

Methods for determining the morphological features of the lung under the influence of dyes used in the food industry and their phytocorrection

Dilnoza KHASANOVA¹, Zilola AZIMOVA²

Bukhara State Medical Institute named after Abu Ali ibn Sino

ARTICLE INFO

Article history:

Received August 2024

Received in revised form

10 September 2024

Accepted 25 September 2024

Available online

15 October 2024

Keywords:

food additive,
food safety,
nanoscale,
nanomaterial,
titanium dioxide,
toxicity.

ABSTRACT

The food industry actively uses various types of dyes, classified as synthetic and natural. Synthetic dyes, which are artificially created organic compounds, are not usually found in the natural environment. Their production is often carried out in the form of granules or powders, which are easily dissolved in an aqueous environment.

Unlike synthetic dyes, natural dyes are made exclusively from natural sources. These natural substances not only color foods, but also enrich them with biologically active elements and nutrients, increasing their nutritional value. However, natural dyes are susceptible to deterioration under the influence of high temperatures and air, which requires manufacturers to pay special attention to their storage conditions.

The problem of using food dyes in nanoforms, such as titanium dioxide (E171), iron oxides (E172), as well as metallic dyes based on silver (E174) and gold (E175), is becoming increasingly relevant and requires additional study. Nanoparticles have properties that can differ significantly from the properties of larger particles of the same substances, which creates the need for an in-depth analysis of their impact on human health.

In Uzbekistan, as well as at the international level, accepted methods for controlling the quality and safety of food coloring additives must meet standards that ensure the reliability of research results.

2181-3663/© 2024 in Science LLC.

DOI: <https://doi.org/10.47689/2181-3663-vol3-iss5-pp7-17>

This is an open-access article under the Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.ru>)

¹ DSc, Professor, Bukhara State Medical Institute named after Abu Ali ibn Sino. Bukhara, Uzbekistan.
E-mail: akwamarin80@gmail.com

² Basic Doctoral Student, Bukhara State Medical Institute named after Abu Ali ibn Sino. Bukhara, Uzbekistan.
E-mail: zilol2006alihan@gmail.com

Озиқ-овқат саноатида ишлаб чиқарилган бўёқлар таъсирида ўпканинг морфологик хусусиятларини аниқлаш усуллари ва уларнинг фитокоррекцияси

АННОТАЦИЯ

Калит сўзлар:

озиқ-овқат қўшимчаси,
озиқ-овқат хавфсизлиги,
нано ўлчов,
наноматериал,
титан диоксиди,
токсиклик.

Озиқ-овқат саноати турли хил синтетик ва табиий деб таснифланган бўёқлардан фаол фойдаланади. Сунъий равища яратилган органик бирималар бўлган синтетик бўёқлар одатда табиий муҳитда топилмайди. Уларнинг ишлаб чиқарилиши кўпинча гранулалар ёки кукунлар шаклида ишлаб чиқарилади, улар сувли муҳитда осон эрийди.

Синтетик бўёқлардан фарқли ўлароқ, табиий бўёқлар фақат табиий манбалардан тайёрланади. Бу табиий моддалар нафақат озиқ-овқат маҳсулотларини бўяш, балки уларни биологик фаол элементлар ва озуқа моддалари билан бойитиб, озуқавий қийматини оширади.

Бироқ, табиий бўёқлар юқори ҳарорат ва ҳаво таъсирида ёмонлашади, бу ишлаб чиқарувчилардан уларни сақлаш шароитларига алоҳида эътибор беришни талаб қиласди. Титан диоксиди (E171), темир оксиди (E172), шунингдек кумуш (E174) ва олтин (E175) асосидаги металл бўёқлар каби наношаклларда озиқ-овқат бўёқларидан фойдаланиш муаммоси тобора долзарб бўлиб бормоқда ва қўшимча тадқиқотларни талаб қиласди. Нанозаррачалар бир хил моддаларнинг каттароқ зарралари хоссаларидан сезиларли даражада фарқ қилиши мумкин бўлган хусусиятларга эга, бу эса уларнинг инсон саломатлигига таъсирини чуқур таҳлил қилиш заруратини келтириб чиқаради.

Ўзбекистонда, шунингдек, халқаро миқёсда озиқ-овқат бўёқлари қўшимчаларининг сифати ва хавфсизлигини назорат қилиш тадқиқот натижаларининг ишончлилигини таъминлайдиган даражада стандартларга жавоб бериши керак.

Методы определения морфологических особенностей легких под влиянием красителей, применяемых в пищевой промышленности, и их фитокоррекция

АННОТАЦИЯ

Ключевые слова:

пищевая добавка,
безопасность пищевых
продуктов,
наноразмерная,
наноматериал,
диоксид титана,
токсичность.

В пищевой промышленности широко применяются различные виды красителей, которые делятся на синтетические и натуральные. Синтетические красители представляют собой искусственно созданные органические соединения, не встречающиеся в природе. Они обычно производятся в виде гранул или порошков, которые легко растворяются в водной среде. В отличие от них,

натуральные красители изготавливаются из природных источников. Эти вещества не только обеспечивают окрашивание продуктов, но и обогащают их биологически активными элементами, повышая пищевую ценность. Однако натуральные красители подвержены негативному воздействию высоких температур и воздуха, что требует строгого соблюдения условий их хранения.

Особую актуальность приобретает проблема использования пищевых красителей вnanoформах, таких как диоксид титана (E171), оксиды железа (E172), а также металлические красители на основе серебра (E174) и золота (E175). Наночастицы обладают уникальными свойствами, которые могут значительно отличаться от свойств более крупных частиц этих же веществ. Это требует углубленного изучения их воздействия на здоровье человека.

В Узбекистане, как и на международном уровне, методы контроля качества и безопасности пищевых добавок и красителей должны соответствовать установленным стандартам, обеспечивая достоверность и точность результатов исследований.

В процессе инновационного развития пищевой промышленности и совершенствования технологии производства продуктов питания возрастает роль пищевых добавок. Для облегчения идентификации пищевых добавок с их сложными и многословными научными терминами, введена стандартизированная система маркировки, где каждое вещество идентифицируется буквой «Е», за которой следует числовой код. Буква «Е» здесь является указателем на европейское происхождение, а последующие цифры классифицируют добавку в соответствующую категорию, детализируя ее тип и функцию.

В соответствии с их функциональностью, пищевые добавки разделяются на следующие категории:

- Красители от Е100 до Е182 задействованы в изменении цвета продуктов;
- Консерванты с Е200 по Е299 применяются для продления срока хранения пищи;
- Антиокислители, охватывающие серию Е300-Е399, препятствуют окислению;
- Стабилизаторы и загустители, включенные в диапазон Е400-Е499, отвечают за сохранение текстуры продуктов;
- Эмульгаторы в серии Е500-Е599 создают однородную текстуру и препятствуют комкованию;
- Усилители вкуса и аромата находятся под кодами Е600-Е699;
- Диапазон от Е700 до Е899 оставлен свободным для будущего использования;
- Варианты от Е900 до Е999 включают пеногасители и вещества, угнетающие пламя [1, 2, 5, 9].

Существует большой список пищевых синтетических красителей, являющихся опасными для человека. Например, болезни печени и почек

вызывают следующие пищевые красители: диоксид титана (Е171), оксид железа (Е172), алюминий (Е173), образованию злокачественных опухолей способствуют: желтый прочный АВ (Е105), синий патентованный V (Е131), уголь (Е152) и т.д. Таким образом, в производстве используются пищевые красители натурального и синтетического происхождения. Натуральные пищевые красители при допустимом уровне дозировки оказывают положительное воздействие на организм человека, в отличие от некоторых синтетических пищевых красителей, потребление которых может навредить здоровью [1, 3, 4, 5]. При этом стоит отметить, что натуральные красители имеют не очень хорошие технологические свойства по сравнению с синтетическими красителями: они менее стойкие к воздействию света, температуры, окислителей, pH и обладают невысокой красящей способностью. Для синтетических пищевых красителей характерны: высокая красящая способность, термостабильность, высокая устойчивость к свету, окислителям и восстановителям, изменениям pH [7, 8, 11, 12].

Повсеместное использование пищевых добавок обосновано тем, что продукты питания перевозятся на большие расстояния, некоторые из них скоропортящиеся [9, 10, 16]. Введение в их состав добавок сопровождается увеличением срока хранения. Также предпочтения потребителя сводятся к привлекательному внешнему виду готовой продукции, низкой стоимости, удобству использования продуктов питания полуфабрикатов, хорошему вкусу [2, 6, 13, 14].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение влияния Е 171 (диоксид титана) и Е 173 (оксид алюминия) на морфологическое состояние легких путем совместного и раздельного применения и биологической коррекции с использованием водоросли спиркулины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено у 160 белых беспородных крыс обоих полов в возрасте от 5 до 8 месяцев с массой тела от 140 до 150 граммов. В ходе исследования все крысы содержались в условиях, соответствующих стандартам вивария. При выполнении работ с лабораторными животными строго придерживались всех необходимых биологических норм безопасности и этических принципов.

В первую ($n=50$) экспериментальную группу вошли 50 крыс, которым в течение 3 месяцев каждый день в одно и то же время вводили внутрижелудочно дисперсию наночастиц диоксида титана TiO_2 , входящую в состав красителя Е171, в дозах 10 мг/кг массы тела, по методу Gao, Guodong, et al. (2012). Вторая экспериментальная группа ($n=50$) также насчитывала 50 особей, которым вводили раствор дисперсии наночастиц оксида алюминия Al_2O_3 в дозе 70 мг/кг по методу Hamdi, H. (2020), содержащийся в красителе Е173. Третья экспериментальная группа ($n=50$) из 50 крыс получала комбинацию обеих дисперсий в тех же дозах.

Крысы получали перорально суспензию спиркулины на дистиллированной воде в дозировке 100 мг/кг массы тела, общим объемом 1 мл, согласно методу, описанному О.Н. Павловым и соавторами (2015). В процессе эксперимента вес крыс контролировался при помощи электронных весов с точностью до $\pm 0,5$ г, что позволило отслеживать динамику прибавления массы тела. Общая продолжительность эксперимента составила 95 дней.

Морфологический анализ включал изучение клеточной структуры, распределения и состояния различных типов клеток в легких, в то время как иммуногистохимический анализ фокусировался на выявлении специфических

белков и маркеров, связанных с воспалительными процессами, ростом ткани или наличием патологических изменений. В рамках исследования проводилась серия из не менее десяти микрофотографий для каждого образца легочной ткани, делая акцент на равномерное охватывание всей поверхности среза при увеличении в 100 раз. Для проведения морфологического анализа полученные ткани фиксировались 10% забуференным формалином в течение 24 часов. Последующие шаги иммуногистохимической реакции также проводились в условиях влажной камеры для предотвращения высыхания. Для минимизации неспецифической адсорбции применялся раствор Ultra-V Block, в котором срезы инкубировались на протяжении 30 минут. Для выявления CD68 использовались специфические мышиные моноклональные антитела к CD68 (клон KP1, Dako, разведение 1:100). Срезы инкубировали с первичными антителами в течение 30 минут, после чего тщательно промывали в фосфатном буфере. Количественный анализ проводился путем измерения процентного соотношения клеток с CD68-позитивной цитоплазмой к общему числу клеток в поле зрения.

Для исследования накопления наночастиц оксида алюминия (Al_2O_3) и диоксида титана (TiO_2) в биологических образцах был применен метод нейтронно-активационного анализа. Процесс исследования включал несколько ключевых этапов: подготовку образцов, облучение нейtronами, гамма-спектрометрический анализ и количественную оценку результатов.

Для количественного определения содержания элементов в образцах использовалась следующая формула:

$$C = I - I_0 / k$$

где C – концентрация элемента в образце (мкг/г), I – измеренная интенсивность гамма-излучения образца, I_0 – интенсивность фона, k – угловой коэффициент калибровочного графика.

В данном исследовании проведена комплексная статистическая обработка собранных данных с использованием программного обеспечения «Excel» и пакета MsOffice 2016.

Для определения статистической значимости различий между группами использовался критерий Стьюдента, что позволило оценить, являются ли различия между средними значениями статистически значимыми при уровне значимости $P < 0.05$. Это стандартный критерий для подавляющего большинства научных исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для установления базовых морфологических характеристик легких белых беспородных крыс, которые служат контрольной группой, были исследованы основные параметры, такие как вес, цвет и внешняя структура легких.

В начале эксперимента средний вес крыс составлял $180,6 \pm 3,7$ грамма. В течение 90-дневного эксперимента масса тела крыс увеличилась до $241,7 \pm 6,2$ грамма, что свидетельствует о нормальном развитии животных в контрольных условиях. Одновременно с этим происходило увеличение массы легких: с $1,4 \pm 0,03$ г до $2,4 \pm 0,05$ г. Если рассматривать пропорцию массы легких к массе тела, то в начале эксперимента она составляла от 0,66% до 0,78%, а к концу увеличилась до

0,66%–0,95%. Увеличение массы тела сопровождается соответствующим увеличением массы легких, что необходимо для поддержания адекватного уровня газообмена в организме. В данном случае легочная ткань развивалась пропорционально росту массы тела, что говорит об отсутствии патологических изменений и нормальном функциональном состоянии дыхательной системы.

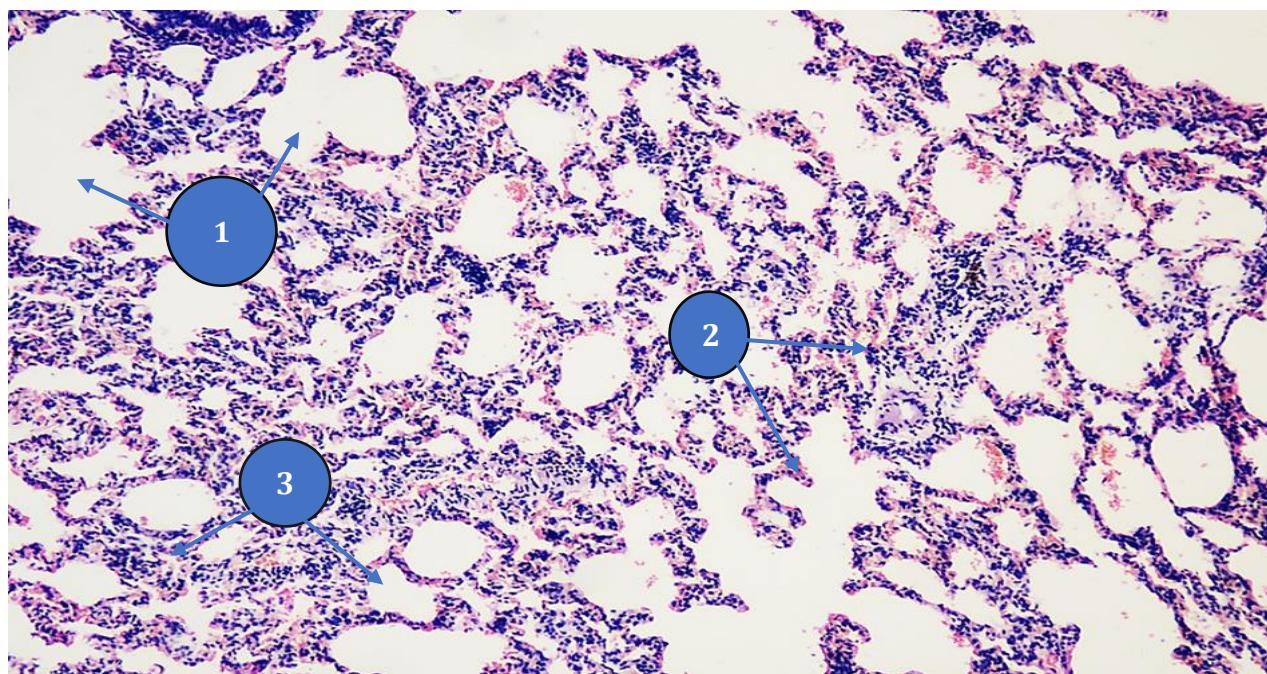


Рис 1. Микропрепараторы легкие 8 месячная контрольная группа крыс в течении 90 суток. Окраска Г-э. увеличение ок 4 х об 20
1-респираторная бронхиола; 2-терминальная бронхиола; 3-альвеолы.

В рамках исследования изучалось изменение массы тела животных для выявления нарушений метаболических процессов и оценки физического развития крыс под воздействием TiO_2 и Al_2O_3 , проводилась оценка веса легких для определения изменений объема и плотности легочной ткани, что могло бы указывать на отек, воспаление или фиброз. Также анализировались цвет и внешний вид легких для выявления возможных патологий, таких как гипоксия или воспаление, и оценивалась структура легких, включая поверхность, плотность и текстуру, с целью выявления воспалительных или фиброзных изменений. При сравнении с контрольной группой, масса легких в экспериментальной группе оказалась на 0,4 г ниже, что составляет около 16,7% от массы легких в контрольной группе на 90-й день эксперимента.

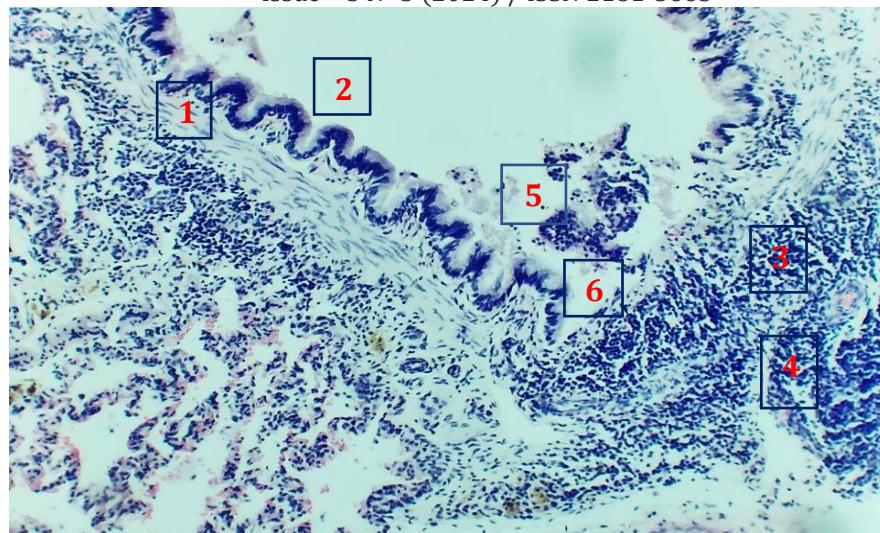


Рис 2. Микропрепараты 8 месяцев легких крысы после воздействия TiO_2 и Al_2O_3 в течении 90 суток. Окраска Г-Э. Увеличение ок 10 х об 20.

1-в главных бронхах наблюдалось утолщение базальной мембранны и инфильтративный процесс; 2-в главных бронхах наблюдалось утолщение приватной пластиинки и инфильтративный процесс; 3-полнота сосудов внутри; 4-БАЛТ (бронхоассоциированная лимфоидная ткань) диффузная гиперплазия лимфоидной ткани; 5-инфилтративный процесс, протекающий внутри и 6-снаружи бронхов.

Нормальная архитектура альвеол нарушена, они выглядят уменьшенными и деформированными, в их просветах виден экссудат.

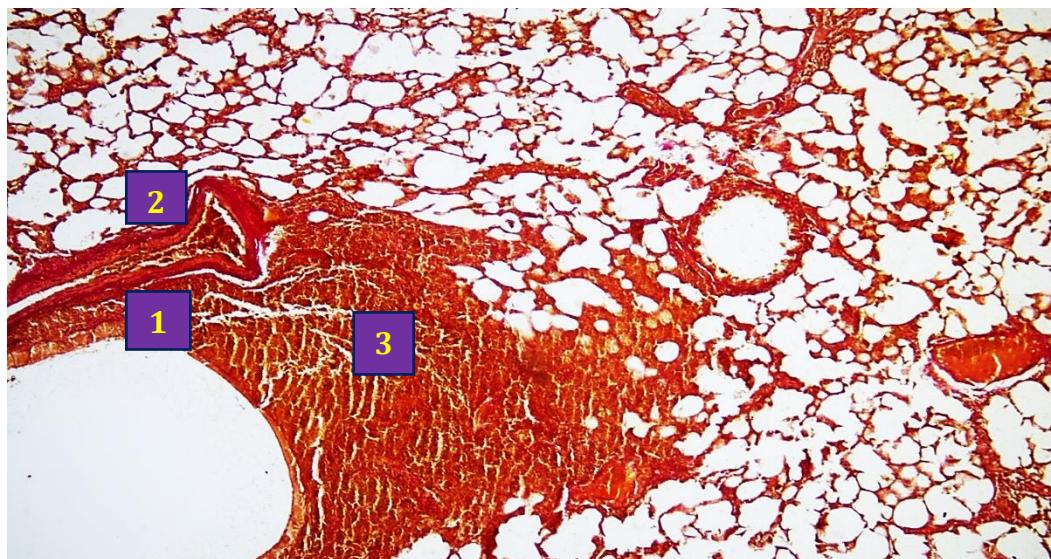


Рис.3. Микропрепараты легких крысы после воздействия TiO_2 и Al_2O_3 в течение 90 суток. Окраска В-Г. Увеличение ок 10 х об 20.

1-в главных бронхах наблюдалось утолщение базальной мембранны и инфильтративный процесс; 2-полнота кровеносных сосудов; 3-сильный воспалительный процесс (автоиммунный процесс)

Изображение 3 показывает дальнейшее развитие структурных изменений с уплотнением соединительной ткани и наличием небольших воспалительных очагов, что еще более нарушает функции легочной ткани.

Для оценки влияния спирулины на процессы восстановления тканей легких после интоксикации диоксидом титана и оксида алюминий, крысы в течение 30 дней получали спирулину в дозировке 100 мг/кг массы тела. Лечение началось на 61-й день эксперимента, сразу после окончания 60-дневного воздействия TiO_2 и Al_2O_3 . Экспериментальные результаты показывают значительное улучшение морфологических и физиологических параметров легочной ткани у животных, получавших спирулину.

В группе, получавшей коррекцию спирулиной, вес легких составил $2,2 \pm 0,05$ г. Это положительный фактор, указывающий на частичное восстановление легочной ткани под воздействием спирулины, приближая показатели к контрольной группе.

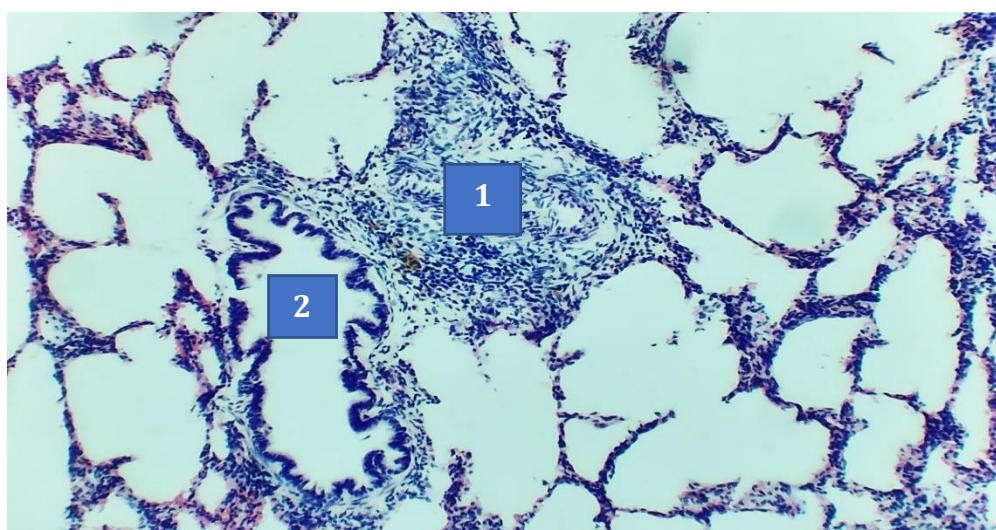


Рис 4. Микропрепараты легких крысы после коррекции спириной.

Окраска Г-Э. Увеличение ок 4x об 20.

1-частичное снижение инфильтрации, 2-снижение проницаемости сосудов.

В совокупности данные изображения подтверждают наличие регенеративных изменений легочной ткани после применения спирулины, что проявляется в уменьшении воспалительного процесса и нормализации структуры бронхиол и альвеол. Легкие крыс, получавших спирулину, сохранили розовый цвет и гладкую поверхность, что контрастировало с серыми, уплотненными легкими группы, не получавшей лечение. При пальпации легкие из группы $TiO_2 + Al_2O_3$ спириной демонстрировали более мягкую и эластичную структуру, приближающуюся к контрольным показателям. В группе без лечения наблюдалась участки с повышенной жесткостью, наблюдалось развитие фиброзных изменений.

Морфологические изменения в легких крыс развивались постепенно в течение 90 дней.

В нашем исследовании было обнаружено что в «экспериментальных» группах с признаками фиброзных изменений отмечается интенсивная пролиферация CD68. При этом наблюдается окрашивание не только альвеолярных и интерстициальных макрофагов, но и гистиоцитов, находящихся в образованных перибронхиальных

лимфоидных группах. В леченных группах CD68 заметно уменьшился, окрашивая небольшую популяцию макрофагов.

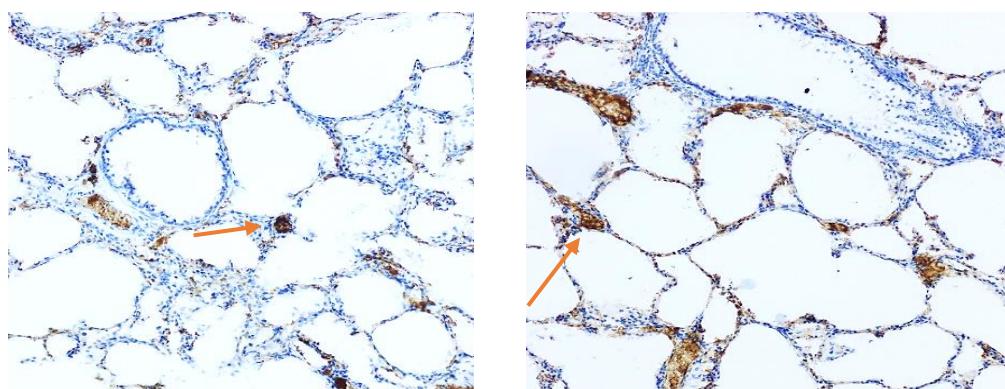
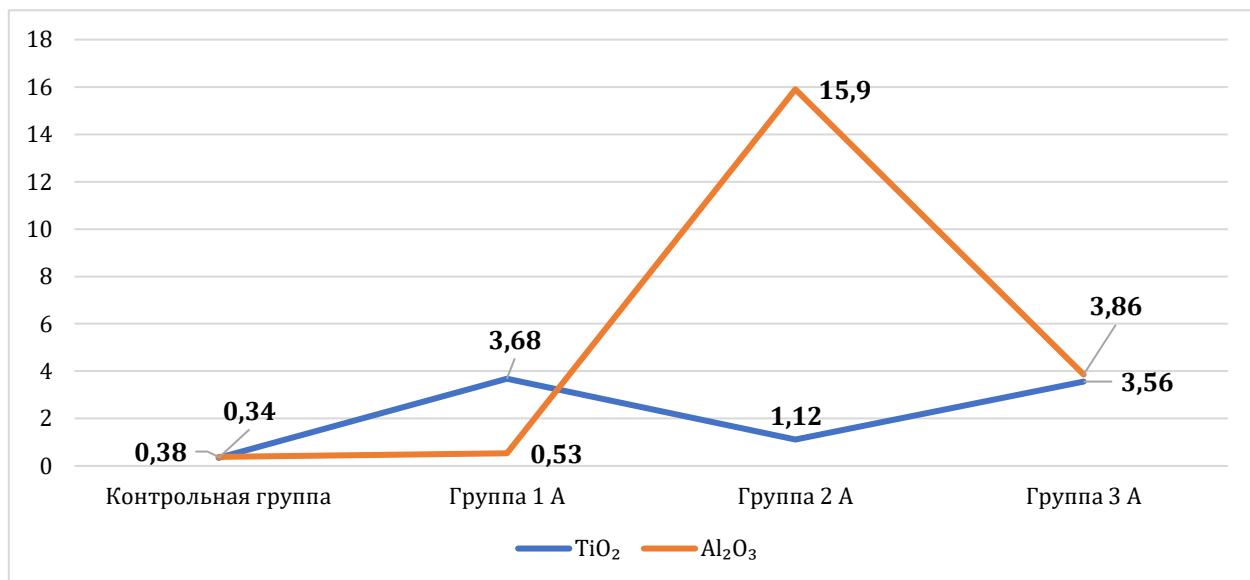


Рис. 4. ИГХ исследование маркером CD68 (КР-1). Увеличение об 10 х ок 20.

Отмечаются единичные слабо положительно окрашенные альвеолярные макрофаги (**стрелка, в количестве 1-2шт**), расположенные в легочных альвеолах и межальвеолярной перегородке в непосредственной близости от пневмоцитов. Интерстициальные макрофаги не отмечаются.

В ходе исследования для анализа содержания элементов в легких крыс, подвергшихся воздействию наночастиц диоксида титана (TiO_2) и оксида алюминия (Al_2O_3), использовался метод нейтронно-активационного анализа (НАА)



Было обнаружено, что содержание алюминия снизилось до 0,73 мкг/г, а титана – до 0,68 мкг/г в легких крыс, получавших спирулину.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Экспериментальные результаты показывают значительное улучшение морфологических и физиологических параметров легочной ткани у животных, получавших спирулину.

2. В рамках исследования были проведены морфологические и гистологические оценки, результаты которых подтверждают как наличие воспалительных процессов, так и регенеративные изменения, обусловленные коррекцией.

3. После применения спирулины наблюдается начальная фаза восстановления ткани: в ряде участков альвеолярные перегородки выглядят более тонкими, указывая на частичное ослабление воспаления и активизацию регенеративных процессов.

4. Несмотря на интенсивность воспаления, в структуре стенок бронхиол также наблюдаются признаки восстановления. Видимые участки с уменьшенным воспалительным инфильтратом указывают на позитивное влияние спирулины, направленное на регенерацию эпителия и нормализацию структуры дыхательных путей.

5. Утолщение стенок бронхиолов продолжает указывать на воспалительный процесс, но начальные признаки регенерации также наблюдаются. Участки с нормализованной структурой альвеол отражают положительное воздействие спирулины на восстановление легочной ткани после интоксикации оксидом алюминия.

6. На основе полученных данных можно сделать вывод, что применение спирулина оказывает выраженное терапевтическое воздействие на лёгочную ткань, подвергнутую интоксикации TiO_2 . Улучшение всех ключевых морфометрических показателей свидетельствует о снижении воспалительных процессов, восстановлении структуры альвеол и нормализации микроциркуляции. Процент фиброзных изменений также значительно сократился, что подтверждает антифибротический эффект фитокоррекции. Все параметры продемонстрировали значимые различия до и после фитокоррекции, что подтверждает высокую эффективность метода ($p < 0.05$ для всех параметров).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ:

1. Бессонов В.В., Передеряев О.И., Богачук М.Н., and Малинкин А.Д. "Пищевые красители в современной индустрии пищи – безопасность и контроль" Пищевая промышленность, no. 12, 2012, pp. 20-24.
2. Самсонова М. В., Черняев А.Л. Гистологическая дифференциальная диагностика грануллематозных болезней легких (часть I) //Архив патологии. - 2019. - Т. 81. - №. 1. - С. 65-70.
3. ГОСТ Р 52671-2006. Продукты пищевые. Методы идентификации и определения массовой доли синтетических красителей в карамели. -М.: Стандартинформ, 2007. – 23-52 с.
4. Bahadar H., Maqbool F., Niaz K. et al. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models // Iranian Biomedical Journal. 2016. N 20 (1). P. 1-11.
5. Lee D., Fanucchi M. V., Plopper C. G., Fung J., Wexler A.S. Pulmonary architecture in the conducting regions of six rats // Anat. Rec. (Hoboken). 2008. Vol.291, №8. P.916-926.
6. Шурлыгина, А. В., et al. "Влияние комплекса мелатонина, оксида алюминия и полиметилсилоксана на клеточный состав селезёнки мышей, содержащихся в условиях круглосуточного освещения." *Acta Biomedica Scientifica* 6.4 (2021): 252-264.
7. Mohamed H.R. Estimation of TiO_2 nanoparticle-induced genotoxicity persistence and possible chronic gastritis-induction in mice // Food Chem. Toxicol. - 2015. – Vol. 83. – P. 76-83.

8. Jovanovrc B. Critical review of public health regulations of titanium dioxide, a human food additive // Integrated environmental assessment and management. – 2014. – Vol. 11, № 1. – P. 10-20.
9. Н.А. Тюмина. "Количественные характеристики популяции реснитчатых эпителиоцитов бронхов крыс в процессе формирования дефинитивной структуры легких" Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание, vol. 12, no. 5, 2018, pp. 259-263.
10. Тутельян В.А. и др. Оптимальное питание-основа здорового образа жизни //Здоровье молодежи: новые вызовы и перспективы. – 2019. – С. 228-249.
11. Azimova Z.S., (2023) Morphological Parameters of Rats After the Introduction of Titanium Dioxide (TiO₂) Nanoparticles. Journal of healthcare and life-science, №2(3),34-38
12. Azimova, Z. S. (2022). Side Effects of Dietary Supplement E-171 (Titanium Dioxide) Associated with the Specific Toxicity of the Particles to the Body. Research Journal of Trauma and Disability Studies,2022, №1(9), 60-66.
13. Bettini S, Boutet-Robinet E, Cartier C, Coméra C, Gaultier E, Dupuy J, Naud N, Taché S, Grysant P, Reguer S, Thieriet N, Réfrégiers M, Thiaudière D, Cravedi JP, Carrière M, Audinot JN, Pierre FH, Guzylack-Piriou L, Houdeau E. Food-grade TiO₂ impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. Sci Rep. 2017 Jan 20; 7:40373. doi: 10.1038/srep40373. PMID: 28106049; PMCID: PMC5247795.
14. Azimova Z.S. (2022) The effect of food dyes on the development of kidney diseases in children/ Barqarorlik va etakchi tadqiqotlar onlayn ilmiy jurnali №2(12),652-658
15. Азимова З.С. (2024), Морффункциональные особенности легких под влиянием красителей, применяемых в пищевой промышленности, и их фитокоррекция .Фундаментал ва клиник тиббиёт ахборотномаси № 4 (10),265-266.
16. Азимова З.С., Хасанова Д.А. (2024) Характеристика побочного эффекта пищевой добавки Е-171(титан диоксид) и её связь с специфической токсичностью для организма (обзор литературы) Тиббиётда янги кун №8 (70), (23-27).