

© Морозов В.Н., 2023

УДК: 591.11:613.29+616.718.5-089.849

В.Н. Морозов

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ БЕНЗОАТА НАТРИЯ ИЛИ ТАРТРАЗИНА И ТРАВМАТИЗАЦИИ БОЛЬШЕБЕРЦОВЫХ КОСТЕЙ НА СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ МАРКЕРОВ ФОРМИРОВАНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ В КРОВИ КРЫС

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород, РФ

Цель. В разные сроки репаративной регенерации костей оценить изменения уровней кальция и щелочной фосфатазы в сыворотке крови после длительного поступления бензоата натрия или тартразина в организм крыс. **Материал и методы.** Исследование проведено на 150 белых беспородных половозрелых крысах-самцах, которые были распределены на 5 групп. Крысам 1-й группы наносили сквозной дефект в большеберцовых костях после предшествующего шестидесятидневного введения физиологического раствора. Крысам 2-й, 3-й, 4-й, 5-й групп вместо физиологического раствора в аналогичные сроки вводили соответственно раствор бензоата натрия в дозах 500 и 1000 мг/кг, а также раствор тартразина в дозах 750 и 1500 мг/кг. Уровни кальция и щелочной фосфатазы определяли в венозной крови на 3, 10, 15, 24, 45 сутки после завершения экспериментальных воздействий. Определение уровней щелочной фосфатазы и кальция в сыворотке крови было выполнено колориметрическим методом. Использовали критерий Стьюдента или критерий Манна-Уитни для сравнения числовых данных контрольной и экспериментальных групп, а также критерий Вилкоксона для оценки изменений параметров внутри групп. Уровнем статистической значимости считали $p \leq 0,05$. **Результаты.** У крыс 1-й группы изменение уровней кальция и щелочной фосфатазы в ходе процесса репаративного остеогенеза носит двухфазный характер. На 3 и 10 сутки репаративного остеогенеза (стадия воспаления и стадия дифференцировки клеток, формирования тканеспецифических структур в области перелома) уровни данных маркеров формирования костной ткани уменьшаются, а затем от 10-х суток до 45-х их уровни постепенно увеличиваются (стадия реорганизации тканевых структур, минерализации и стадия ремоделирования). У крыс 2-й, 3-й, 4-й, 5-й групп зарегистрирована аналогичная динамика изменений уровней кальция и щелочной фосфатазы в сыворотке крови от 3-х до 45-х суток. При сравнительном анализе числовых данных 2-й, 3-й, 4-й, 5-й групп и 1-й группы установлено, что уровни кальция и щелочной фосфатазы уменьшаются, а амплитуда отклонений значений данных параметров зависит от вида и дозы вводимого бензоата натрия или тартразина (наименьшие во 2-й группе, а наибольшие – в 5-й группе). **Заключение.** Уровни кальция и щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс в периоде после шестидесятидневного воздействия бензоата натрия или тартразина и моделирования переломов в большеберцовых костях имеют определенные закономерности изменений в разные сроки репаративного остеогенеза, а также четко установленную тенденцию к уменьшению, по сравнению с данными группы с введением физраствора.

Ключевые слова: большеберцовые кости, регенерация, щелочная фосфатаза, кальций, бензоат натрия, тартразин.

Поступила в редакцию 11.06.2023 г. Принята к печати 25.09.2023 г.

Для цитирования: Морозов В.Н. Влияние длительного воздействия бензоата натрия или тартразина и травматизации большеберцовых костей на содержание некоторых маркеров формирования костной ткани в крови крыс. Морфологический альманах имени В.Г. Ковешникова. 2023; 21(3):65-72.

Для корреспонденции: Морозов Виталий Николаевич – к. мед. наук, доцент, доцент кафедры анатомии и гистологии человека, Белгородский государственный национальный исследовательский университет (308036, РФ г. Белгород, ул. Губкина, 50). ORCID: 0000-0002-1169-4285; тел.: +7(952) 430-90-36.
e-mail: morozov_v@bsu.edu.ru

V.N. Morozov

EFFECT OF LONG-TERM EXPOSURE TO SODIUM BENZOATE OR TARTRAZINE AND TRAUMA TO THE TIBIAE ON THE LEVELS OF SOME BONE TISSUE FORMATION MARKERS IN RAT'S BLOOD

Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

Aim. To evaluate changes in serum calcium and alkaline phosphatase levels at different times of bone repair in rats after prolonged administration of sodium benzoate or tartrazine. **Material and methods.** The

study was conducted on 150 white mature male rats, which were divided into 5 groups. Rats of the 1st group were applied a defect in the tibiae after a previous 60-day administration of saline solution. Rats of the 2nd, 3rd, 4th, and 5th groups were given sodium benzoate solution at doses of 500 and 1000 mg/kg and tartrazine at doses of 750 and 1500 mg/kg instead of saline solution at the same experimental conditions. Calcium and alkaline phosphatase levels were determined in venous blood on days 3, 10, 15, 24, and 45 after completion of the experimental effects. Alkaline phosphatase and calcium levels in blood serum were determined by the colorimetric method. The Student's test or Mann-Whitney test were used to compare the numerical data of the control and experimental groups, as well as the Wilcoxon test to assess changes in parameters within the groups. The level of statistical significance was considered to be $p \leq 0,05$. **Results.** The changes of serum calcium and alkaline phosphatase levels during the process of bone repair was biphasic in rats of the 1st group. The levels of these bone tissue formation markers decrease on 3rd and 10th days of bone repair (the stage of inflammation and the stage of cell differentiation, the formation of tissue-specific structures in the fracture area) and then from the 10th to the 45th days their levels gradually increase (the stage of tissue structure reorganization, mineralization and the remodeling stage). In rats of 2nd, 3rd, 4th, 5th groups similar dynamics of changes in the serum calcium and alkaline phosphatase levels in the blood serum from the 3rd to the 45th days were observed. A comparative analysis of the numerical data of the 2nd, 3rd, 4th, 5th groups and the 1st group showed that the calcium and alkaline phosphatase levels decrease, and the amplitude of deviations in the values of these parameters depends on the type and dosage of sodium benzoate or tartrazine administered (the smallest in the 2nd group, and the largest in the 5th group). **Conclusion.** Serum calcium and alkaline phosphatase levels in rats after sixty days of exposure to sodium benzoate or tartrazine and modeling of tibial fractures show certain patterns of changes at different times of bone repair, as well as a clearly established tendency to decrease, compared with the data of the group with the introduction of saline solution.

Key words: tibiae, regeneration, alkaline phosphatase, calcium, sodium benzoate, tartrazine.

Received: 15.06.2023. Accepted: 18.09.2023.

For citation: Morozov V.N. Effect of long-term exposure to sodium benzoate or tartrazine and trauma to the tibiae on the levels of some bone tissue formation markers in rat's blood. V.G. Koveshnikov Morphological Almanac. 2023;21(3):65-72.

Corresponding author: Vitaly N. Morozov – PhD in medicine, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Human Anatomy and Histology, Belgorod State National Research University (308036, Russian Federation, Belgorod, Gubkin St., 50). ORCID: 0000-0002-1169-4285; tel.: +7(952) 430-90-36.
e-mail: morozov_v@bsu.edu.ru

Введение. В настоящее время в процессе производства продуктов питания широкое применение находят вещества, имеющие животное, растительное или искусственное происхождение – пищевые добавки. Их использование улучшает органолептические свойства продуктов (запах, текстура, вкус, аромат), а также позволяет увеличить сроки хранения и транспортировки [17].

Одним из пищевых консервантов, который способствует достижению этой цели является производное бензойной кислоты – бензоат натрия, поскольку подавляет активность бактерий и грибов [14].

Пищевые красители придают яркие, насыщенные цвета продуктам питания, что усиливает интерес к ним со стороны покупателей. В частности, синтетический азокраситель тартразин окрашивает продукты в стойкий, насыщенный желтый или оранжевый цвет [16].

Дозы пищевых добавок, используемых в пищевой промышленности строго регламентированы, тем не менее в литературе появляются все больше информации об их побочных эффектах на организм. Имеются данные о мутагенном, гепато-, нефро- и гонадотоксическом влиянии бензоата натрия и тартразина, влиянии на поведенческую сферу и когнитивные функции [14, 16].

При этом информация о длительном воздействии бензоата натрия и тартразина на костную систему ограничена, описываемые изменения в первую очередь касаются реактивных зон костей, их химического состава, ультраструктуры минералов [1, 4-8, 13]. В литературе не удалось найти данных об изменениях уровней кальция и щелочной фосфатазы в разные сроки репаративной регенерации костей после длительного поступления бензоата натрия или тартразина в организм.

Цель. В разные сроки репаративной регенерации костей оценить изменения уровней кальция и щелочной фосфатазы в сыворотке крови после длительного поступления бензоата натрия или тартразина в организм крыс.

Материал и методы исследования. Исследование проведено на 150 белых беспородных половозрелых крысах-самцах (масса 200-210 г.). Животные были распределены на 5 групп по 30 особей в каждой. Крысам первой группы (группа ФизДеф) в проксимальной отделе диафиза обеих большеберцовых костей наносили сквозной дефект [3] после предшествующего внутрижелудочного шестидесятидневного введения физиологического раствора. Крысам последующих четырех групп вместо физиологического раствора в аналогичные сроки вводили раствор бензоата натрия (производитель «Eastman Chemical B.V., Нидерланды) в дозах 500 и 1000 мг/кг (вторая (БенНат500Д) и третья (БенНат1000Д) группы) и раствор тартразина (Roха Dyеchem Pvt Ltd, India) в дозах 750 и 1500 мг/кг (четвертая (Тар750Д) и пятая (Тар1500Д) группы). Содержание и манипуляции над животными проводились в соответствии с правилами содержания экспериментальных животных, установленной Директивой 2010/63 / ЕU Европейского парламента и Совета Европейского союза [10]. Протокол исследования утвержден на заседании комиссии по биоэтике ГУ «Луганский государственный медицинский университет им. Святителя Луки» (протокол №2, 25.03.2022 г.). Забор венозной крови из бедренной вены осуществлялся на 3, 10, 15, 24, 45 сутки после завершения шестидесятидневного воздействия бензоата натрия или тартразина и нанесения дефекта в большеберцовых костях. Определение уровней щелочной фосфатазы и кальция в сыворотке крови было выполнено кинетическим колориметрическим методом в медицинском центре «Глори», г. Луганск (лицензия МОЗ Украины АГ №570789 от 24.03.2011).

Результаты биохимического метода исследования сыворотки крови крыс загружали в лицензионные компьютерные программы Microsoft Office Excel 2017 (Micro-

soft, USA) и Statistica 10.0 (StatSoft Inc., USA) для математической обработки. В каждой группе при помощи метода описательной статистики рассчитывалось среднее значение уровня кальция и щелочной фосфатазы, стандартное квадратичное отклонение и стандартную ошибку среднего. Проверку данных на нормальность распределения проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка и в зависимости от результатов проверки использовали критерий Стьюдента (в случае нормального распределения) или критерий Манна-Уитни (при не нормальном распределении данных) для сравнения числовых данных контрольной и экспериментальных групп. Применялась поправка Бонферрони, поскольку с контрольной группой сравнивалось несколько экспериментальных групп. Критерий Вилкоксона использовали для оценки изменений значений параметров внутри групп. Уровнем статистической значимости считали $p \leq 0,05$ [2].

Результаты исследования. В группе крыс, которым в течение 60-ти суток вводили физиологический раствор, а после истечения этого срока моделировали перелом в правой и левой большеберцовых костях (группа ФизДеф) содержание кальция и щелочной фосфатазы уменьшалось от 3-х суток (фаза воспаления регенерации кости) до 10-х суток (фаза дифференцировки клеток и формирования тканеспецифических структур). Далее, от 10-х до 15-ти суток (фаза реорганизации тканевых структур и минерализации), от 15-ти до 24-х суток (фаза ремоделирования) и от 24-х до 45-ти суток (фаза исхода) значения данных параметров увеличивались (Таблица 1).

В группе БенНат500Д изменение содержание кальция и щелочной фосфатазы в сыворотке крови, по сравнению с данными группы ФизДеф, имело лишь характер тенденции к уменьшению на 3, 10, 15, 24, 45 сутки эксперимента.

В группе БенНат1000Д также как и в предыдущей группе изменение уровней кальция и щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс, по сравнению со значениями аналогичных параметров в группе ФизДеф, имело лишь характер тенденции к

уменьшению в различные сроки после моделирования перелома в большеберцовых костях. Однако, амплитуда отклонений значений параметров была выше, чем в группе БенНат500Д, а также на 10 сутки выявлено достоверное уменьшение уровня щелочной фосфатазы.

Сравнение значений данных парамет-

ров внутри групп БенНат500Д и БенНат1000Д при помощи критерия Вилкоксона, как и в группе ФизДеф установлено уменьшение содержания кальция и щелочной фосфатазы от 3-х до 10-х суток репаративного остеогенеза и постепенное увеличение их уровней от 10-х до 45-х суток (см. Таблицу 1).

Таблица 1 - Динамика изменений уровней кальция и щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс в экспериментальных группах в разные сроки репаративной регенерации в большеберцовых костях

Группа	Параметр	Сроки эксперимента				
		3	10	15	24	45
ФизДеф	Содержание кальция (ммоль/л)	3,13±0,11	2,61±0,14 (-16,41%*)	2,81±0,17 (+7,52%*)	2,96±0,17 (+5,16%*)	3,09±0,17 (+4,68%*)
	Содержание щелочной фосфатазы (МЕ/л)	272,74±11,02	252,90±9,34 (-7,28%*)	264,60±8,20 (+4,63%*)	284,28±8,77 (+7,44%*)	295,20±14,21 (+3,84%*)
БенНат500Д	Содержание кальция (ммоль/л)	3,06±0,15	2,52±0,15 (-17,79%*)	2,67±0,11 (+5,82%*)	2,81±0,09 (+5,44%*)	3,08±0,12 (+9,61%*)
	Содержание щелочной фосфатазы (МЕ/л)	264,44±9,51	247,99±10,38 (-6,22%*)	259,83±8,14 (+4,77%*)	272,58±7,59 (+4,77%*)	292,73±8,09 (+7,39%*)
БенНат1000Д	Содержание кальция (ммоль/л)	2,97±0,10	2,47±0,19 (-16,97%*)	2,50±0,11 (+1,21%)	2,65±0,11 (+5,87%*)	2,86±0,11 (+8,19%*)
	Содержание щелочной фосфатазы (МЕ/л)	236,77±10,38	221,83±6,82 (-6,31%*)	240,33±11,79 (+8,34%*)	264,13±11,08 (+9,90%*)	279,89±9,24 (+5,96%*)
Тар750Д	Содержание кальция (ммоль/л)	2,79±0,09	2,38±0,15 (-14,81%*)	2,46±0,11 (+3,29%)	2,61±0,09 (+6,38%*)	2,73±0,14 (+4,46%)
	Содержание щелочной фосфатазы (МЕ/л)	220,95±8,95▶	207,92±6,47▶ (-5,90%*)	219,40±7,89▶ (+5,52%*)	240,42±7,46▶ (+9,58%*)	261,32±8,72 (+8,69%*)
Тар1500Д	Содержание кальция (ммоль/л)	2,63±0,11	2,18±0,09 (-17,17%*)	2,34±0,09 (+7,65%*)	2,43±0,09▶ (+3,62%*)	2,61±0,08▶ (+7,27%*)
	Содержание щелочной фосфатазы (МЕ/л)	195,64±8,90▶	176,86±10,42▶ (-9,60%*)	196,87±9,59▶ (+11,31%*)	220,38±9,45▶ (+11,94%*)	249,11±7,83▶ (+13,03%*)

Примечание: * - достоверное отличие параметра от показателя предыдущего срока эксперимента внутри группы; ▶ - достоверное отличия показателя от аналогичного параметра группы ФизДеф.

В группе Тар750Д уровень щелочной фосфатазы был достоверно меньше аналогичного показателя группы ФизДеф на 3, 10, 15, 24 сутки репаративного остеогенеза, а изменение значения данного параметра на 45 сутки и уровня кальция во все сроки имело лишь характер тенденции к умень-

шению. В группе Тар1500Д содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови было достоверно меньше данных группы ФизДеф на 3, 10, 15, 24, 45 сутки, а содержание кальция – на 24 и 45 сутки (см. Таблицу 1) (Рисунок 1, Рисунок 2).

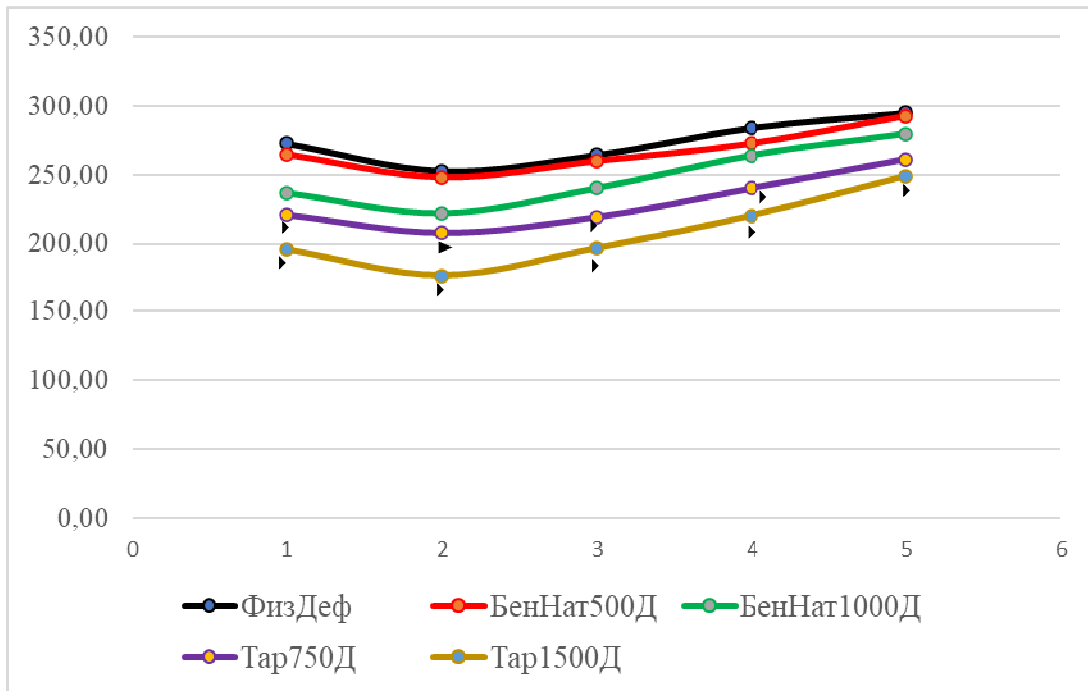


Рисунок 1 – Линейная диаграмма, демонстрирующая изменение уровня кальция в сыворотке крови (ммоль/л) крыс групп ФизДеф, БенНат500Д, БенНат1000Д, Тар750Д, Тар1500Д в разные сроки репаративного остеогенеза в большеберцовых костях (на этой диаграмме и следующей символ \blacktriangleright означает достоверное изменение параметра от группы ФизДеф)

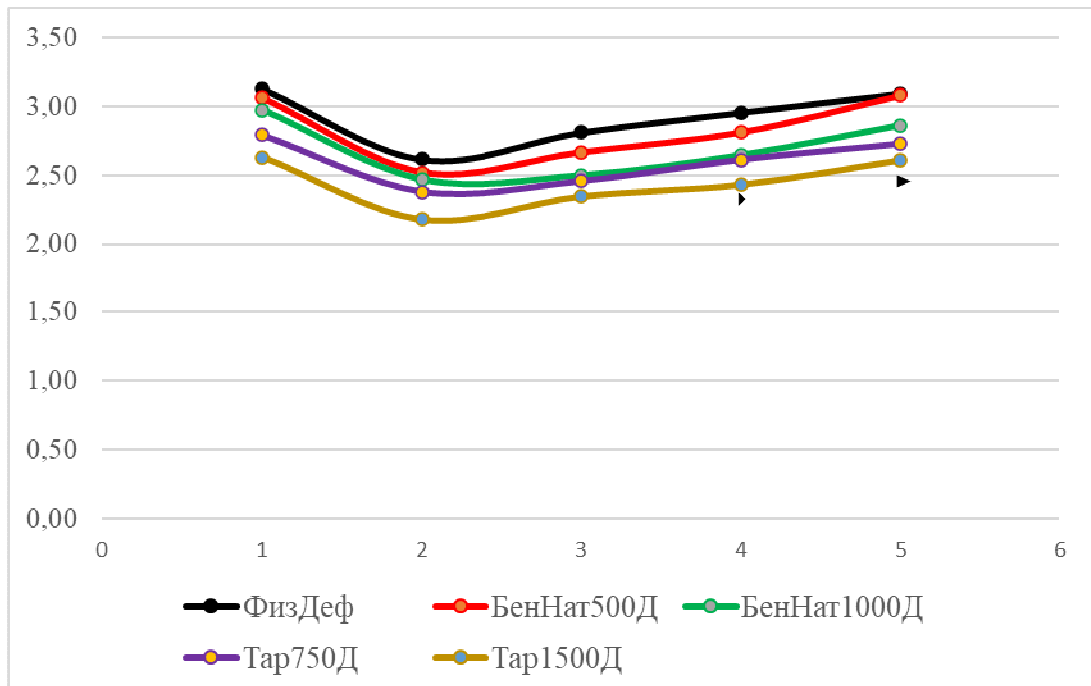


Рисунок 2 – Линейная диаграмма, демонстрирующая изменение уровня щелочной фосфатазы в сыворотке крови (МЕ/л) крыс групп ФизДеф, БенНат500Д, БенНат1000Д, Тар750Д, Тар1500Д в разные сроки репаративного остеогенеза в большеберцовых костях

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что в группе ФизДеф изменение уровней кальция и щелочной фосфатазы носит двухфазный характер. На 3 и

10 сутки репаративного остеогенеза (стадия воспаления и стадия дифференцировки клеток, формирования тканеспецифических структур в области перелома) уровни

данные маркеров костеобразования уменьшаются, а затем от 10-х суток до 45-х их уровни постепенно увеличиваются (стадия реорганизации тканевых структур, минерализации и стадия ремоделирования).

При введении животным бензоата натрия в дозах 500 и 1000 мг/кг или тартразина в дозах 750 и 1500 мг/кг вышеуказанная динамика изменений уровней кальция и щелочной фосфатазы в сыворотке крови от 3-х до 45-х суток сохраняется, однако значения этих показателей уменьшаются относительно аналогичных параметров группы ФизДеф. Выраженность этих процессов зависит от вида и дозировки вводимой пищевой добавки: наименьшие в группе БенНат500Д, а наибольшие – в группе Тар1500Д.

Результаты, полученные в группе ФизДеф согласовываются, так и противоречат данным других авторов.

Согласно результатам исследования Wei H. и др. (2023) у кур при переломе их кия в ранние сроки наблюдается снижение уровней кальция и щелочной фосфатазы, что соответствует полученным в ходе эксперимента данным [20].

He X. и др. (2014) в сыворотке крови крыс при моделировании перелома в большеберцовых костях установили увеличение уровня щелочной фосфатазы, начиная с конца первой недели, что наблюдалось и в проведенном исследовании [11].

По данным Bowles S.A. и др. (1996) у пациентов с переломами большеберцовых костей уровень тканеспецифической формы щелочной фосфатазы линейно повышался в течение двадцати недель после перелома, что противоречит полученным собственным данным, но при этом динамика изменений костной изоформы щелочной фосфатазы была такой же как и в настоящей работе [9].

Согласно результатам исследования Kompenou A. и др. (2005) у собак после создания модели перелома диафиза кости содержание щелочной фосфатазы повышается к десятым суткам и затем снижается к пятидесятым суткам. Однако динамика изменения кальция в этом же исследовании совпала с таковой в проведенной работе [12].

По данным Qi H. и др. (2020) у пациентов с компрессионными переломами позвонков уровень щелочной фосфатазы снижался к десятым суткам и повышался к тридцати суткам, а уровень кальция увеличивался к десяти суткам, затем снижался к двадцати суткам и повышался к концу эксперимента [15].

Таким образом, нет однозначных данных об изменении уровней кальция и щелочной фосфатазы в сыворотке крови в разные сроки после возникновения переломов костей. Это может быть обусловлено зависимостью системной реакции организма на травму от типа кости, подвергавшейся перелому, степени нагрузки на нее у человека и экспериментальных животных. В настоящей работе низкие уровни кальция и щелочной фосфатазы на 3 и 10 сутки могут быть обусловлены интенсивной перестройкой гематомы, формирующейся в месте перелома кости и отсутствием остеобластов, продуцирующих щелочную фосфатазу. В следующие сроки эксперимента содержание кальция и щелочной фосфатазы постепенно нарастали, видимо из-за снижения интенсивности катаболических процессов в области перелома, дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в клетки остеогенной линии, а также старте их синтетической и секреторной активности.

Выявленное в группах БенНат500Д, БенНат1000Д, Тар750Д, Тар1500Д снижение уровней кальция и щелочной фосфатазы, по сравнению с данными группы ФизДеф, может быть связано с тем, что клетки костной ткани в области большеберцовых костей, в которой будет моделироваться перелом, длительно подвергались воздействию бензоата натрия или тартразина - пищевых добавок с установленными прооксидантными и генотоксическими эффектами на клетки. Поэтому данная область большеберцовых костей на 60-е сутки воздействия пищевых добавок в морфо-функциональном отношении уже не является интактной, как в группе ФизДеф, а имеет измененное строение, химический состав, ультраструктуру минерального компонента [5, 6, 7, 13]. Более выраженные изменения маркеров костеобразования в группах Тар750Д,

Тар1500Д, чем в группах БенНат500Д, БенНат1000Д обусловлены более широким спектром неблагоприятного влияния тартразина на организм, в частности хелатообразующие свойства в кишечнике, которые уменьшают всасывание цинка в кровоток, являющегося составным компонентом щелочной фосфатазы [18, 19].

Выводы:

1. Шестидесятидневное воздействие бензоата натрия или тартразина в разные сроки после моделирования переломов в большеберцовых костях сопровождается уменьшением уровня кальция и щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс, по сравнению с данными группами без введения пищевых добавок. В группах с введением тартразина в дозах 750 и 1500 мг/кг изменения были более выражены, чем в группах с введением бензоата натрия в дозах 500 и 1000 мг/кг.

2. Динамика изменений значений этих биохимических показателей как внутри контрольной, так и экспериментальных групп имеет двухфазный характер: уменьшение уровней кальция и щелочной фосфатазы с 3 по 10 сутки и их увеличение с 10 по 45 сутки.

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

Источник финансирования: Авторы заявляют о финансировании проведенного исследования из собственных средств.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Бибики В.В. Структура мыщелкового хряща нижней челюсти белых крыс после 60-суточного введения натрия бензоата либо тартразина. Морфологический альманах имени В.Г. Ковешникова. 2023;21(2):102-7. [Bibik VV. Structure of the condylar cartilage of the mandible in white rats after 60 days of administration of sodium benzoate or tartrazine. V.G. Koveshnikov Morphological Almanac. 2023;21(2):102-7. (in Russ.)].

2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Москва: Практика, 1998. 459 с. [Glantz S. Primer of Biostatistics. Moscow: Praktika, 1998. 459 p. (in Russ.)].

3. Лузин В.И., Ивченко Д.В., Панкратьев А.А. Методика моделирования костного дефекта у лабораторных животных. *Український медичний альманах*. 2005;8(2):162. [Luzin VI, Ivchenko DV, Pankrat'ev AA. Method for modeling a bone defect in laboratory animals. *Ukrainian Medical Almanac*. 2005;8(2):162. (In Russ.)].

4. Лузин В.И., Фастова О.Н., Морозов В.Н., Морозова Е.Н. Макро- и микроэлементный состав проксимального эпифиза большеберцовых костей крыс после 60-ти дневного введения тартразина в разных дозах. *Медицинская наука и образование Урала*. 2019;20(3):54-7. [Luzin VI, Fastova ON, Morozov VN, Morozova EN. Macroelemental and microelemental composition of tibia proximal epiphysis in rats after different doses 60-day tartrazine exposure. *Medical Science and Education of Ural*. 2019;20(3):54-7. (in Russ.)].

5. Лукьянцева Г.В., Пастухова В.А., Ковальчук О.И., Дутчак У.М. Зміни хімічного складу плечових кісток щурів під впливом жовтого барвника тартразину. *Світ медицини та біології*. 2019;4(70):203-8. [Lukyantseva GV, Pastukhova VA, Kovalchuk AI, Dutchak UM. Changes in the chemical composition of the rat's humeri under the influence of yellow tartrazine stain. *World of Medicine and Biology*. 2019;4(70):203-8. (In Ukrainian)].

6. Лукьянцева Г.В. Гистологическая структура проксимального эпифизарного хряща плечевой кости у белых крыс после двухмесячного употребления натрия бензоата и возможности ее коррекции. *Загальна патологія та патологічна фізіологія*. 2015;10(1):112-8. [Lukyantseva GV. Histological structure of proximal epiphyseal cartilage of humerus in rats after 2-month sodium benzoate intake and possibilities of its correction. *General pathology and pathophysiology*. 2015;10(1):112-8. (in Russ.)].

7. Лукьянцева Г.В. Гистологическое строение диафиза плечевой кости у белых крыс после двухмесячного употребления натрия бензоата. *Світ медицини та біології*. 2014;10(4-2):161-4. [Lukyantseva G. Histological structure of mid-shaft zone of humerus in rats after 2-month sodium benzoate intake. *World of Medicine and Biology*. 2014;10(4-2):161-4. (in Russ.)].

8. Лукьянцева Г.В. Структурно-функциональное состояние проксимального эпифизарного хряща плечевых костей у белых

- крыс после двухмесячного употребления тартразина. *Український морфологічний альманах*. 2014;12(3):46-51. [Lukyantseva GV. Histological structure of the proximal epiphyseal cartilage of humerus after 60-day application of tartrazine. *Ukrainian Morphological Almanac*. 2014;12(3):46-51. (in Russ.)].
9. Bowles SA, Kurdy N, Davis AM, France MW, Marsh DR. Serum osteocalcin, total and bone-specific alkaline phosphatase following isolated tibial shaft fracture. *Annals of clinical biochemistry*. 1996;33(Pt 3):196-200.
10. Directive 2010/63/ EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes // *Official Journal of the European Union*. 2010;53(L276):33-79.
11. He X, Shen Q. Salvianolic acid B promotes bone formation by increasing activity of alkaline phosphatase in a rat tibia fracture model: a pilot study. *BMC Complementary and alternative medicine*. 2014;14:493.
12. Komnenou A, Karayannopoulou M, Polizopoulou ZS, Constantinidis TC, Dessiris A. Correlation of serum alkaline phosphatase activity with the healing process of long bone fractures in dogs. *Veterinary clinical pathology*. 2005;34(1):35-38.
13. Morozov V, Luzin VI. The effect of 60-day administration of sodium benzoate and mexidol on the ultrastructure of the regenerate formed in the rat's tibiae. *Abstracts of the ECTS 2023 Congress featuring BRS Annual Meeting: 50th European Calcified Tissue Society Congress (15-18 April 2023, Liverpool, United Kingdom)*. Liverpool. 2023: P097. URL: <https://2023.ectsoc.org/programme/#!abstractdetails/0000052950> (date of the application: 12.05.2023).
14. Piper JD, Piper PW. Benzoate and Sorbate Salts: A Systematic Review of the Potential Hazards of These Invaluable Preservatives and the Expanding Spectrum of Clinical Uses for Sodium Benzoate. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2017;16(5):868-80.
15. Qi H, Xue J, Gao J, Zhang Y, Sun J, Wang G. Changes of bone turnover markers and bone tissue content after severe osteoporotic vertebral compression fracture. *Medical science monitor*. 2020;26:e923713.
16. Rovina KA, Siddiquee S, Shaarani SM. Review of extraction and analytical methods for the determination of tartrazine (E 102) in foodstuffs. *Critical reviews in analytical chemistry*. 2017;47(4):309-24.
17. Savin M, Vrkatić A, Dedić D, Vlaški T, Vorgučin I, Bjelanović J, Jevtic M. Additives in Children's Nutrition-A Review of Current Events. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(20):13452.
18. Seo HJ, Cho YE, Kim T, Shin HI, Kwun IS. Zinc may increase bone formation through stimulating cell proliferation, alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Nutrition research and practice*. 2010;4(5):356-61.
19. Stevens LJ, Kuczek T, Burgess JR, Stochel-ski MA, Arnold LE, Galland L. Mechanisms of behavioral, atopic, and other reactions to artificial food colors in children. *Nutrition reviews*. 2013;71(5):268-81.
20. Wei H, Bi Y, Wang Y, Zhao Q, Zhang R, Li J, Bao J. Serum bone remodeling parameters and transcriptome profiling reveal abnormal bone metabolism associated with keel bone fractures in laying hens. *Poultry science*. 2023;102(4):102438.