

Біохімічні маркери функціонального стану гепатобіліарної системи у сироватці крові щурів за умов впливу бензоату натрію й аскорбінової кислоти

О. В. Кеца, С. С. Макаруч, М. М. Марченко

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича; e-mail: o.ketsa@chnu.edu.ua

Одними з найпоширеніших хімічних сполук з антимікробними властивостями, які часто використовують у харчовій промисловості є консерванти, серед яких чільне місце займає бензоат натрію. Використання цього ксенобіотика в комплексі з іншими харчовими добавками, зокрема з аскорбіновою кислотою, сприятиме їх взаємодії в організмі з утворенням токсичних речовин. Досліджували вплив бензоату натрію (750 мг/кг) й аскорбінової кислоти (30 мг/кг) на функціональний стан печінки щурів. Харчові добавки вводили per os протягом 21 доби. Функціональний стан гепатобіліарної системи оцінювали за enzymними активностями аланінамінотрансферази (АЛТ), аспаратамінотрансферази (АСТ), γ -глутамілтрансферази (ГГТ), концентрацією загального і прямого білірубину, за показником тимолової проби. Показано, що введення в організм бензоату натрію призводило до підвищення enzymних активностей АЛТ, АСТ, ГГТ у сироватці крові, що свідчить про гепатотоксичний вплив досліджуваного ксенобіотика. Водночас знижувалася білоксинтезуюча функція печінки, про що говорить підвищення показника тимолової проби. Комбіноване введення бензоату натрію і аскорбінової кислоти спричинює більш виражену гіперферментемію АЛТ, АСТ і ГГТ у сироватці крові та підвищення вмісту загального та прямого білірубину. Таким чином, введення бензоату натрію разом з аскорбіновою кислотою посилює деструктивний вплив бензоату натрію на органи гепатобіліарної системи.

Ключові слова: печінка; аланінамінотрансфераза; аспаратамінотрансфераза; γ -глутамілтрансфераза; білірубін; бензоат натрію; аскорбінова кислота.

ВСТУП

Однією з найпоширеніших хімічних речовин з антимікробними властивостями, яку часто використовують у харчовій промисловості, є бензоат натрію [1]. Це сіль бензойної кислоти, котру застосовують як консервант не лише у харчових продуктах, але й під час виробництва ліків, косметичних сумішей та шампуней [2]. Відповідно до офіційної публікації Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) [3] застосування бензоату натрію в харчовій промисловості обмежено до 0,1%, а допустима добова норма цього консерванта становить 5 мг/кг на добу. Проте він використовується у вищих концентраціях в багатьох харчових продуктах [4].

© О. В. Кеца, С. С. Макаруч, М. М. Марченко

Показано, що бензойна кислота нетоксична у своїй органічній формі, проте синтетична її форма в хронічній дозі отруйна для живих організмів. Небезпечним вважається взаємодія бензоату натрію з іншими речовинами, що містяться в продуктах харчування, зокрема з аскорбіновою кислотою [5]. Під час їх взаємодії може утворюватися відомий канцероген – бензол [3]. Його утворення також прискорюють тепло, світло та термін зберігання продуктів, що викликає в організмі анемію, важке пригнічення імунної системи, передракові захворювання крові, лейкемію та порушення репродуктивної функції [6]. Бензоат натрію знижує в плазмі крові вміст тестостерону, гонадотропінів, гормонів щитоподібної залози [7]. Окрім

того, нещодавно було показано, що одночасне введення в організм бензоату натрію й аскорбінової кислоти призводить до зміни структури мозочка [8].

В організмі метаболізм бензоату натрію відбувається переважно в клітинах печінки, проте механізми його впливу в хронічній дозі з аскорбіновою кислотою на функціональний стан гепатобіліарної системи залишаються не дослідженими. Будь-які зміни в печінці можуть призвести до її дисфункції і, як наслідок, до порушення біотрансформації ксенобіотиків, в тому числі лікарських препаратів. Дисбаланс у роботі детоксикуючої системи печінки спричинить інтоксикацію організму [5]. Розуміння напряду метаболічних змін у печінці, за умов введення консервантів, допоможе попередити не лише захворювання органів гепатобіліарної системи, але й знизить токсичність лікарських препаратів, які застосовують під час лікування різних патологій.

Мета нашої роботи – оцінити функціональний стан гепатобіліарної системи у тварин за умов поєднаного введення в організм бензоату натрію й аскорбінової кислоти.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на 48 білих безпородних щурах масою 130–150 г, які перебували на стандартному раціоні віварію, збалансованому за всіма необхідними мікро- та мікроелементами, з необмеженим доступом до води. Утримання щурів та всі маніпуляції з ними проводили відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), та згідно з положеннями «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухваленими Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Тварин поділили на 4 групи по 12 у кожній: I – інтактні тварини (контроль); II – щури, яким вводили аскорбінову кислоту; III –

щури, яким вводили бензоат натрію; IV – щури, яким вводили бензоат натрію за 30 хв до введення аскорбінової кислоти. Бензоат натрію й аскорбінову кислоту вводили щоденно *per os* протягом 21 доби у дозі 750 і 30 мг/кг відповідно.

Евтаназію тварин проводили під ефірним наркозом на 21-шу добу після початку застосування харчових добавок. Забір крові здійснювали у скляні центрифужні пробірки з сонної артерії щурів. Для виділення сироватки крові проби піддавали центрифугуванню при 1500 об/хв протягом 10 хв. У виділеній сироватці крові визначали маркери функціонального стану гепатобіліарної системи – ензимні активності аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), γ -глутамілтрансферази (ГГТ), вміст загального і прямого білірубину, тимолову пробу на автоматичному біохімічному аналізаторі HTI BioChem FC-120 (США). Про активність АЛТ та АСТ судили за кількістю утвореного пірувату, визначення якого ґрунтується на вимірюванні оптичної щільності динітрофенілгідрозонів пірувату, які в лужному середовищі забарвлюються в коричнево-червоний колір [9]. Активність ГГТ визначали за швидкістю утворення 3-карбокси-4-нітроаніліну та виражали в одиницях на 1 л [10].

Визначення вмісту загального білірубину оснований на його здатності окиснюватися в кислому розчині за наявності ванадату та детергента. При цьому утворюється продукт жовтого кольору, вміст якого пропорційний кількості загального білірубину. Вміст прямого білірубину визначали з використанням діазореактиву з утворенням забарвленого розчину азобілірубину [11]. Стан білоксинтезуючої функції печінки досліджували за визначенням тимолової проби, яку оцінювали за мутністю зразка із застосуванням фотометричного способу і стандартизацією результатів за шкалою мутності Shank-Noagland. Показник виражали в одиницях помутніння за Shank-Noagland (од. S-H) [12].

Результати розраховували методом варіаційної статистики з використанням критерію t Стюдента. Різницю між групами вважали достовірною при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати проведених досліджень показали, що тритижневе введення бензоату натрію у дозі 750 мг/кг маси призводило до підвищення активностей досліджуваних амінотрансфераз у сироватці крові. Так, активність АЛТ у 1,9 раза перевищувала значення контрольної групи тварин ($P \leq 0,05$; рис. 1, а), що є прямим наслідком вивільнення цього ензиму з клітин печінки. Потім ензим переміщується до внутрішньодолькових просторів і далі в кров [13]. Потрапляння АЛТ у сироватку крові може бути наслідком загибелі гепатоцитів. Оскільки ензим локалізується в мітохондріях, то гіперферментемія також може вказувати на пошкодження мітохондрій з або без подальшої загибелі гепатоцитів [14]. Активність АСТ підвищувалась у 1,3 раза порівняно з контролем ($P \leq 0,05$; див. рис. 1, б). Надходження АСТ у кров може бути результатом двох окремих процесів – пасивне

вивільнення через загибель клітин печінки та через порушення плазмолемі гепатоцитів.

Отже, виявлена гіперферментемія трансаміназ вказує на пошкодження клітин печінки, а свідчення цитолізу – надходження ензимів у кров, що супроводжується збільшенням їх активності [15]. Дисфункція печінки, ймовірно, викликана утвореними продуктами метаболізму бензоату натрію, оскільки він біотрансформується в організмі до продуктів, які здатні викликати пошкодження мітохондріальної ДНК [6].

Більш деструктивні процеси в печінці спостерігалися за умов комплексного введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти: посилювалася гіперферментемія амінотрансфераз після тритижневого введення комплексу цих консервантів (див. рис. 1). Так, активність АЛТ у сироватці крові перевищувала значення інтактних тварин у 4,2 раза, а АСТ – у 2,3 раза.

Імовірно, токсичність комбінованого впливу бензоату натрію й аскорбінової кислоти зумовлена їхньою взаємодією в організмі, у результаті чого утворюється канцерогенна речовина – бензол, який негативно впливає на печінку [16]. При цьому аскорбінова кислота

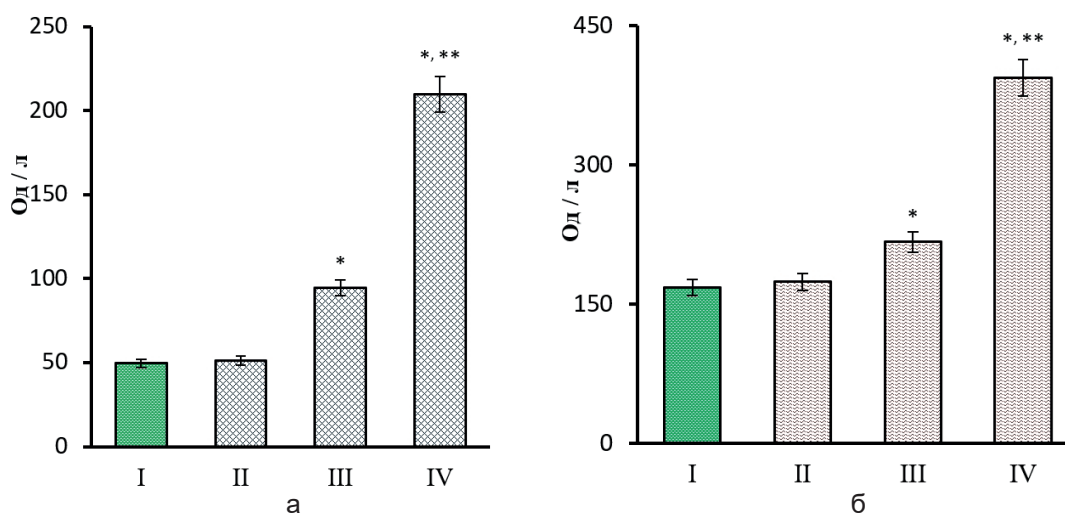


Рис. 1. Аланінамінотрансферазна (а) й аспартатамінотрансферазна (б) активності у сироватці крові щурів за умов введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти: I – контроль; II – аскорбінова кислота; III – бензоат натрію; IV – бензоат натрію та аскорбінова кислота; * $P \leq 0,05$ порівняно з контролем; ** $P \leq 0,05$ порівняно зі значеннями у щурів, яким вводили бензоат натрію

втрачає свої антиоксидантні властивості. У печінці при дії комбінації цих консервантів можуть виникати запальні процеси внаслідок значного збільшення вмісту маркерів прозапальних цитокінів [17]. Отже, за умов комплексного введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти посилюється шкідливий вплив ксенобіотичної сполуки на печінку.

Оскільки до гепатобіліарної системи входить і жовчний міхур, то порушення роботи печінки може вплинути на функціональний стан його роботи. Маркерами пошкодження жовчного міхура є концентрація фракцій білірубину в сироватці крові, яку можна також використовувати при скринінгу стану печінки [18].

Результати нашого дослідження показали, що за умов введення в організм бензоату натрію у сироватці крові щурів у 2,2 раза підвищувався вміст загального білірубину порівняно з контролем ($P \leq 0,05$; рис. 2, а). Водночас підвищився у 1,4 раза вміст прямого білірубину ($P \leq 0,05$; див. рис. 2, б). Підвищення концентрацій загального і прямого білірубину вказує на порушення функцій органів гепатобіліарної системи. Встановлені зміни можуть відбуватися в результаті розвитку внутрішньопечінкового

холестазу, а також при зниженні печінкового кліренсу білірубину. Вільний білірубін відноситься до токсичних ліпофільних речовин, тому може проникати через мембрани органел і порушувати метаболічні процеси в клітинах [18].

За умов комплексного введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти виявлено суттєвіше підвищення вмісту загального (у 3,7 раза) і прямого (у 2,4 раза) білірубину порівняно зі значеннями інтактних тварин ($P \leq 0,05$; див. рис. 2). Як видно з результатів, вміст загального білірубину підвищувався більшою мірою, ніж прямого білірубину. Це вказує на те, що загальний білірубін підвищується за рахунок фракції саме непрямого білірубину [19] і може свідчити про пригнічення процесів глюкуронування у печінці при дії бензоату натрію й аскорбінової кислоти, а підвищення концентрації прямого білірубину – про порушення відтоку жовчі у жовчовивідних шляхах.

Отже, при введенні бензоату натрію та сумісної його дії з аскорбіновою кислотою в печінці змінюється метаболізм білірубину, а гіпербілірубінемія розвивається внаслідок підвищення обох фракцій. Концентрація вільного білірубину в крові, ймовірно, зростає у

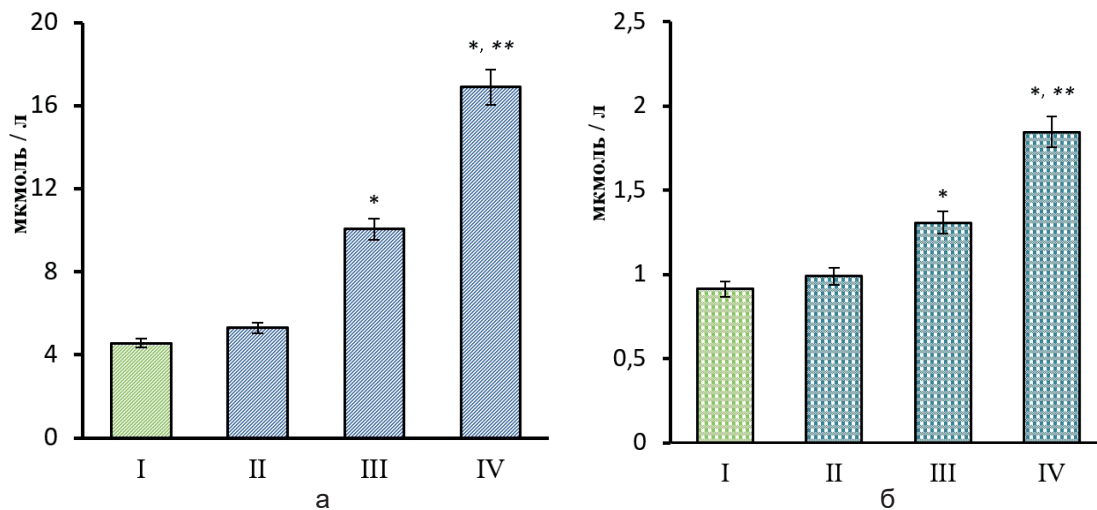


Рис. 2. Вміст загального (а) та прямого (б) білірубину в сироватці крові щурів за умов введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти: I – контроль; II – аскорбінова кислота; III – бензоат натрію; IV – бензоат натрію та аскорбінова кислота; * $P \leq 0,05$ порівняно з контролем; ** $P \leq 0,05$ порівняно зі значеннями у щурів, яким вводили бензоат натрію

зв'язку з функціональною недостатністю гепатоцитів і/або зниженням їх кількості. Водночас вміст зв'язаного білірубину підвищується внаслідок збільшення проникності мембран клітин печінки і/або через порушення секреції з жовчю. Все це вказує на ураження паренхіми печінки [18].

Зміни слизової оболонки міхура можуть провокуватися або через порушення функціонування печінки, або через прямий вплив ксенобіотика. У результаті цього відбувається активація імунокомпетентних клітин та синтез ними медіаторів запалення [19]. Туморнекротичний фактор α у свою чергу активує хемотаксис лейкоцитів, моноцитів, посилює їх міграцію у стінку жовчного міхура, що призводить до запалення, набряку та десквамації слизової епітелію. При цьому поступово атрофуються і склерозуються оболонки міхура, порушується його адсорбційно-секреторна та моторна функції [20].

Іншим маркером стану гепатобіліарної системи є гіперферментемія ГГТ. Нами виявлено підвищення активності цього ензиму в сироватці крові як при введенні бензоату натрію (у 1,7 раза), так і під час їх сумісного впливу (у 2,8 раза) порівняно з інтактними тваринами ($P \leq 0,05$; рис. 3). Підвищення цього показника вказує

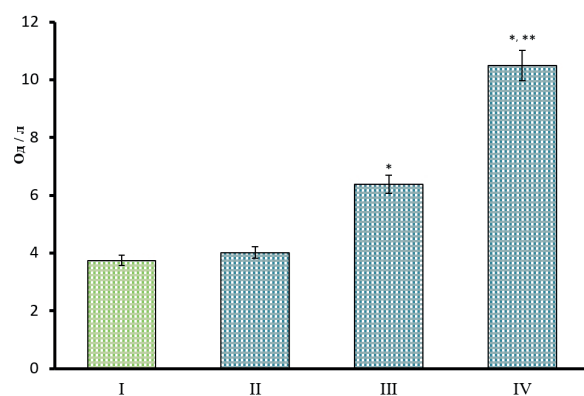


Рис. 3. Ензимна активність γ -глутамілтрансферази в сироватці крові щурів за умов введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти: I – контроль; II – аскорбінова кислота; III – бензоат натрію; IV – бензоат натрію та аскорбінова кислота; * $P \leq 0,05$ порівняно з контролем; ** $P \leq 0,05$ порівняно зі значеннями у щурів, яким вводили бензоат натрію

на пошкодження клітин печінки [14], оскільки ГГТ у великій кількості локалізована в плазмолемі її клітин. Як видно з результатів, більш виражену мембранодеструктивну дію бензоат натрію проявляє за умов одночасного введення в організм з аскорбіновою кислотою.

Виявлена нами гіперферментемія АЛТ, АСТ і ГГТ, а також підвищені концентрації фракцій білірубину в сироватці крові вказують на порушення функціонального стану органів гепатобіліарної системи, зокрема печінки [21]. Щоб перевірити це припущення, для оцінки білоксинтезуючої функції печінки визначено показник тимолової проби.

Слід відмітити, що хронічне введення високих концентрацій бензоату натрію призводило до підвищення показника тимолової проби у 2,4 раза порівняно з контролем ($P \leq 0,05$; рис. 4). Порушення білоксинтезуючої функції печінки щурів посилювалося за умов введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти, оскільки показник тимолової проби у 3,2 раза перевищував контрольне значення ($P \leq 0,05$). Імовірно, у разі поєднаного впливу бензоату натрію й аскорбінової кислоти утворювався продукт їхньої взаємодії – бензол, у результаті чого змінювався баланс синтезу протеїнів, при цьому в крові зменшувався вміст альбуміну. Це призводить

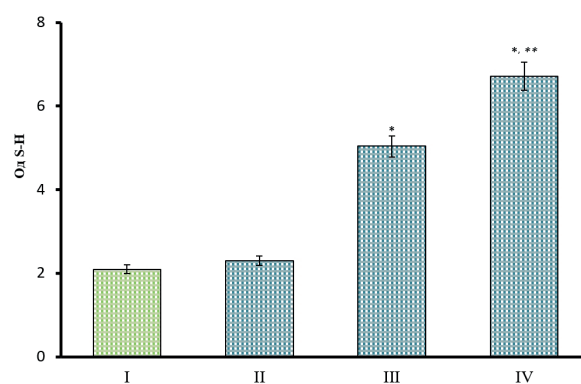


Рис. 4. Показник тимолової проби у крові щурів за умов введення бензоату натрію й аскорбінової кислоти: I – контроль; II – аскорбінова кислота; III – бензоат натрію; IV – бензоат натрію та аскорбінова кислота; * $P \leq 0,05$ порівняно з контролем; ** $P \leq 0,05$ порівняно зі значеннями у щурів, яким вводили бензоат натрію

до швидшого осадження інших фракцій, а саме β - і γ -глобулінів, при взаємодії з тимолом [14, 22].

Отже, тритижневе введення в організм високих доз бензоату натрію супроводжується дисфункцією органів гепатобіліарної системи щурів, про що свідчить вихід АЛТ, АСТ і ГГТ у кров'яне русло, підвищення вмісту різних фракцій білірубину в сироватці крові, порушення білоксинтезуючої функції печінки. Поєднане хронічне введення в організм бензоату натрію й аскорбінової кислоти посилює гепатотоксичність останнього, спричиняючи порушення функціонального стану органів гепатобіліарної системи, що супроводжується дисфункцією печінки.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

O. V. Ketsa, S.S. Makarchuk, M. M. Marchenko

BIOCHEMICAL MARKERS OF THE HEPATOBILIARY SYSTEM FUNCTIONAL STATE IN BLOOD SERUM OF RATS UNDER THE ACTION OF SODIUM BENZOATE AND ASCORBIC ACID

*Fedkovich Chernovtsy National University;
e-mail: o.ketsa@chnu.edu.ua*

One of the most common chemical compounds with antimicrobial properties, which are often used in the food industry, are preservatives, among which sodium benzoate occupies a prominent place. The use of this xenobiotic in combination with other food additives, in particular with ascorbic acid, will contribute to their interaction in the body with the formation of toxic substances. This makes it necessary to study the mechanisms of their action on tissues and organs, in particular, the the liver. The influence of sodium benzoate (750 mg/kg) and ascorbic acid (30 mg/kg) on liver functional state of rats were studied in the work. The introduction of food additives was administered per os during the 21 days. The functional state of the hepatobiliary system was evaluated by the enzyme activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), γ -glutamyltransferase (GGT), the levels of

total and direct bilirubin, and the thymol test indicator. It was shown that the three-week introduction of sodium benzoate into the body leads to an increase in the enzyme activities of ALT, AST, and GGT in the blood serum, which indicates the hepatotoxic effect of the studied xenobiotic. Along with this, the protein-synthetic function of the liver decreases, as evidenced by an increase in the thymol test. The combined administration of sodium benzoate with ascorbic acid leads to more pronounced hyperfermentemia of ALT, AST, and GGT in blood serum and an increase in the content of total and direct bilirubin. Thus, the introduction of sodium benzoate together with ascorbic acid increases the destructive effect of sodium benzoate on the organs of the hepatobiliary system.

Key words: liver; alanine aminotransferase; aspartate aminotransferase; γ -glutamyltransferase; bilirubin; sodium benzoate; ascorbic acid.

REFERENCES

1. 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. *Comp Rev Food Sci Food Saf.* 2017;16(5):868-80.
2. Asejeje FO, Ajayi BO, Abiola MA, Samuel O, Asejeje GI, Ajiboye EO, Ajayi AM. Sodium benzoate induces neurobehavioral deficits and brain oxido-inflammatory stress in male Wistar rats: Ameliorative role of ascorbic acid. *J Biochem Mol Toxicol.* 2022;36(5):e23010.
3. World Health Organization. Evaluation of certain food additives and contaminants. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2013; 1-75.
4. Yadav A, Kumar A, Das M, Tripathi A. Sodium benzoate, a food preservative, affects the functional and activation status of splenocytes at non-cytotoxic dose. *Food Chem Toxicol.* 2016;88:40-7.
5. Sharma P, Maithani M, Gupta V, Bansal P. Ayurvedic formulations containing benzoic and ascorbic acids as additives: benzene formation during storage and impact of additives on quality parameters. *J Complement Integr Med.* 2020;18(1):59-65.
6. Oloye FF. Spectroscopic investigation of the mixture of ascorbic acid and sodium benzoate. *Sci J Chem.* 2019;7(3):62-66.
7. Kehinde OS, Christianah OI, Oyetunji OA. Ascorbic acid and sodium benzoate synergistically aggravates testicular dysfunction in adult Wistar rats. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2018;10(1):39-46.
8. Noorafshan A, Mahboobeh E, Saied K. Stereological studies of the effects of sodium benzoate or ascorbic acid on rats' cerebellum. *Saudi Med J* 2014;35:1494-500.
9. Thomas L. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST). In: *Clinical Laboratory Diagnostics*. 1st ed. Frankfurt: TH Books Verlagsgesellschaft; 1998:55-65.
10. IFCC Primary reference procedures for the measurements of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C.

- Part 6. Reference procedure for the measurements of catalytic concentration of gamma-glutamyltransferase. Clin Chem Lab Med. 2002;40:734-8.
11. Simmons NA. An automated method for serum bilirubin determination. J Clin Pathol. 1968;21:196-201.
 12. Shank RE, Hoagland CL A modified method for quantitative determination of thymol turbidity reaction of serum. J Biol Chem. 1946;162:133-8.
 13. Smith AK, Ropella GEP, McGill MR, Krishnan P, Dutta L, Kennedy RC, Jaeschke H, Hunt CA. Contrasting model mechanisms of alanine aminotransferase (ALT) release from damaged and necrotic hepatocytes as an example of general biomarker mechanisms. PLoS Comput Biol. 2020;16(6):e1007622.
 14. Yanko RV, Chaka OG, Levashov MI. Influence of methionine on morphofunctional changes of rat liver parenchyma. Fiziol Zh 2020; 66(5):38-45. [Ukrainian].
 15. Chen L, Chen R, Kemper S, Cong M, You H, Brigstock DR. Therapeutic effects of serum extracellular vesicles in liver fibrosis. J Extracell Vesicl. 2018;7(1):1461505.
 16. 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. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2017;16(5):868-80.
 17. Khan IS, Dar KB, Ganie SA, Ali MN. Toxicological impact of sodium benzoate on inflammatory cytokines, oxidative stress and biochemical markers in male Wistar rats. Drug Chem Toxicol. 2022;45(3):1345-54.
 18. Lee HA, Jung JY, Lee YS, Jung YK, Kim JH, An H, et al. Direct bilirubin is more valuable than total bilirubin for predicting prognosis in patients with liver cirrhosis. Gut Liver. 2021;15:599-605.
 19. Yanchuk PI, Komarov IV, Levadianska YA, Slobodanyk LO, Veselsky SP, Vovkun TV, et al. Role of hydrogen sulfide in the regulation of respiration, blood flow and bile secretory function of the liver. Fiziol Zh. 2021;67(5):11-20. [Ukrainian].
 20. Lozano-Paniagua D, Parrón T, Alarcón R, Requena M, López-Guarnido O, Lacasaña M, Hernández AF. Evaluation of conventional and non-conventional biomarkers of liver toxicity in greenhouse workers occupationally exposed to pesticides. Food Chem Toxicol. 2021;151:112127.
 21. Volosivska Y, Godovanets Y. Functional state of the hepatobiliary system in newborns with manifestations of hyperbilirubinemia in perinatal pathology. Modern Pediatr Ukraine. 2021;2(114):13-20. [Ukrainian].
 22. Sarkisova EO, Sushko VO, Chumak AA, Ovsyannikova LM, Nosach OV, Alyokhina SM, Shyiko TO. Retrospective assessment of clinical/morphological changes of the hepatobiliary system in liver cirrhosis of the chornobyl npp accident clean/up workers. Probl Radiatr Med Radiobiol. 2019;24:465-79. [Ukrainian].

*Матеріал надійшов
до редакції 10.10.2022*