

Взаимодействие диоксида титана с биологическими средами организма

Н.С. Аляхнович, Д.К. Новиков

Витебский государственный медицинский университет, Республика Беларусь

Titanium dioxide interaction with the organism biological fluids

N.S. Aliakhnovich, D.K. Novikov

Vitebsk State Medical University, Belarus

Аннотация

Диоксид титана (TiO_2) широко используется как белый краситель в пищевой, бытовой, косметической и фармацевтической промышленности под маркировкой E171. Поступая различными путями, TiO_2 взаимодействует с белками организма, всасывается из желудочно-кишечного тракта и может оказывать патологические эффекты на здоровье человека.

Цель: Изучить влияние естественных жидкостей организма (желудочного и кишечного сока, плазмы и сыворотки крови) на степень дисперсности TiO_2 .

Материалы и методы: Проведено растворение TiO_2 в воде, желудочном и панкреатическом соке, а также в плазме и сыворотке крови доноров. Результаты оценены визуально и микроскопически.

Результаты: При добавлении порошкообразного TiO_2 (анатаза, диаметр частиц <5 мкм, каталожный номер 232033 ALDRICH) к панкреатическому соку, сыворотке и плазме происходит мгновенное образование стабильной до 3 суток суспензии молочного цвета, в отличие от нестабильной взвеси TiO_2 в воде и в желудочном соке. Микроскопически подтверждено изменение формы и размера частиц TiO_2 в панкреатическом соке, в сыворотке и плазме крови и выпавшем осадке, по сравнению с водной взвесью TiO_2 .

Заключение: Энтеральный путь поступления TiO_2 в организм человека обусловлен включением его в состав пищевых продуктов и оболочек лекарственных средств. После взаимодействия с биологическими средами человеческого организма TiO_2 меняет свои физические свойства (характер суспензии, ее стабильность, микроскопическая структура частиц). Критическими параметрами для всасывания и развития патологических эффектов TiO_2 являются его взаимодействие с белками и ферментами желудочно-кишечного тракта и плазмы крови с образованием агломератов.

Ключевые слова

Диоксид титана, пищевой краситель белого цвета, пищевая добавка, E171, TiO_2

Summary

Titanium dioxide (TiO_2) labeled E171 is widely used as a white pigment in food, household, cosmetic and pharmaceutical industries. Proceeding in various ways, TiO_2 binds to the proteins; then it is absorbed from the gastrointestinal tract and may cause pathological effects on the human health.

Objective: To investigate the natural body fluids (gastric, intestinal fluid, plasma and serum) influence on the dispersion degree of TiO_2 .

Materials and Methods: Dissolving TiO_2 in water, gastric and pancreatic juice, as well as in plasma and serum of donors was conducted. The results were evaluated visually and microscopically.

Results: By adding TiO_2 powder (Anatase, particle diameter <5 mkm, catalog number 232033 ALDRICH) to pancreatic juice, serum and plasma, there is an instantaneous formation of a stable "milky" suspension up to 3 days, unlike nonstable TiO_2 slurry in water and gastric juice. TiO_2 particles shape and size change was validated microscopically in a pancreatic juice, serum and plasma and precipitation compared to TiO_2 particles in water.

Conclusion: Food products and the medicines coatings cause enteral route TiO_2 in the human body. After the interaction with biological fluids of the human body, TiO_2 changes its physical properties (nature of the suspension, its stability, microscopic particulate structure). TiO_2 interaction with proteins and enzymes of the gastrointestinal tract and blood plasma results in agglomerates forming, which is the critical parameter for the pathological effects on the organism.

Keywords

Titanium dioxide, white food dye, white coloring, food additive, E171, TiO_2

Введение

Диоксид титана (химическая формула TiO_2) широко используется как белый краситель, в 70 % случаев в составе красок, пластика, зубных паст и пищевых продуктов [1]. По нашим данным больные с хроническими заболеваниями, вынужденные длительно принимать большое количество лекарственных препаратов, регулярно подвержены экспозиции TiO_2 в составе их оболочек [2].

В настоящее время большое количество исследований сосредоточено на изучении воздействия диоксида титана на организм человека и лабораторных животных, поступающего перорально [3].

В исследовании, проведенном на мышах, оценивалось влияние наночастиц (НЧ) (66 нм) и микрочастиц (260 нм) TiO_2 на разные отделы кишечника при внутрижелудочном поступлении в количестве 100 мг/кг массы тела в течение 10 дней. Количество CD4^+ клеток во всех отделах кишечника возросло в сравнении с контролем, усилилась секреция ИЛ-12, ИЛ-4, ИЛ-23, ФНО- α , ИФН- γ , ТФР- β , особенно в стенке толстого кишечника [4]. Более продолжительное (в течение 90 дней) внутрижелудочное поступление наноразмерного TiO_2 вызывало тяжелое повреждение почек и апоптоз нефронов [5], повреждение селезенки, тромбоцитопению, анемию, снижение иммуноглобулинов, В- и Т-лимфоцитов, натуральных киллеров, значительно увеличивались уровни провоспалительных цитокинов [6].

Дискуссионным остается влияние размера частиц TiO_2 на результат эксперимента. До сих пор не ясна реактивность TiO_2 , поступающего перорально в виде крупных частиц или НЧ. Всасывание микрочастиц TiO_2 в кишечнике (>100 нм) происходит через М-клетки, тогда как наночастицы (<100 нм) также проникают через энтероциты и бокаловидные клетки [7].

В моделях на животных токсичность НЧ TiO_2 оказалась выше, по сравнению с крупными частицами [8]. В то же время при оценке клеточной жизнеспособности и экспрессии провоспалительных генов показано, что более крупные агрегаты (596 нм) оказывали больший эффект, чем мелкие частицы (166 нм) [9]. Большинство исследований указывают на то, что, поступая энтерально в виде частиц различного диаметра (от 25 до 500 нм), TiO_2 всасывается из кишечника и накапливается во внутренних органах [10]. Противоречивый результат, полученный при поступлении НЧ TiO_2 , растворенных в воде и

аналоге желудочного сока (пепсин, дистиллированная вода, соляная кислота, рН 1,5), в течение 13 недель, показывает важность подготовительной процедуры растворения НЧ TiO_2 в протоколе эксперимента [11].

Общепринято, что TiO_2 не растворяется в воде, а также в разбавленных минеральных кислотах (за исключением плавиковой). Для приготовления стабильной взвеси TiO_2 в воде обычно используют ее обработку ультразвуком в течение 30 минут. Дзета (ζ) - потенциал озвученной взвеси 95% TiO_2 в виде анатазы со средним изначальным диаметром частиц 12 нм в воде оказался 20 mV, показано увеличение диаметра частиц до 132 нм и образование относительно стабильной взвеси [10].

При моделировании поступления TiO_2 в желудок используют раствор пепсина с рН2, при этом ζ - потенциал увеличивается до 30 mV и диаметр частиц до 218 нм, что объясняется агрегацией и абсорбцией протеинов на поверхности TiO_2 . Дальнейшее поступление НЧ TiO_2 в кишечник в модели со смесью панкреатина и экстракта желчи показывает резкий переход ζ - потенциала в отрицательную сторону (-21,3 mV) и образование огромных агрегатов НЧ с белками (диаметр >1000 нм) [10].

Вероятно, что в зависимости от характера питания и физиологического состояния организма агрегация TiO_2 с белками может меняться. Учитывая, что предугадать данное покрытие невозможно, в эксперименте *in vivo* часто используют растворение TiO_2 в растворе Рингера с добавлением фетальной бычьей сывороткой, *in vitro* - растворение в сыворотко-содержащей клеточной среде, в которых при добавлении TiO_2 ζ -потенциал аналогично меняется на отрицательный (-13,2 и -10,8 mV) и происходит образование достаточно крупных агрегатов диаметром (352 и 320 нм соответственно). Причем показатели приготовленных таким образом взвесей остаются неизменными в течение 48 часов [10].

Принимая во внимание данные об агрегации TiO_2 с белками и образовании частиц различного диаметра в зависимости от состава среды, можно предположить, что основное влияние на развитие того или иного патологического эффекта оказывает не изначальный размер частиц, а то в каких условиях происходит их объединение в агрегаты. Показано образование агрегатов от сотен нанометров до десятков микрометров в диаметре в течение нескольких секунд при изменении рН, ионного равновесия и добавления различных белков [12].

Критическими параметрами для всасывания TiO_2 являются его взаимодействие с белками и ферментами желудочно-кишечного тракта с образованием взвеси с отрицательным ζ -потенциалом и достаточно большим гидродинамическим диаметром агрегатов.

Показано, что с оксидами металлов связываются различные белки плазмы, что может изменять их биологические эффекты. Белки, покрывающие TiO_2 , в большинстве случаев оказывались альбуминами, аполипопротеинами и белками комплемента [13].

При изучении роли человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) в связывании титана *in vivo*, образцы растворов TiO_2 с добавлением 0,1% и 1% ЧСА имели на 2-3 порядка более высокую концентрацию растворенного вещества во все временные интервалы до 8 дней, по сравнению с контрольными растворами без ЧСА [14].

Следует учитывать, что в большинстве случаев энтеральный путь поступления E171 реализуется в составе пищевых продуктов и/или лекарственных средств [1], что может значительно менять характер всасывания TiO_2 и его взаимодействия со стенкой кишечника.

Показано, что растворение пищевых продуктов с высоким содержанием TiO_2 (жевательная резинка) в азотной кислоте и перекиси водорода с последующим нагреванием до 110 градусов, приводило к образованию частиц в диаметре 450-700 нм и лишь 3,9% частиц из образца жевательной резинки прошли через 0,45-мкм фильтр. Пищеварение в организме устроено более универсальным и качественным способом, чем химический метод подготовки образца, который не полностью разрушал пищевые продукты [15].

Поступая в организм человека и животных, TiO_2 взаимодействует с агрессивными средами желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), связывается с белками и ферментами и может значительно изменять их свойства. Существует необходимость в исследованиях, которые моделируют пищеварение, чтобы установить характер и свойства TiO_2 в переваренной пище.

Учитывая приведенные данные о широком распространении, возможных путях поступления в организм человека и растворимости TiO_2 целью нашего исследования, явилось проведение растворения TiO_2 в естественных жидкостях организма (желудочном, кишечном соке, плазме и сыворотке крови).

Материалы и методы

Нами проведено растворение TiO_2 (анатаза, диаметр частиц <5 мкм, каталожный номер 232033 ALDRICH) в физиологических средах ЖКТ. Мы использовали желудочный и панкреатический сок, собранный с помощью стерильных ловушек во время проведения ЭФГДС в эндоскопическом кабинете ВОКБ, а также плазму и сыворотку крови добровольцев.

Анализ результатов оценивался визуально и фиксировался с помощью микроскопических фотографий мазков, приготовленных из растворов и выпавшего через 24 часа осадка.

Результаты

Взвеси, образованные в результате добавления порошка TiO_2 к воде, физиологическому раствору и желудочному соку, имели вид мела, растворенного в воде (рис. 1), обладали низкой стабильностью (быстрое, в течение 1-2 часов пол-

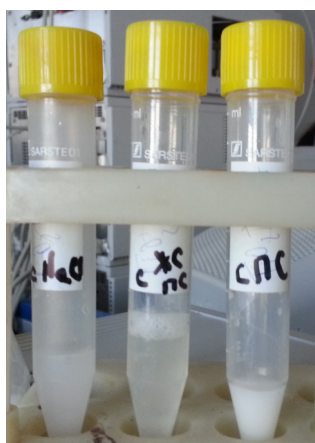


Рис. 1. Взвесь диоксида титана в физиологическом растворе, желудочном соке, панкреатическом соке (слева направо).

ное осаждение взвешенных частиц – раствор становился прозрачным), при микроскопии мазков взвеси TiO_2 в воде обнаружен кристаллический характер частиц TiO_2 (рис. 2).

Взвеси, образованные при добавлении порошкообразного TiO_2 к панкреатическому соку, сыворотке и плазме, образовывались мгновенно, не требовали взбалтывания, имели молочно-

бразный вид, отличались стабильностью (т.е. длительность от момента образования взвеси до полного выпадения осадка около 3 суток). Нами установлено изменение формы и размера частиц TiO_2 при микроскопической фотографии мазков взвесей с панкреатическим соком (рис. 3), в сыворотке (рис. 4) и плазме крови и выпавшего осадка (рис. 5).

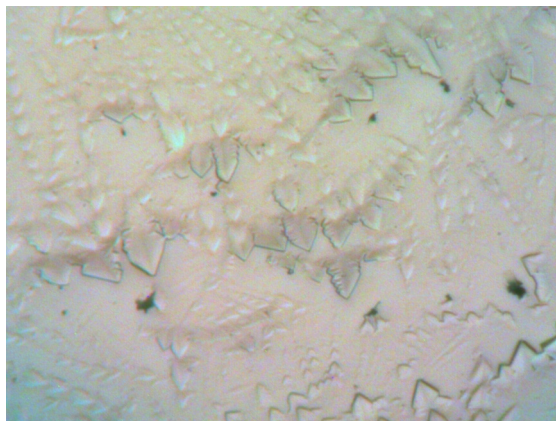


Рис. 2. Микроскопия взвеси диоксида титана в воде. ок. 10х, об. 40х

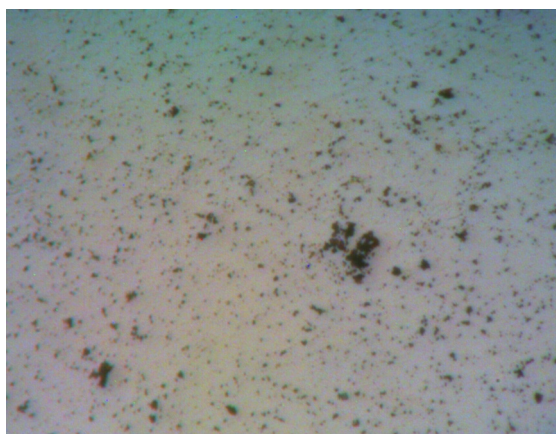


Рис. 3. Микроскопия взвеси диоксида титана с панкреатическим соком. ок. 10х, об. 40х



Рис. 4. Микроскопия взвеси диоксида титана в сыворотке крови. ок. 10х, об. 40х



Рис. 5. Микроскопия осадка диоксида титана, выпавшего из плазмы крови. ок. 10х, об. 40х

Изменение свойств диоксида титана в биологических средах организма мы связываем с вероятным образованием хелатных комплексов (агломератов) TiO_2 с белками и ферментами, входящими в состав сыворотки и плазмы крови, а также панкреатического сока, что подтверждает данные, полученные ранее в лабораторных моделях взаимодействия E171 с пепсином и соляной кислотой и панкреатином с экстрактом желчи [10]. Соединение TiO_2 с ферментами ЖКТ повышает стабильность взвеси, время контакта со слизистой кишечника и вероятность всасывания пищевого красителя. Взаимодействие с белками плазмы, вероятно, увеличивает время нахождения TiO_2 в организме, возможность отложения во внутренних органах и развитие патологических эффектов.

Патологическое воздействие пищевого красителя E171 может меняться в зависимости от характера питания и физиологического состояния организма (функционирование желудочно-кишечного тракта, состав биологических жидкостей, уровень альбумина в плазме крови и т.д.).

Иммуномодулирующие и аллергические эффекты TiO_2 на организм человека, по-видимому, обусловлены его взаимодействием с белками желудочно-кишечного тракта и плазмы крови. Установлено, что после перорального приема TiO_2 лицами с аллергическими заболеваниями, указавшими на непереносимость пищевых красителей, в 47% случаев увеличивался уровень пероксидазной активности слюны [16]. При обследовании *in vitro* у людей с аллергопатологией в 13% случаев обнаружена сенсibilизация гранулоцитов крови к TiO_2 в реакции выброса миелопероксидазы (РВМ) и в 4,4% случаев оказалась положительной реакция алергениндуцированного повреждения лейкоцитов (РАПЛ) [17]. Частота выявленной сенсibilизации достоверно

превышала положительные реакции у здоровых добровольцев [16, 17].

Гуморальный иммунный ответ на TiO_2 наблюдался как у взрослых лиц, так и у детей с atopической бронхиальной астмой: в 20% случаев в слюне детей присутствовали секреторные антитела класса А к TiO_2 [18], антитела класса IgE к TiO_2 в крови обнаружены у 37,5% взрослых больных, IgG – у 29,1%, IgA – у 22,9% [19]. Клеточная сенсibilизация к TiO_2 в той же группе в РВМ составила 12,5%; в РАПЛ – 10,4%, в то время как в контрольной группе антител и клеточной сенсibilизации не выявлялось [19].

Среди лиц без аллергопатологии, имеющих сердечно-сосудистые заболевания, вынужденных постоянно применять лекарственные средства, потенциально часто содержащие белый краситель E171 в оболочках, антитела класса Е к TiO_2 в крови выявлены в 4,3%, антитела класса А к TiO_2 – в 13% случаев. Эти данные подтверждают опасность поступления пищевого красителя TiO_2 в составе оболочек лекарственных средств [20].

Использование TiO_2 в растворе с белками *in vitro* [14] и при провокационных пробах может повышать объективность полученных данных.

Выводы

1. Поступление TiO_2 - красителя белого цвета – перорально в организм человека обусловлено наличием его в составе пищевых продуктов и оболочках лекарственных средств.
2. Диоксид титана изменяет свои физические свойства (характер суспензии, ее стабильность, микроскопическую структуру частиц), образует агломераты после взаимодействия с биологическими средами человеческого организма. Это служит критическим условием для всасывания и развития патологических эффектов TiO_2 .

Литература

1. Weir A. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ Sci Technol*. 2012; №10: 2242–2250.
2. Аляхнович Н.С., Новиков Д.К. Пищевой краситель и фармацевтик диоксид титана как патоген. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2015; №1: 71–77.
3. Hongbo S. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol*. 2013; №10: 15–22.
4. Nogueira CM. Titanium dioxide induced inflammation in the small intestine. *World J Gastroenterol*. 2012; №18(34): 4729–4735.
5. Gui S. Intragastric exposure to titanium dioxide nanoparticles induced nephrotoxicity in mice, assessed by physiological and gene expression modifications. *Part Fibre Toxicol*. 2013; №10: 4.
6. Sang X. The chronic spleen injury of mice following long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles. *J Biomed Mater Res A*. 2012; №10: 894–902.
7. Brun E. Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. *Part Fibre Toxicol*. 2014; №11: 13.
8. Zhao J. Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles induce JB6 cell apoptosis through activation of the caspase-8/Bid and mitochondrial pathways. *J Toxicol Environ Health A*. 2009; №10: 1141–1149.
9. Okuda-Shimazaki J. Effects of titanium dioxide nanoparticle aggregate size on gene expression. *Inter. J of molecular sciences*. 2010; №11: 2383–2392.
10. Brun E. Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. *Part Fibre Toxicol*. 2014; №11: 13.
11. Cho WS, Kang BC, Lee JK et al. Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. *Part Fibre Toxicol*. 2013, 10: 1743–8977.
12. Baveye P, Laba M. Aggregation and Toxicology of Titanium Dioxide Nanoparticles. *Environmental Health Perspectives*. 2008; 116(4): A152.
13. Zhou J, Deng, Gysell Mortimer, Tara Schiller et al. Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles. *Nanotechnology*. 2009; 20(45): 455101.
14. Carmen IV. Formation of potential titanium antigens based on protein binding to titanium dioxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2008; №3(1): 69–74.
15. Lomer MCE. Determination of titanium dioxide in foods using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Analyst*. 2000; №125(12): 2339–2343.
16. Аляхнович Н.С. Метод диагностики аллергии на пищевые красители по увеличению пероксидазной активности в слюне. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2015; №3: 108–114.
17. Титова Н.Д. Сенсibilизация гранулоцитов к пищевым красителям у больных с аллергическими заболеваниями. *Вестник ВГМУ*. 2010; № 4, Т. 9: 117–122.
18. Титова Н.Д. Клиническое значение sIgA-антител в слюне к пищевым добавкам у детей с аллергическими заболеваниями. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2011; №2: 63–69.
19. Титова Н.Д. Аллергические и неаллергические реакции на добавки в пищу и лекарствах. *Аллергология и иммунология*. 2010; №3, Т. 11: 250–259.
20. Титова Н.Д. Аллергия, атопия, IgE-антитела и концепция аллергенной сети. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2011; №4: 39–47.

Сведения об авторах:

Аляхнович Наталья Сергеевна – ассистент кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК Витебского государственного медицинского университета.

Новиков Дмитрий Кузьмич – профессор, д.м.н., зав. кафедрой клинической иммунологии и аллергологии Витебского государственного медицинского университета. 210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27, E-mail: all-vgmu@mail.ru

Поступила 28.12.2015 г.