БІОХІМІЯ, БІОТЕХНОЛОГІЯ, МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА

УДК 577.152.6 *https://doi.org/10.31861/biosystems2023.02.090*

СТАН СИСТЕМИ БІОТРАНСФОРМАЦІЇ КСЕНОБІОТИКІВ У МІКРОСОМНІЙ ФРАКЦІЇ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ БЕНЗОАТУ НАТРІЮ Й АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ

О. В. КЕЦА, М. М. МАРЧЕНКО

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
вул. Коцюбинського, 2, Чернівці, 58012
e-mail: o.ketsa@chnu.edu.ua

У роботі проведено дослідження поєднаного впливу харчових консервантів – бензоату натрію й аскорбінової кислоти на стан компонентів монооксигеназної системи (МОС) у мікросомній фракції клітин печінки щурів. Вивчено зміни рівня цитохрому Р450 і цитохрому b_5, а також швидкості відновлення-окислення цих гемопротеїнів у мікросомній фракції печінки щурів за умов введення в організм бензоату натрію й аскорбінової кислоти.

Під час проведення експерименту щурів поділили на чотири групи: І група – контроль (інтактні тварини); ІІ група – щурі, яким вводили аскорбінову кислоту у дозі 30 мг на кг маси тварин; ІІІ група – щурі, яким вводили бензоат натрію у дозі 750 мг на кг маси тварин; IV група – щурі, яким вводили бензоат натрію за 30 хв до введення аскорбінової кислоти. Бензоат натрію й аскорбінову кислоту вводили щоденно per os протягом 21 доби. Евтаназію тварин проводили під легким ефірним наркозом на 21-шу добу після початку введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти.

Встановлено, що тритижневе введення в організм тварин бензоату натрію призводить до зниження рівня цитохрому Р450, яке відбувається за рахунок підвищення швидкості переходу цитохрому Р450 у його неактивну форму Р420. Показано, шо поряд із зниженням цитохрому Р450 у мікросомній фракції печінки знижується рівень цитохрому b_5 з одночасним підвищенням швидкості відновлення-окиснення цього гемопротеїну. Вищу деструктивну дію бензоат натрію проявляє при поєднаному введенні його в організм з аскорбіновою кислотою, що виражається знижнням рівня гемопротеїнів МОС та може бути наслідком утворення в організмі небезпечних метаболітів – бензойної кислоти та бензолу.

Ключові слова: цитохром Р450; цитохрому b_5; мікросомна фракція; печінка; бензоат натрію; аскорбінова кислота.

Вступ. Надходження ксенобіотиків у організм супроводжується їхньою біотрансформацією у результаті дії ензимів І та ІІ фаз детоксикації чужорідних речовин (Tonelli et al., 2018). У першій фазі біотрансформації чужорідні сполуки піддаються ензимному гідроксилюванню, що сприяє підвищенню полярності тієї чи іншої речовини (Fu et al., 2020). До таких гідроксилюючих ензимів належать компоненти монооксигеназної системи (МОС), зокрема цитохром Р450 (Zhao et al., 2021). Функціонування цитохрому Р450 значною мірою залежить від стану інших складових МОС – флавінвмісних редуктаз і цитохрому b_5., які передають електрони від NADH і NADPH на цитохром Р450 (Sahoo et al., 2023). Тому, вивчення стану МОС за умов надходження різних ксенобіотиків у організм є досить актуальним.

На особливу увагу сьогодні заслуговують харчові ксенобіотки, які виробниками додаються до різних продуктів (Nogacka et al., 2019). До таких речовин можна віднести консерванти – групу сполук, які підвищують терміни придатності продукції (Witkowski et al., 2022). Консерванти пригнічують ріст мікроорганізмів, завдяки яким відбуваються процеси гниття та розкладання у продуктах харчування (Stroppel et al., 2023). Консерванти широко використовуються не тільки в їжі, але й у парфумерії, деревині, сільському господарстві, промисловості, проте основне джерело їхнього потрапляння в організм людини – їжа (Lidén et al., 2018).

До найбільш поширених консервантів належить бензоат натрію, який позначають як Е211. Допустима доза цього консерванта для людини на добу становить 5 мг/кг (Walczak-Nowicka et al., 2018). Проте, в реальних умовах людина споживає значно більшу кількість цього ксенобіотика з продуктами харчування.

Бензоат натрію належить до консервантів, які

можуть негативно або позитивно впливати на функціонування компонентів МОС, особливо при його хронічному введенні у високих дозах (Seetharam et al., 2022). Тому, відкритими залишаються питання впливу харчових ксенобіотиків на стан МОС, які, з одного боку, метаболізуються компонентами МОС, а з іншого – можуть бути джерелом токсичних метаболітів.

Іншою проблемою залишається сукупність введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти, що часто спостерігається у повсякденному житті. Введення харчових ксенобіотиків, як субстратів цитохрому Р450, може не лише стимулювати роботу МОС, але й сприяти її порушенням за рахунок впливу утворених проміжних продуктів у процесі біотрансформації (Zhao et al., 2021). Це ініціюватиме підвищення генерації активних форм кисню (АФК) компонентами МОС.

Враховуючи вище вказане метою роботи було оцінити особливості змін вмісту та активності компонентів МОС у мікросомній фракції печінки щурів за дії бензоату натрію й аскорбінової кислоти.

Матеріали та методи. Експериментальні дослідження проводили на тваринах, а саме на білих безпородних щурах, масою від 130 до 150 г. Усі дослідні тварини отримували стандартний раціон віварію та мали вільний доступ до води. Згідно з біоетичними нормами, усі маніпуляції з тваринами проводили з дотриманням положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986) (Edition, 2011).

Тварин, які були залучені в експеримент, розділили на 4 групи: I група – контрольна, яку складали інтактні тварини; II група – тварини, які отримували аскорбінову кислоту, що вводили per os; III група – тварини, які отримували бензоат натрію, що вводили per os; IV – тварини, яким вводили бензоат натрію, а через 30 хв вводили аскорбінову кислоту per os.

Бензоат натрію досліджуваним групам щурів вводили щоденно у дозі 750 мг/ кг маси тварин. Аскорбінову кислоту також вводили щоденно, але у дозі 30 мг/кг маси тварин. Введення цих речовин здійснювали протягом трьох тижнів (21-ї доби). Евтаназію дослідних тварин здійснювали під легким ефірним наркозом на 21-у добу після початку введення тваринам харчових добавок. З тварин видаляли печінку та виділяли мікросомну фракцію за методом (Schenkman et al., 1978). У мікросомній фракції визначали вміст цитохрому Р450 і цитохрому b_5.

Визначення вмісту цитохрому Р450 полягало у спектрофотометричному вимірюванні різниці поглинання спектрів окисленої і відновленої форм цитохрому Р450 (Shymanskyi et al., 2018).

Для утворення відновленого комплексу цитохром Р450–монооксид вуглецю (CO), через дослідну пробірку CO пропускали протягом 1 хв. CO отримували шляхом додавання концентрованої сірчаної кислоти до концентрованої мурашиної кислоти. Очистку CO від залишків кисню проводили шляхом пропускання газу через розчин пірогалолу. Вимірювання проводили при 450 нм (максимальне поглинання) та при 490 нм (мінімальне поглинання). Вміст цитохрому Р450 виражали в нмоль/мг протеїну з урахуванням коефіцієнту молярної екстинції 91 $мМ^{-1}{\cdot}см^{-1}$.

Визначення вмісту цитохрому b_5 полягало у вимірюванні різниці поглинання окисленої та відновленої форм цитохрому b_5 при 428 нм (максимальне поглинання) та при 408 нм (мінімальне поглинання). Вміст цитохрому b_5 виражали в нмоль/мг протеїну з урахуванням коефіцієнту молярної екстинції 164 $мМ^{-1}{\cdot}см^{-1}$ (Shymanskyi et al., 2018).

Визначення швидкості переходу цитохрому Р450 в його неактивну форму Р420 проводили при реєстрації диференційних спектрів поглинання та розраховували за різницею показників при довжинах хвиль 420 і 450 нм ($_{\Delta}A_{420\text{-}450}$) на мг протеїну.

Показником швидкості відновлення-окислення цитохрому b_5 слугує рівень його максимального відновлення (pm) і час напівокислення (t1/2). Зниження або підвищення pm на фоні мінімального t1/2 є показником відповідної зміни швидкості реакції відновлення цитохрому. Відновлення цитохрому b_5 виміряли за $_{\Delta}A_{424\text{-}475}$ (Shymanskyi et al., 2018).

Обробку результатів здійснювали із застосуванням метода варіаційної статистики з використанням t-критерію Ст'юдента.

Результати та їх обговорення. До складу системи гідроксилювання ксенобіотиків входять електрон-транспортні комплекси, які включають флавопротеїни (NADPH-залежну Р450-редуктазу, NADH-залежну b_5-редуктазу) та цитохроми Р450 і b_5 (Harjumäki et al., 2021). Бензоат натрію, який надходить у клітину, в першу чергу, метаболізується цитохромом Р450 та може ініціювати роботу МОС.

Результати проведених досліджень показали, що введення бензоату натрію у дозі 750 мг на кг маси тварин впливало на зміни рівня цитохрому Р450 у мікросомній фракції печінки щурів. Так, у цієї групи тварин спостерігалося зниження вмісту цитохрому Р450 у мікросомній фракцій печінки щурів у 1,4 рази порівняно із показниками групи інтактних тварин (рис.1). Зниження рівня цитохрому Р450 у мікросомній фракції печінки щурів може вказувати на порушення

детоксикаційної функції печінки у цієї групи тварин. Суттєвіше зниження спостерігалося при поєднаному введенні бензоату натрію й аскорбінової кислоти, оскільки рівень цитохрому Р450 у мікросомній фракції печінки щурів знижувався у 1,9 рази порівняно із показниками групи інтактних тварин (рис.1).

Встановлені результати вказують на той факт, що у під час метаболізму консерванта можуть утворюватися проміжні продукти, які мають потенційно небезпечні властивості та інактивують цитохром Р450 (Dar et al., 2020).

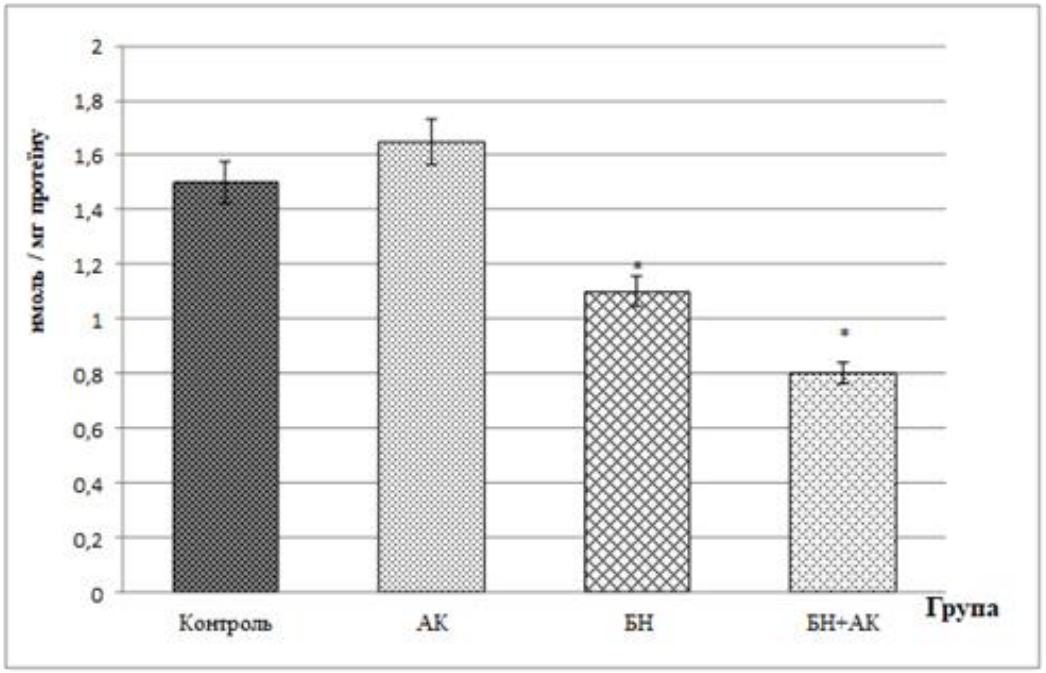

Рис. 1. Вміст цитохрому Р450 у мікросомній фракції печінки щурів за умов введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти

Fig. 1. The content of cytochrome P450 in the microsomal fraction of rat liver under the administration of sodium benzoate and ascorbic acid

*Примітка (тут і на рис. 3): АК – щурі, яким вводили аскорбінову кислоту; БН – щурі, яким вводили бензоат натрію; БН+АК – щурі, яким вводили бензоат натрію за 30 хв до введення аскорбінової кислоти; * – статистично достовірна різниця порівняно з показником інтактних тварин (p≤0,05).*

Note (here and in fig. 3): AA – rats, which were administration of ascorbic acid; NB – rats, which were administration of sodium benzoate; NB+AA – rats, which were administration of sodium benzoate 30 min before the introduction of ascorbic acid; – statistically significant difference compared to intact animals (p≤0,05).*

Однією із причин зниження рівня цитохрому Р450 може бути його інактивація і перехід у неактивну форму Р420. Щоб перевірити це припущення нами визначено швидкість переходу цитохрому Р450 у його неактивну форму цитохром Р420 (Manna et al., 2008).

Аналіз результатів показав, що у групі тварин, яким вводили бензоат натрію спостерігалося незначне підвищення швидкості переходу цитохрому Р450 у його неактивну форму (рис.2). Інтенсифікація інактивації цитохрому Р450 більше виражена у щурів, яким вводили бензоат натрію й аскорбінову кислоту (рис.2). Імовірно, під час одночасного введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти утворюються токсичні речовини, які безпосередньо або опосередковано негативно можуть впливати на функціонування МОС (Kehinde et al., 2018).

Оскільки мембрани ендоплазматичного ретикулуму (ЕР) стабілізують ензим у функціонально-активній конформації, то підвищення швидкості інактивації цитохрому Р450 може бути наслідком порушення мембран ЕР у результаті підвищення процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) в мікросомній фракції печінки (Zou et al., 2020). З іншого боку, підвищення швидкості утворення неактивної форми цитохрому Р420, може бути пов’язано з генерацією АФК в активному центрі цитохрому Р450 (Gál et al., 2015). Проміжні сполуки, які утворюються під час біотрансформації бензоату натрію можуть запускати ланцюг вільнорадикальних процесів у мікросомній фракції і призводити до ініціації процесів ПОЛ. Окрім того, цитохромом Р450 може генеруватися супероксидний радикал, який також є ініціатором процесів ПОЛ (Walczak-Nowicka et al., 2022).

Введення лише аскорбінової кислоти у дозі 30 мг на кг маси тварин не призводило до зміни вмісту цитохрому Р450 у мікросомній фракції

печінки (рис.1). Водночас, на рівні значень інтактних тварин залишався показник швидкості інактивації цитохрому Р450 у щурів, яким щоденно вводили аскорбінову кислоту в фізіологічних дозах (рис.2).

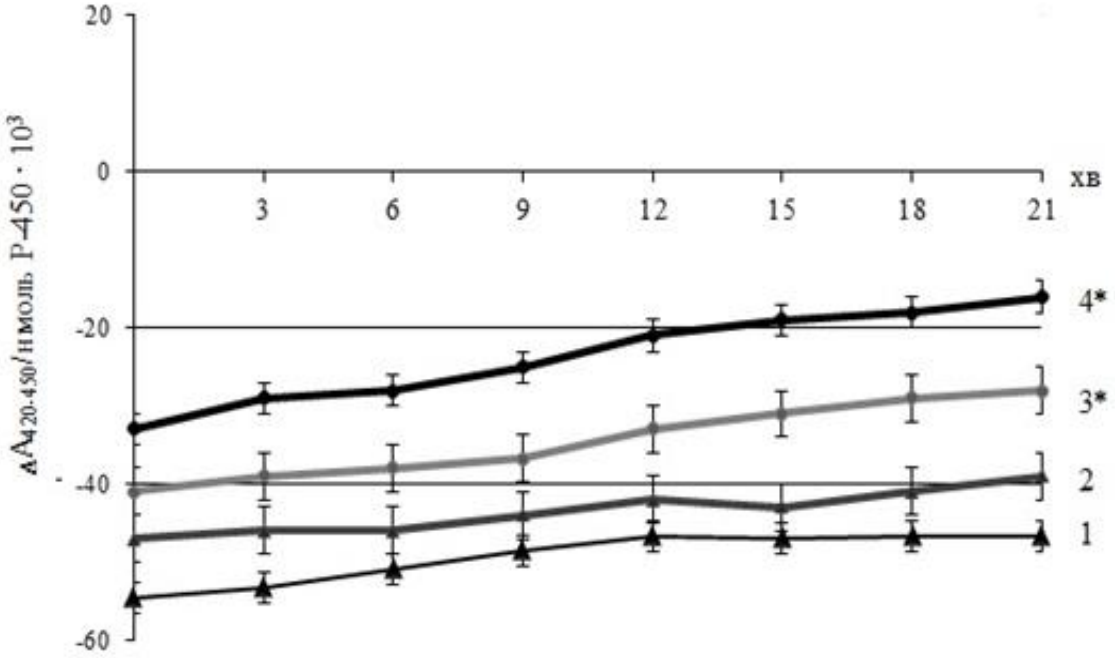

Рис. 2. Швидкість інактивації цитохрому Р450 у мікросомній фракції печінки щурів за умов введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти

Fig. 2. The rate of cytochrome P450 inactivation in the microsomal fraction of rat liver under the administration of sodium benzoate and ascorbic acid

*Примітка (тут і на рис. 4): 1 – інтактні тварини (контроль); 2 – щури, яким вводили аскорбінову кислоту; 3 – щурі, яким вводили бензоат натрію; 4 – щури, яким вводили бензоат натрію за 30 хв до введення аскорбінової кислоти; * – статистично достовірна різниця порівняно з показником інтактних тварин (p≤0,05).*

Note (here and in fig. 4): 1 – intact animals (control); 2 – rats, which were administration of ascorbic acid; 3 – rats, which were administration of sodium benzoate; 4 – rats, which were administration of sodium benzoate 30 min before the introduction of ascorbic acid; – statistically significant difference compared to intact animals (p≤0,05).*

Процеми гідроксилювання ксенобіотиків цитохромом Р450 значною мірою залежать від нормального функціонувчання інших компонентів МОС, зокрема цитохрому b_5. Цей гемопротеїн є транспортером електронів від донора електронів – відновленого NADH, на цитохром Р450 під час проходження монооксигеназного циклу (Kim et al., 2022). Тому, від стану кінцевого компонента редуктазного ланцюга МОС може залежати робота МОС в цілому.

Результати проведених досліджень показали зниження рівня цитохрому b_5 у 1,4 рази у мікросомній фракції печінки щурів, яким перорально вводили бензоат натрію порівняно з показниками інтактних тварин (рис.3). Подібні зміни спостерігалися і в групі щурів, яким за 30 хв до введення бензоату натрію вводили аскорбінову кислоту. Так, у цієї групи тварин вміст цитохрому b_5 у мікросомній фракції печінки знижувався у 1,8 рази порівняно з показниками контрольної групи тварин (рис.3). Як показують результати дослідження комбіноване введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти проявляє вираженішу деструктивну дію на компоненти МОС. Оскільки в нормі залізо цитохрому b_5 утворює комплекс із залізом цитохрому Р450 у відновленій системі, викликаючи зміну конфігурації цитохрому Р450, то зниження рівня цитохрому b_5 може порушити функціонування усієї МОС (Kim et al., 2022). Так, цитохром b_5 може бути облігатним компонентом або може діяти як модифікатор реакції, яка буде стимулюючою або інгібуючою, залежно як від субстрату, так і від ізоформи цитохрому Р450 (Kim et al., 2021). Окрім того, зниження рівня цитохрому b_5 може відобразитися і на інших функціях клітини, оскільки це гемопротеїн бере участь як компонент переносу електронів у ряді окисних реакцій у біологічних тканинах. До них відносяться анаболічний метаболізм жирів і стероїдів, а також катаболізм ксенобіотиків і сполук ендогенного метаболізму (Gutiérrez-Merino et al., 2021).

Токсичність поєднаного впливу бензоату натрію й аскорбінової кислоти, ймовірно, зумовлена їхньою взаємодією в організмі, з утворенням, на першому етапі, бензойної кислоти,

а потім бензолу (Kehinde et al., 2017). Ці проміжні та кінцеві продукти метаболізму ксенобіотика за досліджуваних умов можуть запускати вільнорадикальні процеси в органелах клітин (Piper et al., 2017). Так, за дії мембранних генераторів АФК у клітинах утворюватимуться супероксидний ($O_2^{\cdot-}$) та гідроксильний ($^{\cdot}OH$) радикали, які сприятимуть процесам ПОЛ мебран ЕР (McCann et al., 2015). Ці процеси будуть деструктивно впливати на функціонування компонентів МОС. Мононведення тваринам аскорбінової кислоти у фізіологічній дозі не призводило до змін рівня цитохрому b_5 у мікросомній фракції печінки щурів, що і підтверджує факт негативнішого впливу саме поєднаного застосування ксенобіотика й аскорбінової кислоти (рис.3).

Поряд із зниженням рівня цитохрому b_5 у мікросомній фракції печінки шурів, яким вводили бензоат натрію спостерігалося підвищення швидкості його відновлення-окиснення (рис.4). Оскільки мікросомний цитохром b_5 печінки є динамічним протеїном, то, імовірно, він реагує на внутрішні та зовнішні регуляторні сигнали за дії бензоату натрію. Виявлені зміни можуть вказувати на інтенсифікацію передачі електронів на молекулярний кисень, що сприятиме генерації супероксидного радикала редуктазним ланцюгом МОС (Samhan-Arias et al., 2018).

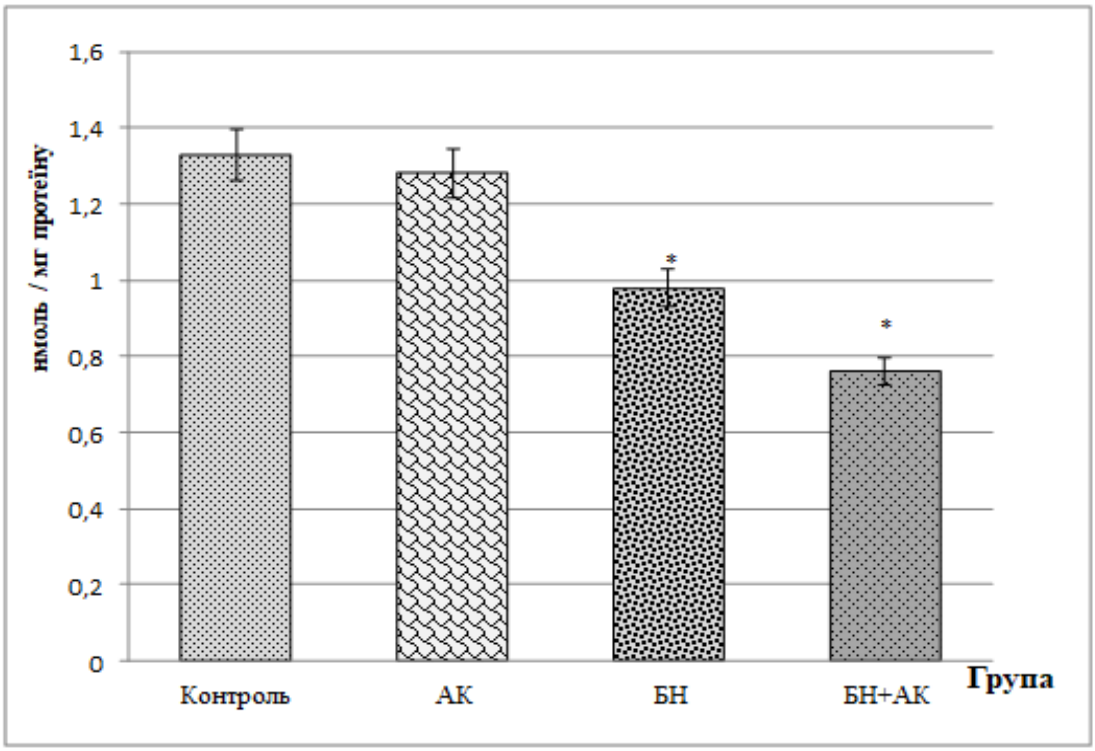

Рис. 3. Вміст цитохрому b_5 у мікросомній фракції печінки щурів за умов введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти

Fig. 3. The content of cytochrome b_5 products in the microsomal fraction of rat liver under the administration of sodium benzoate and ascorbic acid

Суттєвіше підвищення швидкості відновлення-окиснення цитохрому b_5 спостерігалося у групі щурів, яким вводили комплекс бензоату натрію й аскорбінової кислоти (рис.4).

Підвищення швидкості відновлення-окиснення цитохрому b_5 (рис.4) та одночасне зниження вмісту цього гемопротеїну (рис.3) може мати істотний вплив на каталітичну активність цитохрому Р450. Це пов'язано з тим, що цитохром b_5 проявляє наступні механізми впливу на цитохром Р450: 1) переносить другий електрон на цитохром Р450; 2) функціонує як алостеричний ефектор; і 3) функціонує як конкурентний інгібітор цитохром Р450-оксидоредуктази (Samhan-Arias et al., 2018).

Введення лише аскорбінової кислоти не призводило до зміни швидкості відновлення-окиснення цитохрому b_5 у мікросомній фракції печінки щурів, оскільки досліджуваний показник не відрізнявся від показника інтактних тварин (рис.4).

Отже, за умов комплексного введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти в мікросомній фракції спостерігаються деструктивні зміни компонентів МОС.

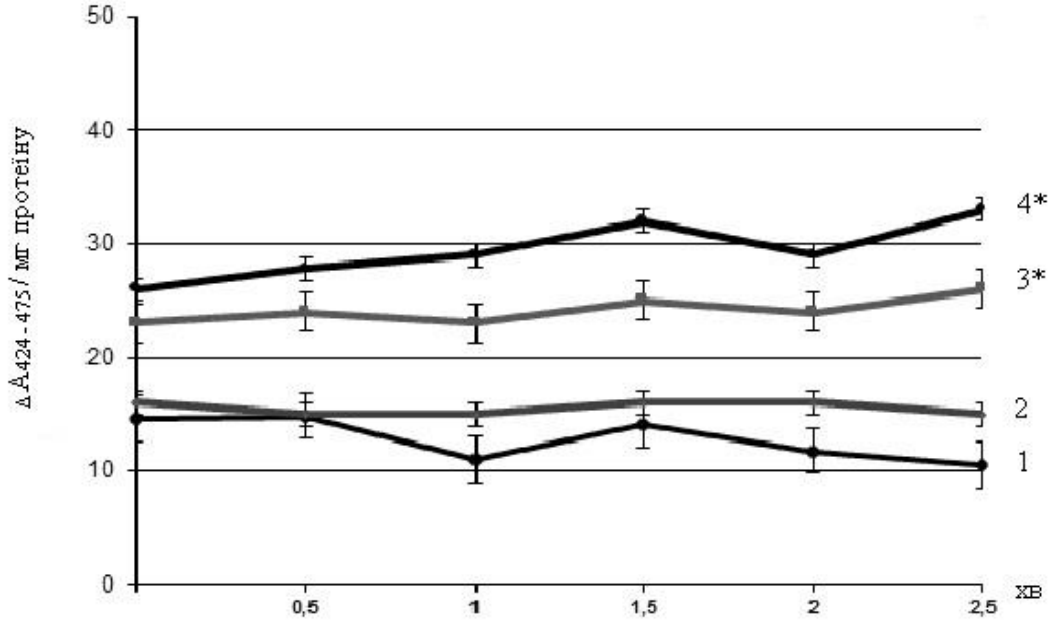

Рис.4. Швидкість відновлення-окиснення цитохрому b_5 у мікросомній фракції печінки щурів за умов введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти

Fig.4. Rate of reduction-oxidation of cytochrome b_5 in the microsomal fraction of rat liver under the administration of sodium benzoate and ascorbic acid

Висновок. Введення бензоату натрію призводить до підвищення швидкості переходу цитохрому Р450 у його неактивну форму Р420, у результаті чого знижується вміст цитохрому Р450 у мікросомній фракції печінки щурів. Поряд з цим знижується рівень цитохрому b_5 у мікросомній фракції печінки шурів, проте підвищується швидкість його відновлення-окиснення. За умов комплексного введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти деструктивні зміни компонентів МОС значно поглиблюються, що може супроводжуватися зниженням детоксикаційної функції печінки.

Список літератури:

1. Dar S.A., Chatterjee A., Rather M.A., Chetia D., Srivastava P.P., Gupta S. Identification, functional characterization and expression profiling of cytochrome p450 1A (CYP1A) gene in Labeo rohita against emamectin benzoate. *Int J Biol Macromol*. 2020:S0141-8130(20)33081-6. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.215.
2. Edition E. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington: the national academies press, 2011. 246 p.
3. Fu L., Zhou L., Geng S., Li M., Lu W., Lu Y., Feng Z., Zhou X. Catalpol coordinately regulates phase I and II detoxification enzymes of Triptolide through CAR and NRF2 pathways to reduce Triptolide-induced hepatotoxicity. *Biomed Pharmacother*. 2020;129:110379. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110379.
4. Gál R., Halmosi R. The role of oxidative stress in heart failure. *Orv Hetil.* 2015;156(47):1916-20. https://doi.org/10.1556/650.2015.30301.
5. Gutiérrez-Merino C., Martínez-Costa O.H., Monsalve M., Samhan-Arias A.K. Structural features of cytochrome b5-cytochrome b5 reductase complex formation and implications for the intramolecular dynamics of cytochrome b5 reductase. *Int J Mol Sci*. 2021;23(1):118. https://doi.org/10.3390/ijms23010118.
6. Harjumäki R., Pridgeon C.S., Ingelman-Sundberg M. CYP2E1 in alcoholic and non-alcoholic liver injury. roles of ROS, reactive intermediates and lipid overload. *Int J Mol Sci*. 2021;22(15):8221. https://doi.org/10.3390/ijms22158221.
7. Kehinde O.S., Christianah O.I., Oyetunji O.A. Ascorbic acid and sodium benzoate synergistically aggravates testicular dysfunction in adult Wistar rats. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2018;10(1):39-46.
8. Kim D, Kim V, Tateishi Y, Guengerich FP.Cytochrome b_5 Binds tightly to several human cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos.* 2021;49(10):902-909. https://doi.org/10.1124/dmd.121.000475.
9. Kim D., Kim V., McCarty K.D., Guengerich F.P. Tight binding of cytochrome b5 to cytochrome P450 17A1 is a critical feature of stimulation of C21 steroid lyase activity and androgen synthesis. *J Biol Chem*. 2021;296:100571. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100571.
10. Lidén C., Andersson N., White I.R. Preservatives in non-cosmetic products: Increasing human exposure requires action for protection of health. *Contact Dermatitis*. 2022;87(5):389-405. https://doi.org/10.1111/cod.14181.
11. Manna S.K., Mazumdar S. Reversible inactivation of cytochrome P450 by alkaline earth metal ions: auxiliary metal ion induced conformation change and formation of inactive P420 species in CYP101. *J Inorg Biochem*. 2008;102(5-6):1312-21. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008. 01.013.
12. McCann S.D., Stahl S.S. Copper-catalyzed aerobic oxidations of organic molecules: pathways for two-electron oxidation with a four-electron oxidant and a one-electron redox-active catalyst. *Acc Chem Res.*

2015;48(6):1756-66. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00060.
13. Nogacka A.M., Gómez-Martín M., Suárez A., González-Bernardo O., de Los Reyes-Gavilán C.G., González S. Xenobiotics formed during food processing: their relation with the intestinal microbiota and colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2019;20(8):2051. https://doi.org/10.3390/ijms20082051.
14. Piper J.D., Piper P.W. 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. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2017;16(5):868-80. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12284.
15. Sahoo B.R., Ramamoorthy A. Direct interaction between the transmembrane helices stabilize cytochrome P450 2B4 and cytochrome b5 redox complex. *Biophys Chem*. 2023;301:107092. https://doi.org/10.1016/j.bpc.2023.107092.
16. Samhan-Arias A.K., Almeida R.M., Ramos S., Cordas C.M., Moura I., Gutierrez-Merino C., Moura J.J.G. Topography of human cytochrome b5/cytochrome b5 reductase interacting domain and redox alterations upon complex formation. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2018;1859(2):78-87. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2017.10.005.
17. Schenkman J.B., Cinti D.L. Preparation of microsomes with calcium. Methods in Enzymology. 1978;52, part c:83-89.
18. Seetharam J.C., Maiti R., Mishra A., Mishra B.R. Efficacy and safety of add-on sodium benzoate, a D-amino acid oxidase inhibitor, in treatment of schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *Asian J Psychiatr*. 2022;68:102947. https://doi.org/10.1016/j.ajp.2021.102947.
19. Shymanskyi I.O., Ketsa O.V., Marchenko M.M., Veliky M.M. Liver cytochrome P450-hydroxylation system of tumor-bearing rats under the influence of ω-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin D3. Ukr. Biochem. J. 2018;90(4):36-44. doi: https://doi.org/10.15407/ubj90.04.036.
20. Stroppel L., Schultz-Fademrecht T., Cebulla M., Blech M., Marhöfer R.J., Selzer P.M., Garidel P. Antimicrobial preservatives for protein and peptide formulations: an overview. Pharmaceutics. 2023;15(2):563. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020563.
21. Tonelli C., Chio I.I.C., Tuveson D.A. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal*. 2018;29(17):1727-1745. https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342.
22. Walczak-Nowicka Ł.J., Herbet M. Sodium benzoate-harmfulness and potential use in therapies for disorders related to the nervous system: a review. *Nutrients*. 2022;14(7):1497. https://doi.org/10.3390/nu14071497.
23. Walczak-Nowicka Ł.J., Herbet M. Sodium benzoate-harmfulness and potential use in therapies for disorders related to the nervous system. *Nutrients*. 2022;14(7):1497. https://doi.org/10.3390/nu14071497.
24. Witkowski M., Grajeta H., Gomułka K. Hypersensitivity reactions to food additives-preservatives, antioxidants, flavor enhancers. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(18):11493. https://doi.org/10.3390/ijerph191811493.
25. Zhao M., Ma J., Li M., Zhang Y., Jiang B., Zhao X., Huai C., Shen L., Zhang N., He L., Qin S. Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism in humans. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23):12808. https://doi.org/10.3390/ijms222312808.
26. Zou Y., Li H., Graham E.T., Deik A.A., Eaton J.K., Wang W., Sandoval-Gomez G., Clish C.B., Doench J.G., Schreiber S.L. Cytochrome P450 oxidoreductase contributes to phospholipid peroxidation in ferroptosis. *Nat Chem Biol*. 2020;16(3):302-309. https://doi.org/10.1038/s41589-020-0472-6.

References:

1. Dar S.A., Chatterjee A., Rather M.A., Chetia D., Srivastava P.P., Gupta S. Identification, functional characterization and expression profiling of cytochrome p450 1A (CYP1A) gene in Labeo rohita against emamectin benzoate. *Int J Biol Macromol*. 2020:S0141-8130(20)33081-6. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.215.
2. Edition E. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington: the national academies press, 2011. 246 p.
3. Fu L., Zhou L., Geng S., Li M., Lu W., Lu Y., Feng Z., Zhou X. Catalpol coordinately regulates phase I and II detoxification enzymes of Triptolide through CAR and NRF2 pathways to reduce Triptolide-induced hepatotoxicity. *Biomed Pharmacother*. 2020;129:110379. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110379.
4. Gál R., Halmosi R. The role of oxidative stress in heart failure. *Orv Hetil*. 2015;156(47):1916-20. https://doi.org/10.1556/650.2015.30301.
5. Gutiérrez-Merino C., Martínez-Costa O.H., Monsalve M., Samhan-Arias A.K. Structural features of cytochrome b5-cytochrome b5 reductase complex formation and implications for the intramolecular dynamics of cytochrome b5 reductase. *Int J Mol Sci*. 2021;23(1):118. https://doi.org/10.3390/ijms23010118.
6. Harjumäki R., Pridgeon C.S., Ingelman-Sundberg M. CYP2E1 in alcoholic and non-alcoholic liver injury. roles of ROS, reactive intermediates and lipid overload. *Int J Mol Sci*. 2021;22(15):8221. https://doi.org/10.3390/ijms22158221.
7. Kehinde O.S., Christianah O.I., Oyetunji O.A. Ascorbic acid and sodium benzoate synergistically aggravates testicular dysfunction in adult Wistar rats. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2018;10(1):39-46.
8. Kim D, Kim V, Tateishi Y, Guengerich FP.Cytochrome b_5 Binds tightly to several human cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos*. 2021;49(10):902-909. https://doi.org/10.1124/dmd.121.000475.
9. Kim D., Kim V., McCarty K.D., Guengerich F.P. Tight binding of cytochrome b5 to cytochrome P450 17A1 is a critical feature of stimulation of C21 steroid lyase activity and androgen synthesis. *J Biol Chem*. 2021;296:100571. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100571.
10. Lidén C., Andersson N., White I.R. Preservatives in non-cosmetic products: Increasing human exposure requires action for protection of health. *Contact Dermatitis*. 2022;87(5):389-405. https://doi.org/10.1111/cod.14181.
11. Manna S.K., Mazumdar S. Reversible inactivation of cytochrome P450 by alkaline earth metal ions: auxiliary

metal ion induced conformation change and formation of inactive P420 species in CYP101. *J Inorg Biochem*. 2008;102(5-6):1312-21. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio. 2008.01.013.
12. McCann S.D., Stahl S.S. Copper-catalyzed aerobic oxidations of organic molecules: pathways for two-electron oxidation with a four-electron oxidant and a one-electron redox-active catalyst. *Acc Chem Res*. 2015;48(6):1756-66. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00060.
13. Nogacka A.M., Gómez-Martín M., Suárez A., González-Bernardo O., de Los Reyes-Gavilán C.G., González S. Xenobiotics formed during food processing: their relation with the intestinal microbiota and colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2019;20(8):2051. https://doi.org/10.3390/ijms20082051.
14. Piper J.D., Piper P.W. 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. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2017;16(5):868-80. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12284.
15. Sahoo B.R., Ramamoorthy A. Direct interaction between the transmembrane helices stabilize cytochrome P450 2B4 and cytochrome b5 redox complex. *Biophys Chem*. 2023;301:107092. https://doi.org/10.1016/j.bpc.2023.107092.
16. Samhan-Arias A.K., Almeida R.M., Ramos S., Cordas C.M., Moura I., Gutierrez-Merino C., Moura J.J.G. Topography of human cytochrome b5/cytochrome b5 reductase interacting domain and redox alterations upon complex formation. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2018;1859(2):78-87. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2017.10.005.
17. Schenkman J.B., Cinti D.L. Preparation of microsomes with calcium. Methods in Enzymology. 1978;52, part c:83-89.
18. Seetharam J.C., Maiti R., Mishra A., Mishra B.R. Efficacy and safety of add-on sodium benzoate, a D-amino acid oxidase inhibitor, in treatment of schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *Asian J Psychiatr*. 2022;68:102947. https://doi.org/10.1016/j.ajp.2021.102947.
19. Shymanskyi I.O., Ketsa O.V., Marchenko M.M., Veliky M.M. Liver cytochrome P450-hydroxylation system of tumor-bearing rats under the influence of ω-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin D3. *Ukr. Biochem. J.* 2018;90(4):36-44. https://doi.org/https://doi.org/10.15407/ubj90.04.036.
20. Stroppel L., Schultz-Fademrecht T., Cebulla M., Blech M., Marhöfer R.J., Selzer P.M., Garidel P. Antimicrobial preservatives for protein and peptide formulations: an overview. *Pharmaceutics*. 2023;15(2):563. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020563.
21. Tonelli C., Chio I.I.C., Tuveson D.A. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal*. 2018;29(17):1727-1745. doi: 10.1089/ars.2017.7342.
22. Walczak-Nowicka Ł.J., Herbet M. Sodium benzoate-harmfulness and potential use in therapies for disorders related to the nervous system: a review. *Nutrients*. 2022;14(7):1497. doi: 10.3390/nu14071497.
23. Walczak-Nowicka Ł.J., Herbet M. Sodium benzoate-harmfulness and potential use in therapies for disorders related to the nervous system. *Nutrients*. 2022;14(7):1497. https://doi.org/10.3390/nu14071497.
24. Witkowski M., Grajeta H., Gomułka K. Hypersensitivity reactions to food additives-preservatives, antioxidants, flavor enhancers. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(18):11493. https://doi.org/10.3390/ijerph191811493.
25. Zhao M., Ma J., Li M., Zhang Y., Jiang B., Zhao X., Huai C., Shen L., Zhang N., He L., Qin S. Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism in humans. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23):12808. https://doi.org/10.3390/ijms222312808.
26. Zou Y., Li H., Graham E.T., Deik A.A., Eaton J.K., Wang W., Sandoval-Gomez G., Clish C.B., Doench J.G., Schreiber S.L. Cytochrome P450 oxidoreductase contributes to phospholipid peroxidation in ferroptosis. *Nat Chem Biol*. 2020;16(3):302-309. https://doi.org/10.1038/s41589-020-0472-6.

STATE OF THE XENOBIOTICS BIOTRANSFORMATION SYSTEM IN THE LIVER MICROSOMAL FRACTION OF RATS UNDER THE EFFECTS OF SODIUM BENZOATE AND ASCORBIC ACID

O. V. Ketsa, M. M. Marchenko

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University,
Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsiubynsky 2 Str.
e-mail: o.ketsa@chnu.edu.ua

The combined effect of food preservatives – sodium benzoate and ascorbic acid on the state of monooxygenase system (MOS) components in the microsomal fraction of rat liver cells are studied in the paper. Changes in the level of cytochrome P450 and cytochrome b_5, as well as the rate of reduction-oxidation of these hemoproteins in the microsomal fraction of the rat liver under conditions of administration of sodium benzoate and ascorbic acid were studied.

During the experiment, rats were divided into four groups: group I – control (intact animals); group II – rats that were injected with ascorbic acid at a dose of 30 mg per kg of animal weight; group III – rats that were injected with sodium benzoate at a dose of 750 mg per kg of animal weight; group IV – rats that were injected with sodium benzoate 30 minutes before the introduction of ascorbic acid. Sodium benzoate and ascorbic acid were administered per os daily for 21 days. Animals were euthanized under light ether anesthesia on the 21st day after the start of administration of sodium benzoate and

ascorbic acid.

It was established that the three-week introduction of sodium benzoate into the body of animals leads to a decrease in the level of cytochrome P450, which occurs due to an increase in the rate of transition of cytochrome P450 into its inactive form P420. It was shown that along with the decrease in cytochrome P450 in the microsomal fraction of the liver, the level of cytochrome b5 decreases with a simultaneous increase in the rate of reduction and oxidation of this hemoprotein. Sodium benzoate exhibits a higher destructive effect when it is combined with ascorbic acid, which is expressed by a decrease in the level of MOS hemoproteins and may be a consequence of dangerous metabolites formation in the body - benzoic acid and benzene.

Keywords: cytochrome P450; cytochrome b5; microsomal fraction; liver; sodium benzoate; ascorbic acid.

Отримано редколегією 05.10.2023 р.