета показано их иммуномодулирующее воздействие на киллинг, поглощение и метаболическую активность фагоцитов крови человека в концентрациях, соответствующих гигиеническим нормам [1, 2].

В отличие от достаточно изученных пищевых азокрасителей, диоксид титана, белый пигмент с простой химической структурой (TiO_2), до недавнего времени считался безвредным веществом. В последние десятилетия появились сообщения об токсикопатогенных, канцергенных, дисметаболических и иммунопатогенных свойствах TiO_2 [3].

Среди многообразных влияний на систему иммунитета отмечают иммуномодулирующие эффекты TiO_2 на фагоцитоз. В экспериментах на животных поступление частиц TiO_2 при дыхании вызывало повреждение клеточной структуры и нарушение функции альвеолярных макрофагов, проявляющуюся в снижении хемотаксиса, уменьшении экспрессии Fc-рецепторов и молекул МНС II. Изменение фагоцитарной активности макрофагов легких имело дозозависимый характер: увеличивалось при воздействии низких доз и снижалось под воздействием высоких доз наночастиц TiO_2 . Секреция NO и ФНО- α при увеличении дозировки TiO_2 повышалась, причем наночастицы вызывали большую продукцию провоспалительных цитокинов, чем частицы обычного размера [4]. Поступление TiO_2 малыми дозами вызывало увеличение гиперреактивности верхних дыхательных путей и общего количества клеток воспаления в бронхоальвеолярном лаваже у мышей с толуиндиизоцианат индуцированной бронхиальной астмой. Гистологический анализ показал увеличение отека, эпителиальную деструкцию и воспаление [5].

Выявленные иммуномодулирующие эффекты пищевых красителей объясняются их способностью влиять на врожденную систему иммуни-

with allergies, TiO_2 increased phagocytosis of staphylococcus, as well as metabolic activity of neutrophils so much as staphylococcus. A strong correlation was found between the hereditary allergies and the increased metabolic activity of blood phagocytes in the NBT-test with TiO_2 in healthy individuals.

Keywords

Titanium dioxide, TiO_2 , phagocytosis, NBT-test, Tertazolium Reduction Test

тата, взаимодействуя с рецепторами фагоцитов [1]. На лейкоцитах имеется большое количество разнообразных рецепторов для ксенобиотиков, которые могут связывать пищевые красители, особенно в виде их комплексов с белками плазмы крови и других биологических жидкостей [6]. Красители, или их комплексы с белками, могут взаимодействовать с Toll-рецепторами и другими паттерн-распознающими рецепторами лейкоцитов [7].

В молекулярных исследованиях появляются описания взаимодействия TiO_2 с клетками человека с участием Toll-подобного рецептора 4 (TLR 4) [8]. Показано участие TLR 4 в захвате фагоцитами агрегатов частиц TiO_2 (200 нм) и развитии воспалительного ответа (увеличение IL-6 mRNA) через NF-kB на клеточных линиях [8]. Отмечено, что TiO_2 взаимодействует с TLR 4 напрямую в отличие от липополисахарида, требующего участия CD14 и ЛПС-связывающего белка для активации этого рецептора [9].

Изучение влияния пищевых красителей на клетки врожденной системы иммунитета, может способствовать определению их роли в развитии иммунопатологии у взрослых и детей.

Стремительный рост числа опубликованных исследований воздействия TiO_2 на организм человека подтверждает высокий уровень заинтересованности в отношении его биобезопасности.

Целью настоящего исследования стало оценить влияние TiO_2 на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови.

Материалы и методы

Фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови оценивали путем подсчета фагоцитарного индекса (ФИ) (процент клеток, вступивших в фагоцитоз, от общего их числа) и определения метаболической функции нейтрофилов в реакции восстановления нитротетразолиевого синего (НСТ-тест).

Утром, натощак, брали 5-10 мл крови из вены в пробирку с гепарином (20 ЕД на 1 мл крови). Кровь отстаивали в пробирке в течение 1 часа, до момента четкого отделения эритроцитов от лейкоцитов. Отсасывали взвесь лейкоцитов с аутологичной плазмой, центрифугировали при 1000 об/мин, плазму отсасывали, осадок лейкоцитов разводили физиологическим раствором хлорида натрия с добавлением 20% аутологичной плазмы до 5×10^6 клеток в 1 мл.

Добавление аутоплазмы увеличивало жизнеспособность лейкоцитов и обеспечивало образование комплексов красителей с белками, подобных тем, которые возникают при их естественном поступлении в организм [1].

Поглотительную активность лейкоцитов крови оценивали в реакции фагоцитоза убитой нагреванием микробной взвеси *Staphylococcus aureus* стандартного штамма 209. Метаболическую активность оценивали в спонтанном НСТ-тесте, а также индуцированном *Staphylococcus aureus*, с применением 0,1% раствора НСТ. НСТ, сталкиваясь с активированным нейтрофилом, восстанавливается в диформаза, который в виде гранул откладывается внутри или на поверхности клеток.

В исследуемые пробы добавляли 0,008% раствор TiO_2 . Концентрация последнего рассчитывалась, исходя из данных его среднесуточного потребления (1 мг/кг массы тела), контрольные пробы ставились со стерильным физиологическим раствором (ФР).

Опытные и контрольные пробы инкубировали в термостате 30 минут при температуре 37°C.

Центрифугировали 3 минуты при 1000 оборотов, с последующим удалением надосадочной жидкости и ресуспензированием в 100 мкл физиологического раствора. Мазки после высыхания на воздухе фиксировали 96% раствором этанола и окрашивали 0,1% раствором нейтрального красного.

Микроскопия проводилась под иммерсионным увеличением (1,25x100), учитывая количество формазанположительных гранулоцитов в НСТ-тесте и количество гранулоцитов, поглотивших 1 и более тест-частиц (стафилококк) при оценке фагоцитоза с подсчетом не менее 100 гранулоцитов.

Результаты исследования

В ходе эксперимента обследовано 17 человек. Все обследуемые разделены на две группы: первая группа - 10 человек с верифицированной по международным критериям atopической бронхиальной астмой (ж/м - 5/5, средний возраст - 38[28;48] лет), вторая группа (контрольная) 7 человек - здоровые добровольцы (ж/м - 3/4, средний возраст - 23[21;26] лет).

По результатам проведенного исследования TiO_2 изменял фагоцитарную активность нейтрофилов крови большинства обследуемых обеих групп. TiO_2 стимулировал фагоцитоз стафилококка нейтрофилами крови ($t=-2,6$, $p=0,02$, парный t -test) у 53% обследованных на 8-30%. На рисунке 1 представлены величины фагоцитарного индекса (ФИ) в стандартных пробах и в пробах с TiO_2 у всех обследуемых.

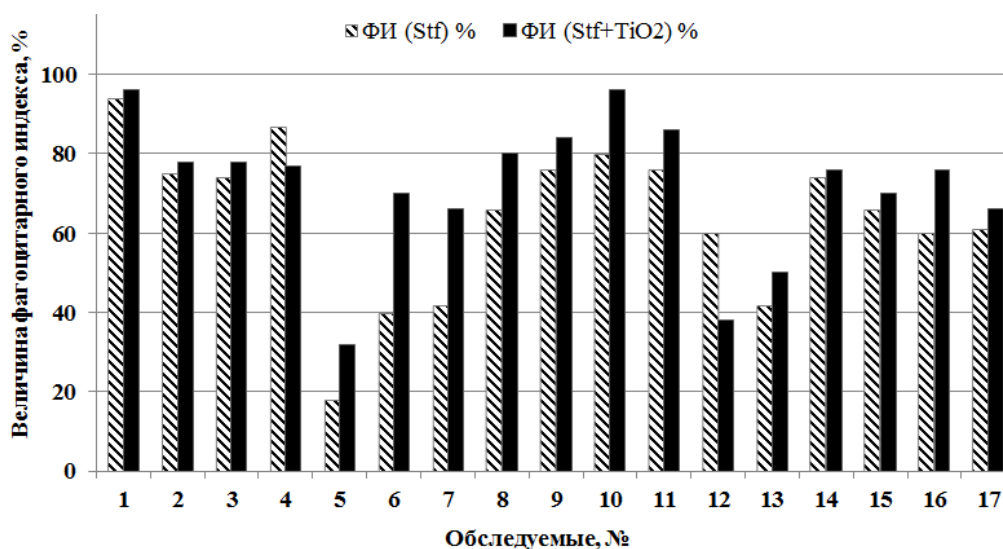


Рис. 1. Изменение фагоцитоза стафилококка нейтрофилами крови под влиянием TiO_2

В таблице 1 представлены данные по активности нейтрофилов в НСТ-тесте в стандартных и в пробах с добавлением раствора TiO_2 .

В поставленных пробах наблюдалось увеличение генерации активных форм кислорода в индуцированном микробами НСТ-тесте, по сравнению со спонтанным НСТ-тестом с физиологическим раствором ($p=0,00001$).

Как видно из таблицы 1, под влиянием TiO_2 активность фагоцитов значительно увеличивалась, по сравнению с таковой в спонтанном НСТ-тесте ($t=-5,3$, $p=0,0001$, парный t -test), различия между средними величинами с доверительными интервалами в этих пробах показаны на графике (Рисунок 2).

По сравнению с микробной взвесью TiO_2 активировал нейтрофилы несколько слабее ($p=0,049$).

На активность в присутствии стафилококка, TiO_2 достоверного влияния не оказывал, хотя у 3 обследуемых (18%) величины метаболической

функции в НСТ-тесте в присутствии TiO_2 повышались на 22-30%, а у 2 (12%) снижалась на 16-18% (Таблица 1).

Для исследования различий влияния TiO_2 на нейтрофилы людей с аллергическими заболеваниями и здоровых лиц все участники эксперимента были разделены на две группы.

По результатам анкетирования участники первой группы имели жалобы на гиперчувствительность к бытовым и/или пыльцевым аллергенам, 30% отмечали непереносимость некоторых пищевых продуктов, 10% подозревали пищевые красители в качестве виновника аллергических реакций, 50% указывали на наследственную отягощенность по аллергии. Лица контрольной группы были несколько моложе ($p=0,01$) и имели наследственность по аллергии в 29%.

В таблице 2 представлены результаты оценки фагоцитарной активности нейтрофилов крови по группам.

Таблица 1. Величины метаболической активности в НСТ-тесте в исследуемых пробах с добавлением раствора TiO_2 и в стандартных

Среда инкубации в течении 30 мин при 37С					
Обследуемые №	Физиологический раствор (ФР)	0,008% раствор TiO_2 (прирост, по сравнению с ФР)	Взвесь убитого стафилококка (прирост, по сравнению с ФР)	Взвесь убитого стафилококка + 0,008% раствор TiO_2 (прирост, по сравнению с раствором TiO_2)	
1	22	30 (+8)	40 (+18)	54 (+14)	
2	12	36 (+24)	65 (+53)	76 (+11)	
3	12	62 (+50)	32 (+20)	62 (+30)	
4	4	24 (+20)	24 (+20)	34 (+10)	
5	6	34 (+28)	38 (+32)	34 (-4)	
6	12	16 (+4)	12 (0)	14 (+2)	
7	14	22 (+8)	34 (+20)	40 (+6)	
8	12	34 (+22)	32 (+20)	18 (-14)	
9	26	38 (+12)	42 (+16)	40 (-2)	
10	2	16 (+14)	24 (+22)	46 (+22)	
11	6	22 (+16)	28 (+22)	40 (+12)	
12	4	18 (+14)	36 (+32)	20 (-16)	
13	16	26 (+10)	48 (+32)	46 (-2)	
14	18	20 (+2)	66 (+48)	60 (-6)	
15	8	26 (+18)	38 (+30)	20 (-18)	
16	20	38 (+18)	48 (+28)	52 (+4)	
17	22	18 (-4)	14 (-8)	44 (+30)	
Средние значения	13 [9;16]	28 [22; 34]*	37 [29; 44]*,**	41 [32; 50]*,***	
Различия, по сравнению с контролем		* $p^{TiO_2-ФР}=0,0001$	* $p^{Стф-ФР}=0,00001$ ** $p^{TiO_2-Стф}=0,049$	* $p^{TiO_2-Стф-ФР}=0,000002$ *** $p^{TiO_2-Стф-TiO_2}=0,0044$ $p^{TiO_2-Стф-Стф}=0,2$	

Как видно из таблицы 2, у обследуемых с аллергией фагоцитоз стафилококка и метаболическая активность нейтрофилов в НСТ-тесте достоверно увеличивались после инкубации проб с раствором TiO_2 , по сравнению с аналогичными контрольными пробами.

Из полученных данных видно, что у обследуемых с аллергопатологией TiO_2 стимулировал фагоцитоз стафилококка и вызывал увеличение метаболической активности нейтрофилов также эффективно, как и культура убитого стафилококка (31,2% по сравнению с 34,3%) (Таблица 2, Рисунок 3).

В группе здоровых людей индуцированный микробами НСТ-тест отличался от спонтанного с ФР у 86% здоровых – происходило увеличение на 22-48%. Раствор TiO_2 также усиливал актив-

ность нейтрофилов в НСТ-тесте, по сравнению с ФР (в среднем и в 71% случаев на 10-18%), но в меньшей степени, чем культура убитого стафилококка (24%, по сравнению с 39,7%) (Рисунок 4).

В группе здоровых лиц добавление раствора TiO_2 не изменяло фагоцитоз микробных клеток и метаболическую активность фагоцитов, индуцированную стафилококком, хотя у 1 человека после инкубации проб с TiO_2 фагоцитоз стафилококка и генерация активных форм кислорода после инкубации проб с TiO_2 уменьшились на 18 и 22% соответственно, а у 1 обследуемого метаболическая активность увеличилась на 30%.

Среди здоровых добровольцев имелась сильная достоверная корреляция между отягощенной наследственностью по аллергии и величиной ме-

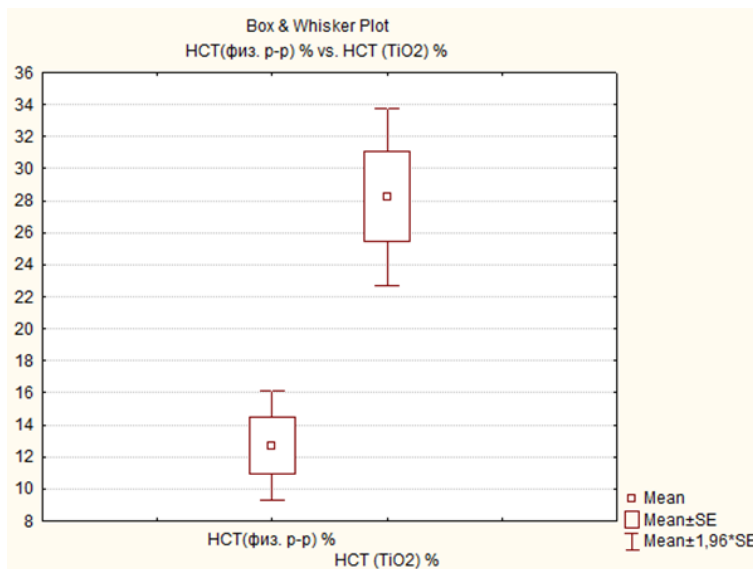


Рис. 2. Средние величины метаболической активности нейтрофилов крови в НСТ-тесте под влиянием TiO_2 и без него

Таблица 2. Величины фагоцитарной активности нейтрофилов крови у обследуемых с аллергией и у здоровых в пробах с TiO_2 и в контрольных пробах

Группа	Лица с atopической бронхиальной астмой						Контрольная (здоровые)					
	ФИ (%)		НСТ (%)				ФИ (%)		НСТ (%)			
Показатель	Stf	Stf+	ФР	TiO_2	Stf	Stf+	Stf	Stf+	ФР	TiO_2	Stf	Stf+
Вид пробы	TiO_2						TiO_2					
Среднее значение, %	65,2	75,7*	12,2	31,2**	34,3	41,8	62,7	66,0	13,4	24,0***	39,7	40,3

Примечания –

* - различия по отношению к ФИ после инкубации со Stf без TiO_2 ($t_1=-2,86$, $p_1=0,02$, парный Т-тест Стьюдента),

** - различия по отношению к НСТ после инкубации в ФР без TiO_2 в группе больных аллергическими заболеваниями ($t_2=-4,48$, $p_2=0,002$, парный Т-тест Стьюдента),

*** - различия по отношению к НСТ после инкубации в ФР без TiO_2 в группе здоровых ($t_3=-3,3$, $p_3=0,02$, парный Т-тест Стьюдента).

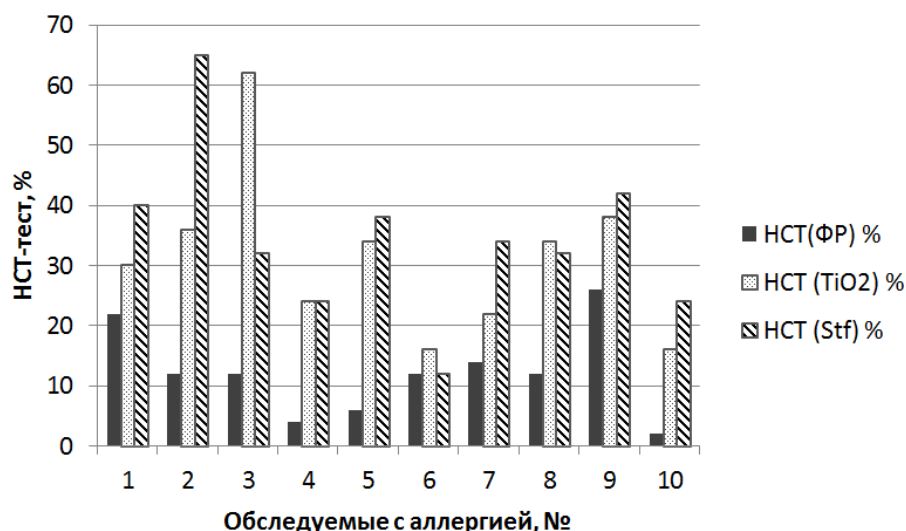


Рис. 3. Метаболическая активность нейтрофилов крови в НСТ-тесте со стафилококком (полосатый), TiO₂ (серый с точками) и в контроле с ФР (черный) в группе лиц с аллергией

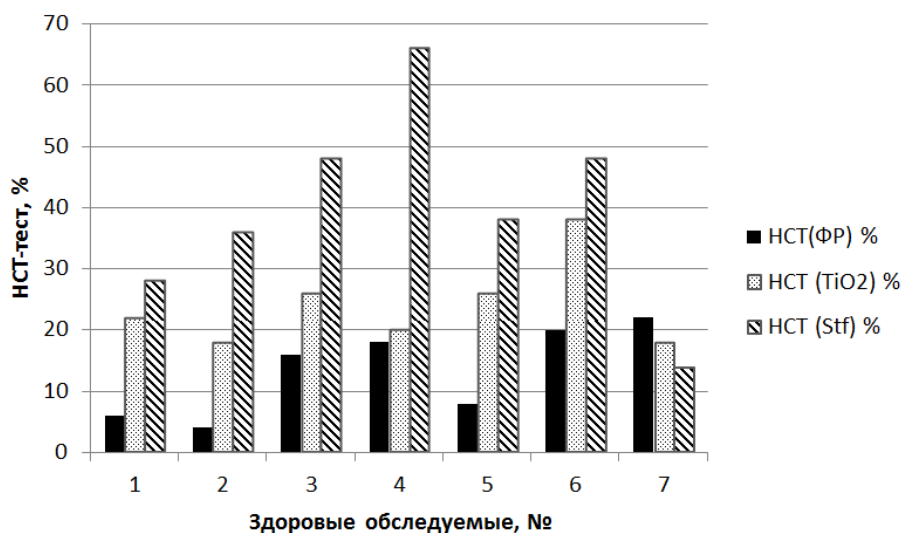


Рис. 4. Генерация активных форм кислорода нейтрофилами крови в НСТ-тесте под влиянием стафилококка (полосатый), TiO₂ (серый с точками) и в контроле с ФР (черный) в группе здоровых

таболической активности нейтрофилов в НСТ-тесте с TiO₂ (0,78, p<0,05).

Между показателями фагоцитарной активности нейтрофилов в группе больных с atopической бронхиальной астмой и здоровых лиц не обнаружено различий.

Выводы

1. 0,008 % раствор TiO₂ стимулировал метаболическую активность нейтрофилов в реакции восстановления нитротетразолиевого синего у 88% обследуемых, по сравнению со спонтанным НСТ-тестом (p=0,0001).

- У пациентов с аллергическими заболеваниями TiO₂ активировал фагоцитоз стафилококка (p=0,02) и увеличивал активность нейтрофилов крови в НСТ-тесте (p=0,02), наравне со взвесью убитого стафилококка.
- У здоровых обследуемых активность нейтрофилов в НСТ-тесте с TiO₂ увеличивалась (p=0,02), но в меньшей степени, чем под влиянием взвеси стафилококка.
- У здоровых лиц обнаружена связь между отягощенной наследственностью по аллергии и усилением метаболической активности нейтрофилов крови в НСТ-тесте с TiO₂.

Литература

1. Титова Н.Д. Модуляция фагоцитоза под влиянием пищевых красителей. Российский иммунологический журнал. – 2011; Т. 5(14), №2: 156-162.
2. Титова Н.Д. Влияние пищевых красителей на фунгицидную активность лейкоцитов у пациентов с иммунопатологией. Известия Национальной Академии наук Беларуси. Серия медицинских наук 2011; № 2: 8287.
3. Hongbo S. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. Part Fibre Toxicol. 2013; №10: 15-22. DOI: 10.1186/1743-8977-10-15
4. The immune toxicity of titanium dioxide on primary pulmonary alveolar macrophages relies on their surface area and crystal structure / R. Liu [et al.]. J. Nanosci. Nanotechnol. 2010; Vol. 10, N 12: 8491–8499. DOI: 10.1166/jnn.2010.2685
5. Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model / S. Hussain [et al.]. Eur. Respir. J. 2011; Vol. 37, N 2: 299–309. DOI: 10.1183/09031936.00168509
6. Аляхнович Н.С., Новиков Д.К. Взаимодействие диоксида титана с биологическими средами организма. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2016; №1: 37-42.
7. Титова Н.Д. Паттернраспознающие рецепторы и аллергия. Российский аллергологический журнал. 2011; № 1: 32-39.
8. Mano S. S., Kanehira K., Taniguchi A. Comparison of cellular uptake and inflammatory response via toll-like receptor 4 to lipopolysaccharide and titanium dioxide nanoparticles. Int. J. Mol. Sci. 2013; Vol. 14, N 7: 13154–13170. doi:10.3390/ijms140713154.
9. Chen P., Taniguchi A., Kanehira K. Role of toll-like receptors 3, 4 and 7 in cellular uptake and response to titanium dioxide nanoparticles. Sci. Tech. Adv. Mater. 2013; Vol. 14, N 1: 7. doi:10.1088/1468-6996/14/1/015008.

Сведения об авторах:

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

Поступила 20.02.2017 г.