

© Лузин В.И., Фастова О.Н., Морозов В.Н., Морозова Е.Н., 2020
УДК 591.84:66.022.3:001.891.5

В.И. Лузин¹, О.Н. Фастова¹, В.Н. Морозов², Е.Н. Морозова²
ВЛИЯНИЕ 60-ТИ ДНЕВНОГО ВВЕДЕНИЯ ТАРТРАЗИНА
НА ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ ДИАФИЗА ПЛЕЧЕВОЙ КОСТИ У КРЫС

Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки, Луганск, ЛНР¹; Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, РФ²

Цель исследования: установить оказывает ли влияние 60-ти дневное введение крысам тартразина в различных дозах на костеобразовательную функцию надкостницы и гистологическое строение диафиза плечевой кости. **Материал и методы.** В исследовании принимало участие 90 белых крыс-самцов, распределенных на три группы. Животные 1-й группы ежедневно внутривенно получали 0,9% изотонический раствор натрия хлорида в течение 60-ти дней (контрольная группа). Крысам 2-й и 3-й групп в аналогичных условиях вводился 1 мл раствора тартразина в дозах 750 и 1500 мг/кг/массы тела. Сроки периода реадaptации после окончания введения тартразина составили 3, 10, 15, 24 и 45 суток. Диафиз плечевой кости подвергался обработке по стандартному гистологическому протоколу. Полученные срезы окрашивали гематоксилин-эозином и подвергались последующему гистоморфометрическому исследованию. **Результаты.** Установлено, что на 3 сутки после завершения 60-ти дневного введения тартразина в дозах 750 и 1500 мг/кг/массы тела площадь компактного вещества диафиза плечевой кости у крыс уменьшалась, по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы, на 6.94% и 10.16% соответственно. Ширина слоя наружных генеральных пластинок компактного вещества диафиза была меньше на 8.59% и 12.31%, слоя внутренних генеральных пластинок – на 7.20% и 10.72%, слоя остеонов – на 9.09% и 12.38%, а диаметры остеонов – на 6.80% и 8.21%. Площадь костномозговой полости была больше значений контрольной группы на 7.00% и 12.25%, а диаметры остеонов – на 10.30% и 12.93% ($p < 0.05$). В последующие сроки периода реадaptации (10-45 суток) имело место постепенное восстановление значений изучаемых гистоморфометрических параметров диафиза плечевой кости во 2-й и 3-й группах к таковым в контрольной группе. **Заключение.** Сужение слоев компактного вещества диафиза плечевой кости у крыс после 60-ти дневного введения тартразина в разных дозах может свидетельствовать о снижении костеобразовательного потенциала надкостницы, а увеличение диаметров остеонов и площади костномозговой полости – о преобладания процессов резорбции над процессами созидания. Наиболее статистически значимые и длительные изменения изучаемых параметров в ходе эксперимента были зарегистрированы у животных, получавших тартразин в дозе 1500 мг/кг/массы тела.

Ключевые слова: плечевая кость, диафиз, остеон, тартразин, гистоморфометрические параметры.

Поступила в редакцию 15.10.2020 г. Принята к печати 25.11.2020 г.

Для цитирования: Лузин В.И., Фастова О.Н., Морозов В.Н., Морозова Е.Н. Влияние 60-ти дневного введения тартразина на гистологическое строение диафиза плечевой кости у крыс. Морфологический альманах имени В.Г. Ковешникова. 2020;4:51-5.

Для корреспонденции: Лузин Владислав Игоревич – д. мед. наук, профессор, заведующий кафедрой анатомии человека, оперативной хирургии и топографической анатомии Луганского государственного медицинского университета имени Святителя Луки (91045, ЛНР, г. Луганск, кв. 50 лет Оборона Луганска, 1г). ORCID: 0000-0001-8983-2257; тел.: +38 050 682-79-95.

e-mail: vladyslav_luzin@mail.ru

V.I. Luzin¹, O.N. Fastova¹, V.N. Morozov², E.N. Morozova²
THE INFLUENCE OF 60 DAY TARTRAZINE ADMINISTRATION ON HISTOLOGICAL STRUCTURE OF THE HUMERUS DIAPHYSIS IN RATS

Saint Luke Lugansk State Medical University, Lugansk, LPR¹; ²Belgorod State National Research University, department of human anatomy and histology, Belgorod, Russia²

Objective: to establish whether 60-day administration of tartrazine in rats in various doses affects the bone formation function of the periosteum and the histological structure of the humerus diaphysis. **Material and methods.** The study was carried out on 90 white male rats, distributed

into three groups. Animals of the Group 1 daily received intragastrically 0.9% isotonic sodium chloride solution for 60 days (control group). In similar conditions, rats of the Groups 2 and 3 were injected 1 ml of tartrazine solution in doses of 750 and 1500 mg/kg/body weight. The terms of the readaptation period were 3, 10, 15, 24 and 45 days after the end of the tartrazine administration. The diaphysis of the humerus was subjected to processing according to the standard histological protocol. The sections obtained were stained with hematoxylin-eosin and subjected to a subsequent histomorphometric study. **Results.** It was found that, the area of the compact bone of the humerus diaphysis in rats decreased by 6.94% and 10.16%, respectively, compared to the same parameters in the control group on the day 3 after completion of the 60-day tartrazine administration at doses of 750 and 1500 mg/kg/body weight. The width of the layer of the outer circumferential lamellae of the compact bone was less by 8.59% and 12.31%, the layer of the inner circumferential lamellae - by 7.20% and 10.72%, the layer of osteons - by 9.09% and 12.38%, and the diameters of the osteons - by 6.80% and 8.21%. The area of medullary cavity was greater than the values of the control group by 7.00% and 12.25%, and the diameters of osteons - by 10.30% and 12.93% ($p < 0.05$). In the subsequent periods of the readaptation period (10-45 days), there was a gradual approach of the values of the histomorphometric parameters of the humerus diaphysis in the Groups 2 and 3 to those in the control group. **Conclusion.** The narrowing of the layers of the compact bone of the humerus diaphysis in rats after 60 days of administration of tartrazine in different doses may show a decrease in the bone formation potential of the periosteum, and an increase in the diameters of osteons and the area of medullary cavity – a predominance of resorption processes over the processes of bone formation. The most statistically significant and lasting changes in the parameters studied during the experiment were recorded in animals treated with tartrazine at a dose of 1500 mg/kg/body weight.

Key words: humerus, diaphysis, osteon, tartrazine, histomorphometric parameters.

Received: 15.10.2020. Accepted: 25.11.2020.

For citation: Luzin VI, Fastova ON, Morozov VN, Morozova EN. The influence of 60 day tartrazine administration on histological structure of the humerus diaphysis in rats. V.G. Koveshnikov Morphological Almanac. 2020;4:51-5.

Corresponding author: Vladyslav I. Luzin, MD, PhD, Professor, Head of the Department of Human Anatomy, Operative Surgery and Topographic Anatomy SE LPR Saint Luka Lugansk State Medical University (1g, 50-letiya oborony of Lugansk Street, Lugansk, LPR, 91045). ORCID: 0000-0001-8983-2257; tel.: +38 050 682-79-95. e-mail: vladyslav_luzin@mail.ru

Надкостница (периост) играет важную роль в аппозиционном росте кости и ее регенерации, так как является источником остеогенных клеток и локальных факторов роста [13].

В настоящее время известно, что клетки остеогенной линии обладают высокой чувствительностью к оксидативному стрессу – состоянию, при котором наблюдается дисбаланс между образованием активных форм кислорода и их нейтрализацией ферментами антиоксидантной защиты [5].

Одним из химических веществ, которое обладает установленными прооксидантными свойствами является тартразин. Он относится к группе синтетических азокрасителей желтого цвета и широко применяется для улучшения цветовых характеристик продуктов питания, лекарственных форм и косметических средств [4].

В эксперименте установлено, что продукты расщепления тартразина в кишечнике – ароматические амины могут вызывать

образование активных форм кислорода (супероксид радикал, гидроксил радикал и перекись водорода) и инициацию оксидативного стресса [6, 11].

Так, по данным литературы имеются сведения, что тартразин оказывать негативное влияние на процессы развития эмбриона и плода, обучения и памяти, инициирует развитие аллергических реакций и изменение биохимических параметров крови [3, 9]. Поэтому всестороннее изучение влияния данного азокрасителя на организм является актуальным.

Целью исследования: установить особенности 60-ти дневного воздействия тартразина на гистологическое строение диафиза плечевой кости.

Материал и методы исследования. Для исследования было отобрано 90 белых крыс-самцов молодого возраста репродуктивного периода онтогенеза с исходной массой тела 200-210 г. Группу сравнения (30 крыс) составили животные, которые еже-

дневно в течение 60-ти дней внутрижелудочно получали 1 мл 0,9% изотонического раствора натрия хлорида. Экспериментальные группы сформировали из крыс, которые в аналогичных условиях получали 1 мл раствора тартразина в дозе 750 и 1500 мг/кг/массы тела (2-я и 3-я группы по 30 животных в каждой) (производитель RONA DYECHEM PVT LTD (A/44 & A45, Road № 2, MIDC Andheri (East), Mumbai – 400 093, India). Сроки периода реадaptации после завершения 60-ти дневного введения тартразина были 3, 10, 15, 24 и 45 суток. Животных выводили из эксперимента методом декапитации под эфирным наркозом (обращение с лабораторными животными, процедуры и манипуляции с ними были проведены в соответствии с существующими нормами и правилами [7]). Выделяли и скелетировали плечевые кости, отделяли их диафиз и осуществляли его стандартную гистологическую обработку [2]. Гистологические срезы окрашивали гематоксилин-эозином и подвергали дальнейшему гистоморфометрическому исследованию на морфометрическом комплексе, включающим микроскоп Olympus CX-41, цифровой фотоаппарат Olympus SP 500UZ, персональный компьютер в компьютерной программе «Morpholog». Цифровые данные, полученные по результатам гистоморфометрического исследования диафиза плечевой кости подвергались статистической обработке в программе «STATISTICA 5.11» [1] Статистическую достоверность отклонений полученных результатов от соответствующего контроля оценивали с использованием параметрического метода сравнения двух независимых выборок – критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности ошибки 5% ($p < 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение. На 3 сутки после завершения 60-ти дневного введения тартразина в дозе 750 мг/кг/массы тела выявлено, что площадь компактного вещества диафиза плечевой кости уменьшалась, по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы, на 6,94%. Ширина слоя наружных генеральных пластинок компактного вещества была меньше на 8,59%, слоя внутренних

генеральных пластинок – на 7,20%, слоя остеонов – на 9,09%, диаметры остеонов – на 6,80% (здесь и далее по тексту представленные цифровые данные являются достоверными при $p < 0,05$)

На 3 сутки периода реадaptации площадь костномозговой полости была больше значений 1-й группы на 7,00%, а диаметры остеонов – на 10,30%.

При анализе изменений гистоморфометрических параметров диафиза плечевой кости у животных в последующие сроки периода реадaptации установлено, что имеет место постепенное приближение значений параметров 2-й группы к таковым контрольной группы к 45 суткам эксперимента.

Диаметры остеонов оставались меньше параметров контрольной группы с 10 по 24 сутки на 7,05%, 4,69% и 4,57%, ширина слоя остеонов – на 6,98%, 5,91% и 5,57%, а слоев наружных и внутренних генеральных пластинок – на 8,17%, 5,69% и 4,98% и на 7,22%, 5,63% и 6,36%. Площадь компактного вещества диафиза плечевой кости была меньше на 7,25%, 6,92% и 5,45%.

С 10 по 45 сутки эксперимента диаметры каналов остеонов были больше значений контрольной группы на 8,64%, 9,09%, 6,14% и 4,39%, а площадь поперечного сечения костномозговой полости – на 7,81% и 6,10% с 10 и 15 сутки.

У животных, получавших тартразин в дозе 1500 мг/кг/массы тела в течение 60-ти дней на 3 сутки периода реадaptации площадь компактного вещества диафиза была меньше таковой у контрольной группы на 10,16%, диаметры остеонов – на 8,21%, а ширина остеонового слоя и слоев наружных и внутренних генеральных пластинок – на 12,38%, 12,31%, 10,72% (Рисунок). Диаметры остеонов и площадь костномозговой полости были больше на 12,93% и 12,25%.

Аналогичная динамика сохранялась в последующие сроки эксперимента с тенденцией к сглаживанию к 45 суткам. Ширина слоев наружных и внутренних генеральных пластинок продолжали оставаться меньше параметров контрольной группы на 11,36%, 7,90%, 6,69%, 4,69%, и на 9,06%, 8,82%, 7,48%, 3,61% с 10 по 45 сутки эксперимента, ширина слоя остеонов – на 9,21%,

9,15%, 6,90%, диаметры остеонов – на 7,64%, 6,77% и 6,00% с 10 по 24 сутки, а площадь поперечного сечения костномоз-

говой полости – на 9,93%, 9,65%, 7,72%, 5,07% с 10 по 45 сутки.

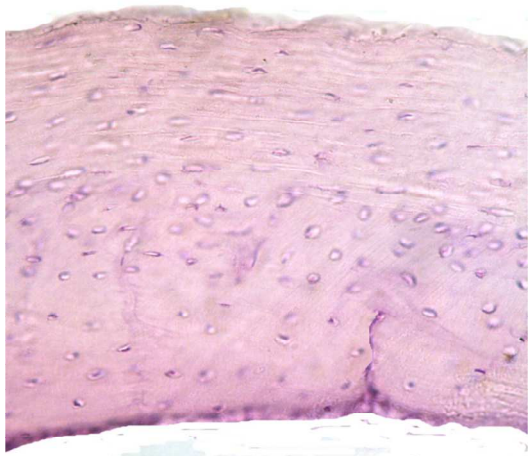


Рисунок - Участок диафиза плечевой кости у животного контрольной группы (слева) и у крысы, получавшей тартразин в дозировке 1500 мг/кг/массы тела (3 сутки эксперимента). Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение 200^x

Установлено, что тартразин в тонкой кишке расщепляется под действием ферментов-азоредуктаз кишечных микроорганизмов до ароматических аминов, вызывающих образование таких радикалов, как анион супероксида, перекись водорода, гидроксил радикал, инициирующих развитие оксидативного стресса [9].

Оксидативный стресс активирует дифференцировку предшественников остеокластов в зрелые остеокласты и индуцирует апоптоз остеобластов и остеоцитов, стимулируя процессы резорбции кости [12, 14]. Одним из механизмов стимуляции дифференцировки остеокластов является повышение экспрессии RANKL и снижение таковой остеопротегерина. Последний является рецептором для RANK, конкурируя с RANKL [8]. Также в условиях оксидативного стресса, остеоциты выделяют белок склеростин, который блокирует формирование кости остеобластами путем связывания с Wnt-коррецепторами и LPR 4, 5, 6 [10]. Данными механизмами можно объяснить установленную динамику изменений гистологического строения диафиза плечевой кости у крыс.

Заключение.

1. Сужение слоев компактного вещества диафиза плечевой кости у крыс после 60-

ти дневного введения тартразина в разных дозах может свидетельствовать о снижении костеобразовательного потенциала надкостницы, а увеличение диаметров остеонов и площади костномозговой полости – о преобладания процессов резорбции над процессами созидания.

2. Установлено, что выраженность и длительность установленных изменений гистологического строения диафиза у крыс определяется дозой вводимого им тартразина. Изучаемые гистоморфометрические параметры диафиза плечевой кости изменялись более значительно и сохранялись дольше в ходе эксперимента у животных, получавших тартразин в дозе 1500 мг/кг/массы тела.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования публикации статьи. Авторы заявляют о финансировании проведенного исследования из собственных средств».

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Реброва О.Ю. *Статистический анализ медицинских данных*. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медиа

- Сфера; 2002: 312 с. [Rebrova OJu. *Statističeskij analiz medicinskih dannyh*. Primenenie paketa prikladnyh programm STATISTICA. M.: Media Sfera; 2002: 312 p. (In Russ.)]
2. Саркисов Д.С., Перов Д.С. *Микроскопическая техника*. Москва: Медицина; 1996. 544 с. [Sarkisov DS, Perov DS. *Mikroskopičeskaja tehnika*. Moskva: Medicina; 1996. 544 p. (In Russ.)]
3. Amin KA, Abdel Hameid H, Abd Elsttar AH. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food Chem. Toxicol.* 2010;48(10):2994-9. doi: 10.1016/j.fct.2010.07.039
4. Bafana A, Saravana DS, Chakrabarti T. Azo dyes: past, present and the future. *Environmental Reviews.* 2011;19(NA): 50-371 doi.org/10.1139/a11-018
5. Domazetovic V, Marcucci G, Iantomasi T, Brandi ML, Vincenzini MT. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2017;14(2):209-16 doi:10.11138/ccmbm/2017.14.1.209
6. El-Desoky GE, Abdel-Ghaffar A, Al-Othman ZA. Curcumin protects against tartrazine-mediated oxidative stress and hepatotoxicity in male rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* 2017; 1(3):635-45.
7. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. Strasbourg. 1986:52.
8. Fontani F, Marcucci G, Iantomasi T. Glutathione, N-acetylcysteine and lipoic acid down-regulate starvation-induced apoptosis, RANKL/OPG ratio and sclerostin in osteocytes: involvement of JNK and ERK1/2 signalling. *Calcified Tissue International.* 2015;96(4):335-46. doi: 10.1007/s00223-015-9961-0
9. Hashem MM, Abd-Elhakim YM, Abo-El-Sooud K. Embryotoxic and Teratogenic Effects of Tartrazine in Rats. *Toxicol Res.* 2019;35(1):75-81. doi: 10.5487/TR.2019.35.1.075
10. Kim JH, Liu X, Wang J. Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease.* 2013;5(1):13-31. doi: 10.1177/1759720X12466608
11. King-Thom C. Azo dyes and human health: A review. *Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews.* 2016; 4(4):233-61. doi.org/10.1080/10590501.2016.1236602
12. Lean JM, Jagger CJ, Kirstein B. Hydrogen peroxide is essential for estrogen deficiency bone loss and osteoclast formation. *Endocrinology.* 2005;146(2):728-35. doi:10.1210/en.2004-1021
13. Li N., Song J., Zhu G., Li X, Liu L, Shi X, Wang Y. Periosteum tissue engineering-a review. *Biomater Sci.* 2016;4(11):1554-61. doi 10.1039/c6bm00481d
14. Savasky BM, Mascotti DP, Patel N, Rodriguez-Collazo E. Nutritional and Pharmacological Effects on Oxidative Stress in Soft Tissue and Bone Remodeling. *Journal of Nutrition and Metabolism.* 2018;Article ID 4183407: 9 p. doi: 10.1155/2018/4183407