

Г.М. Проданчук, С.Г. Шандренко, Т.О. Кишко, к.б.н.,
Н.П. Дмитренко, профессор

НОВЫЕ АСПЕКТЫ МЕХАНИЗМА ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ГИДРОКСИЛАМИНА

Институт экогигиены и токсикологии им. Л.И.Медведя, г. Киев

Гидроксиламин (ГА) и его соли (сульфат, фосфат, гидрохлорид) находят широкое применение в синтезе ряда фармпрепаратов, пестицидов и красителей, капролактама и др. органических соединений; как восстановители в фотографии и антиоксиданты в производстве мыла и жирных кислот. Имеют место случаи производственных и бытовых отравлений ГА и его солями, в частности сульфатом ГА [1,2]. Непосредственную угрозу жизни при острой интоксикации ГА представляют метгемоглобинемия и снижение сосудистого тонуса. Их развитие связывают с образованием в организме из ГА оксида азота (NO) [3]. На это указывает сходство клинических симптомов, возникающих при остром отравлении ГА и NO или его донорами — нитропруссидом натрия, нитритами, неорганическими и органическими нитратами и др., а также то, что ГА, проникая в эритроциты, образует с гемоглобином парамагнитный комплекс ($\text{Hb}^{2+}\text{-NO}$), который на спектре ЭПР дает характерный сигнал ($g_1 = 2,060$ $g_2 = 1,986$) [4,5]. Показано, что в организме ГА является интермедиатом обмена NO и синтезируется не только при реакциях S-нитрозотиолов с тиолами [6], на пути окисления аммония в нитрат [7] и, возможно, в процессе NO-синтазных реакций [8-10], но и способен расщепляться с высвобождением NO при участии каталазной реакции [11-13]. В опытах *in vivo* показано, что введение посредством микродиализа в кортикальную ткань ГА приводит к дозозависимому увеличению концентрации NO [14]. Во многих исследованиях ГА используется в качестве донора NO, который, подвергаясь ферментативному расщеплению внутриклеточно, может воспроизводить эффекты действия последнего [15-18].

Вместе с тем показано, что в организме крыс только небольшая часть (4,7%) введенного с питьевой водой ГА выводится с мочой в виде нитрата и, следовательно, высвобождает NO [19]. Симптоматике отравлений ГА свойственны стойкие гематологические расстройства, которые не характерны для вызываемых NO и его донорами интоксикаций. При них образование MetHb и $\text{Hb}^{2+}\text{-NO}$ не приводит к значительным повреждениям и утилизации эритроцитов в организме тогда, как для гематотоксического действия ГА характерно развитие сульфогемоглобинемии, нарушение структуры Hb и образование телец Гейнца в эритроцитах, их разрушение и развитие гемолитической анемии, спленомегалии, эритробластоза и ретикулоцитоза [2, 3, 20]. Эту сторону действия ГА связывают с особенностями его взаимодействия с гемоглобином (Hb), в результате которого развивается состояние оксидативного стресса в эритроцитах. Используя методы ЭПР-спектроскопии показано, что в результате реакции ГА с оксиHb, помимо образования метгемоглобина (MetHb), который предположительно существует в виде низкоспинового комплекса с ГА и упомянутого выше комплекса $\text{Hb}^{2+}\text{-NO}$, также образуется гидронитроксильный радикал ($\text{NH}_2\text{O}^\bullet$) и парамагнитный комплекс $\text{Fe}(\text{NO}_2)\text{X}_2$, где X — анионы OH- или PO_4^{3-} . Появление $\text{NH}_2\text{O}^\bullet$ связано с образованием H_2O_2 , поскольку воспроизводится в среде, где она присутствует вместе с ГА и Fe^{2+} , а синтез $\text{Fe}(\text{NO}_2)\text{X}_2$ в эритроцитах, вызванный ГА, происходит только при наличии ионов свободного железа [4]. При взаимодействии ГА с оксиHb в эритроцитах отмечается усиление низкоуровневой хемилюминисценции, что связано с появлением

прооксидантного феррильного гема [$\text{Hb}(\text{IV})=\text{O}$], и коррелирует с нарастанием MetHbемии, высвобождением Fe^{3+} из Hb, образованием H_2O_2 и супероксида [5,21, 22]. Синтезируемая при взаимодействии ГА с оксиHb H_2O_2 , возможно, участвует в комплексеобразовании $\text{HbFe}^{2+}\text{-NO}$ подобно тому, как показано для миоглобина [23]. Развитие состояния оксидативного стресса в эритроцитах, вызванное ГА, сопровождается окислением ненасыщенных жирных кислот и SH групп, входящих в состав глутатиона, ферментов, Hb, мембранных и других белков. Под влиянием соединений ГА также существенно ингибируются такие ферменты антиоксидантной защиты, как глутатионпероксидаза и глутатионтрансферазы [24]. Все это приводит к образованию межбелковых и внутрибелковых дисульфидных мостиков, связыванию глутатиона с белками и изменению их конформации [1,20,24]. Именно с прооксидантным действием, а не NO-донорными свойствами, связывают способность ГА вызывать релаксацию предварительно сокращенной артериальной полоски крысы путем увеличения АТР-чувствительного мембранного потенциала [25]. Однако, возможно, что прооксидантное действие ГА, как и его MetHbобразующая способность, сами по себе не являются основной причиной усиления повреждения и утилизации эритроцитов в организме. Например, при отравлении другими MetHbобразователями, в частности нитритом натрия, отсутствуют глубокие нарушения эритроцитов, свойственные токсическому действию ГА, хотя также наблюдается состояние оксидативного стресса [26, 27]. При сравнительной оценке действия ГА, его производных и других ксенобиотиков, обладающих прооксидантным и MetHbобразующим действием, зачастую отмечается низкая корреляция между выраженностью оксидативного стресса в эритроцитах и проявлениями гематотоксичности [1, 21]. В настоящей работе нами обосновывается возможность наличия альтернативного указанным механизмам гематотоксического действия соединений ГА.

Материалы и методы

Исследования проводили на крысах-самцах линии Вистар с мас-

сой тела 200-250 г. Животных умерщвляли путем декапитации под эфирным наркозом.

Крыс разделили на 7 групп по 6 животных в каждой. Крысам 4-х групп вводили гидроксиламин сульфат ("Sigma") (ГАС) перорально в дозе 400 мг/кг в 1 мл суспензии. Крыс декапитировали через 0,5; 1; 3 и 24 ч после введения ГАС. 5-я группа крыс в течение 12 дней получала питьевую воду, содержащую ГАС в количестве 4 мг/мл. Его присутствие почти вдвое снижало суточное потребление воды животными: с 10-12 мл до 4-5 мл; суммарная доза ГАС при этом составляла около 1/40-1/50 LD₅₀. Еще две группы крыс служили соответствующими этим постановкам опытов контролями. Тотчас после декапитации у крыс отбирали образцы крови и ткани печени.

В экспериментах по изучению эффективности метиленового синего при интоксикациях, вызванных ГАС и нитритом натрия, использовали 5 групп крыс (по 6 животных в каждой): контрольная (1) и опытные, получавшие в виде п/к инъекций нитрит натрия в дозе 60 мг/кг (2), нитрит натрия (60 мг/кг) и через 50 мин 1% раствор метиленового синего в дозе 20 мг/кг (3), ГАС в дозе 80 мг/кг (4), а также ГАС (80 мг/кг) и через 50 мин 1% раствор метиленового синего в дозе 20 мг/кг (5). Крыс декапитировали через 2 ч после введения нитрита или ГА.

В опытах *in vitro* использовали кровь, эритроциты и тимоциты. Чтобы предотвратить свертываемость крови, применяли цитрат натрия. Эритроциты выделяли общепринятым методом и промывали 3 раза в среде Хэнкса, содержащей 10 мМ трис-НСI (рН 7,3). Тимоциты выделяли и ресуспендировали с использованием указанной среды, разливали по 1 мл в 24-луночные пластиковые планшеты, добавляли по 0,05 мл 5%-ной термоинактивированной (56°C) сыворотки крови теленка и исследуемые вещества. Затем планшеты инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 7 часов. Каждый час подсчитывали количество мертвых и живых клеток с помощью окрашивания их трипановым синим [28].

Изучение участия NO в механизме действия гидроксиламина проводили с помощью ловушки NO, представляющей собой комплекс

диэтилдитиокарбамата и двухвалентного железа (ДЭТК- Fe²⁺), которую включали в структуру тимоцитов [29]. В интактные и содержащие ловушку NO тимоциты вносили нитропруссид натрия (НП) и ГАС.

Определение дифференциальных оптических спектров проводили на лизатах эритроцитов и растворе metHb (лиофильно высушенный гемоглобин, Sigma) в 0.1М фосфатном буфере (рН=7.4) с концентрацией гемоглобина, при которой экстинция основной полосы (414 нм) лежала в диапазоне от 1 до 1.2 единицы, с использованием спектрометра "Specord M40". Конечная концентрация вносимых в эритроцитарный лизат ГАС и нитрита натрия составляет 50 мМ, а ацетиоангидрина — 0,1%. Спектры регистрировали через каждые 30 мин в течение первых 4-х часов и через 20 часов. Лигандный спектр гемоглобина определяли по экстинции α - и β -полос Сорэ гемоглобина.

Для изучения концентрационно-временной зависимости действия ГАС на ЭПР-показатели крови в опытах *in vitro* к 6 мл каждого образца крови контрольных крыс добавляли 50 мкл раствора ГАС, создавая его конечные концентрации 0.1; 0.5; 1; 3 мМ. Через 0.5; 1.25; 2 и 20 ч из каждой пробы отбирали по 3 образца (0.5 мл) для последующего ЭПР-исследования. Спектры ЭПР образцов крови, эритроцитов и ткани печени регистрировали на радиоспектрометре "Varian E-109" при температуре жидкого азота [30]. Расчет абсолютных единиц проводили методом двойного интегрирования сигнала ЭПР. Концентрацию ионов нитрита и нитрата в крови определяли с помощью реактива Грисса в нашей модификации [31, 32].

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в печени и уровень SH-групп в крови и печени определяли по накоплению соответственно малонового диальдегида (МДА) и продукта реакции Элмана [33]. Осмотическую резистентность эритроцитов определяли по методу Дейчи [34]

Метгемоглобин и общий гемоглобин крови определяли с помощью стандартного набора для лабораторных анализов крови (ТУ У 20632665 001-94).

Статистическую обработку результатов проводили с использова-

нием компьютерных программ Statistica и Excel.

Результаты и их обсуждение

Согласно данным ЭПР-спектроскопии (табл.1), у крыс через 30 мин после одноразового перорального введения ГАС в дозе 400 мг/кг массы тела ($1/2$ LD₅₀) содержание MetHb достигает 56 г/л, (около 50% от общего количества Hb крови).

В последующем уровень MetHb резко снижается. Через 0, 5 ч после введения ГАС в крови крыс обнаруживается высокий анизотропический синглетный сигнал ЭПР с двумя группами триплетного тонкого расщепления ($g=2.03$). По своим параметрам и форме он полностью совпадает с сигналом нитрозильного комплекса гемоглобина, образующегося при взаимодействии гемоглобина с оксидом азота (Hb-NO) (рис.1). У интактных крыс этот сигнал ЭПР отсутствует. Уровень указанного комплекса к 1 ч снизился в 4,5 раза больше, чем MetHb. Но если количество MetHb через 24 ч снизилось относительно максимальной величины в 30 раз и находилось в пределах физиологической нормы, то количество комплекса Hb-NO за такое же время уменьшилось только в 10 раз и оставалось еще достаточно высоким (табл.1), для воздействия на кислородтранспортную функцию крови. Гемовое железо в комплексе Hb-NO находится в восстановленном состоянии, однако из-за ковалентной связи с аддуктом, как и в случае с MetHb, оно утрачивает свою кислородсвязывающую способность. Ее нарушение, очевидно, является определяющим в картине острого отравления ГАС. Так, у опытных крыс в течение 1-го часа, когда уровень

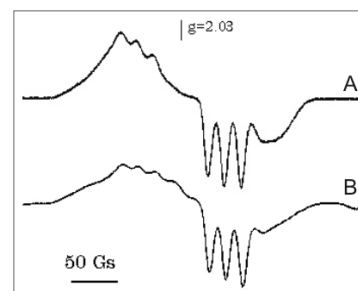


Рисунок 1. Сигнал ЭПР нитрозильного комплекса Hb-NO при добавлении к гемоглобину NO (А), гидроксиламина (В)

ЭПР-спектроскопическое исследование крови и печени у крыс после однократного перорального введения гидроксиламин сульфата в дозе 400 мг/кг ($M \pm m$; $n=6$)

Показатели	Контрольные животные	Время после введения ГАС, ч			
		0,5	1	3	4
Кровь					
MetHb	1,2±0,1	56±8*	17±3*	3,3±0,5*	1,9±0,2*
Hb-NO, г/л	н.о.	23±6*	5,1±1,3*	3,8±1,0*	2,3±0,5*
Fe ³⁺ _{трансфер} , мг/л	0,48±0,11	0,52±0,13	0,50±0,10	0,47±0,10	0,51±0,14
Fe ³⁺ _{лабильн} мг/л	н.о.	н.о.	н.о.	0,10±0,08*	0,85±0,39*
Печень					
Цитохр Р-450, отн.ед.	1,00±0,21	0,89±0,18	1,15±0,21	0,97±0,18	0,88±0,19
Mn ²⁺ -центри, отн.ед.	1,00±0,10	1,00±0,17	0,97±0,07	1,00±0,10	0,77±0,13*
Cu ²⁺ -центри, отн.ед.	1,00±0,04	1,04±0,12	1,00±0,08	1,08±0,16	0,68±0,08*
NO-комплекс, отн.ед.	1,00±0,26	1,61±1,03	2,03±0,87*	1,68±0,26*	0,87±0,61
Mo ⁷⁺ -центри, отн.ед.	1,00±0,20	2,40±0,80*	2,80±0,40*	2,80±0,86*	2,20±0,60*
FeS-центри, отн.ед.	1,00±0,12	1,04±0,15	1,08±0,10	0,94±0,08	0,96±0,06
Q-вил.радикал, отн.ед.	1,00±0,10	1,10±0,12	1,14±0,15	1,10±0,09	1,20±0,09*

Примечание: "н.о." — не обнаружено; * — $P < 0,05$ по отношению к контролю.

MetHb и Hb-NO в крови был самым высоким, отмечались максимально выраженные цианоз, учащение дыхания и пульса, гиподинамия и нарушение двигательной координации. Остаточные проявления этой симптоматики сохранялись у крыс и через 24 ч после введения ГАС, что можно связать с присутствием в крови значительного количества Hb-NO, поскольку уровень MetHb к тому времени практически нормализовался. Под влиянием ГАС через 3 и 24 ч в крови крыс определяются существенные концентрации свободного трехвалентного железа.

В крови крыс, которые потребляли с питьевой водой ГАС, выявлена лишь тенденция к увеличению содержания MetHb, но при этом наблюдался высокий ЭПР сигнал комплекса Hb-NO, отсутствующий у контрольных животных. Появилось лабильное окисленное железо в таком же количестве, как и через 1 сут после однократного введения ГАС (табл.2). На 33% снизилось содержание гемоглобина в крови (табл.2) и заметно уменьшилась резистентность эритроцитов к гипотонической среде (табл.3), что указывает на возможность развития гемолитической анемии

Лигандный спектр гемоглобина у крыс, потреблявших воду с ГАС, также претерпевает существенные

изменения (процент охуHb снизился на 16%, а деохиHb возрос в 16,4 раз), указывающие на ограничение его способности транспортировать кислород, причем преимущественно за счет образования деохиHb (табл.2).

Вызванное ГАС появление в крови крыс сильного сигнала ЭПР, характерного для комплекса Hb-NO, на первый взгляд можно объяснить тем, что ГАС в клетках организма подвергается биотрансформации с высвобождением NO. Именно к такому выводу приходят различные исследователи, изучавшие токсическое действие ГА и его производных [15-18, 35, 36]. Но динамика изменений концентрации MetHb и

комплекса Hb-NO в крови, вызванная введением ГАС, не типична для той, что наблюдается обычно при действии NO и его доноров. В последнем случае, распад нитрозильного комплекса в геме является основной причиной образования MetHb и предшествует ему. Для выяснения возможности высвобождения в клетках NO из ГАС и участия NO в цитотоксическом действии ГАС нами проведено соответствующее исследование *in vitro* на тимоцитах.

Из данных, представленных на рис.2, видно, что ГАС оказывает на тимоциты токсическое действие, которое оценивается по количеству погибших в среде инкубации клеток и демонстрирует монотонную

Таблица 2

Характеристика гемоглобина и фонд свободного железа в крови крыс, принимавших в течение 12 суток с питьевой водой ГАС

Показатели	Контроль	Опыт
Hb, г/л	114±16	76±7,0*
MetHb, г/л	0,9±0,1	1,2±0,4
Hb-NO, г/л	0	1,7±0,5*
ОхуHb, %	88±1,0	74±3,0*
ДеохуHb, %	0,5±0,1	8,2±1,5*
Fe ³⁺ -лабильное	0	0,8±0,2*

Примечание: * - $p < 0,05$ относительно контрольных величин.

Таблица 3

**Резистентность эритроцитов у крыс, принимавших
в течение 7 суток с питьевой водой ГАС**

NaCl в среде инкубации эритроцитов, %	Количество гемолизированных эритроцитов, %	
	Контроль	Опыт
0,900	0	0
0,600	0	0
0,550	0	0
0,525	0	1,3+0,1*
0,500	4,2+0,6	7,7+0,9*
0,475	11+2	13+2
0,450	33+4	39+4
0,400	79+9	75+2
0,300	100	100

Примечание: * — $p < 0,05$ относительно контрольных величин.

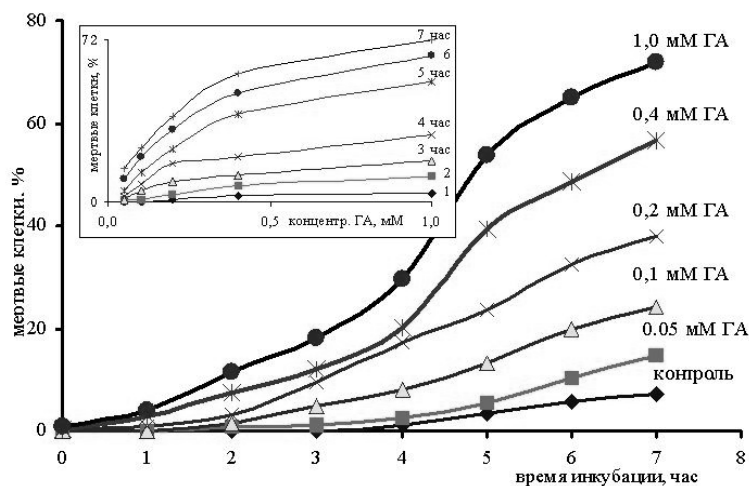


Рисунок 2. Концентрационная (А) и временная зависимость (Б) цитотоксического действия ГАС на тимоциты.

дозо-временную зависимость. Кривые имеют характерную точку перегиба в узком диапазоне концентраций ГАС (0,2-0,4 мМ). При этом прирост погибших тимоцитов с увеличением ГАС в пределах меньших концентраций значительно выше, чем при больших концентрациях, и характер этих изменений сохраняется независимо от времени инкубации клеток в присутствии ГАС. Такая особенность концентрационной зависимости может указывать на наличие двух различных механизмов токсического действия ГАС на тимоциты, один из которых преобладает при низких концентрациях ГАС, а другой — при высоких. Это также возможно и при наличии различных субпопуляций тимоцитов с

разной чувствительностью к ГАС.

Чтобы выяснить вклад NO в цитотоксическое действие ГАС, в тимоцитах с помощью разработанного нами метода формировалась ловушка NO, которая представляет собой железосерный комплекс, состоящий из диэтилдитиокарбамата Na и железа (ДЕТК-Fe²⁺). Причастность NO к цитотоксичности исследуемого соединения можно оценивать путем сравнения количества погибших клеток среди интактных и содержащих ловушку тимоцитов. Из данных табл.4 видно, что создание ловушки NO в тимоцитах делает их более устойчивыми к воздействию ГАС. Особенно это заметно при более низкой концентрации ГАС — 0,2мМ, при которой тимоциты с ло-

вушкой NO гибнут почти на 70% меньше, чем интактные. В опытах с более высокими концентрациями ГАС (0,4 мМ и 1,0 мМ) присутствие ловушки NO в тимоцитах увеличивает их выживаемость в значительно меньшей мере (на 34% и 31%). Цитотоксическое действие нитропрусида натрия, который, будучи классическим донором NO, использован нами в качестве положительного контроля, в присутствии ловушки NO устраняется почти полностью. Полученные результаты указывают на то, что цитотоксичность ГАС определяется как минимум двумя механизмами, один из которых опосредуется высвобождением свободного NO из ГАС и особенно выражен при низких его концентрациях, а другой с этим процессом не связан. Эти данные подтверждают высказанное выше на основании анализа кривых индуцированной ГАС гибели тимоцитов (рис.2) предположение о существовании по крайней мере двух различных механизмов цитотоксического действия ГАС.

Выявленная в опытах *in vitro* на тимоцитах возможность внутриклеточного образования NO из ГАС при его поступлении в организм, по-видимому, не реализуется. Так, в печени крыс после однократного введения ГАС отмечается небольшое возрастание сигнала ЭПР, свойственного динитрозильному комплексу двухвалентного негемового железа с парными SH-группами белков и низкомолекулярных лигандов (DNIC), который является основным биомаркером присутствия свободного NO в тканях организма (рис.3, табл.1). Такой комплекс обеспечивает хранение и транспортировку NO. Наличие небольших количеств динитрозильного комплекса в печени контрольных крыс связано прежде всего с эндогенным синтезом NO и поступающими с пищей и питьем нитритами и нитратами. При введении крысам ГАС с питьевой водой количество этого комплекса в печени вообще не увеличивается. Однако, при остром отравлении таким известным донором NO, как нитрит натрия, в ткани печени наблюдается на много больший сигнал ЭПР, характерный для динитрозильного комплекса негемового железа, чем при разовом введении ГАС (рис.3). Кроме того, после введения нитрита натрия происходит

Количество погибших клеток в суспензии интактных и содержащих ловушку NO тимоцитов под влиянием ГAc и нитропруссид натрия

Эффекторы (мМ)	Интактные тимоциты	Тимоциты с ловушкой NO
Отсутствуют	7,0 + 1,2	8,7 + 0,9
Нитропруссид Na (0,1)	43,8 + 3,6*	11,1 + 1,9**
ГAc (1,0)	67,5 + 5,1*	50,5 + 3,5*,**
ГAc (0,4)	52,1 + 4,3*	38,2 + 3,1*,**
ГAc (0,2)	33,6 + 2,8*	17,4 + 2,6*,**

Примечание: в % к общему количеству клеток в среде инкубации (M+m; n=3). P < 0.05 относительно соответствующих величин, полученных в отсутствии эффектора (*) и на интактных тимоцитах (**).

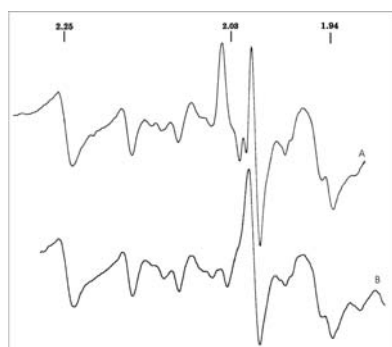


Рисунок 3. Сигнал ЭПР ткани печени крыс при введении нитрита натрия (А) и гидроксилamina (В). Сигнал $g=2,03$ -нитрозильный комплекс с белками печени.

существенное снижение величины сигналов ЭПР (рис. 3), характерных для цитохромов P-450, а также Mn^{2+} , Cu^{2+} и восстановленных железо-серных (митохондриальных) центров, которые служат непосредственными мишенями воздействия свободного NO. Значительно снижается также сигнал ЭПР Q-убихиноновых свободных радикалов. Иная динамика и направленность изменений этих показателей наблюдается в печени крыс, получавших ГAc (табл.1). В частности, происходит быстрое увеличение ЭПР-сигнала Mo^{7+} центра, характерного для ксантиноксидазы, которое остается повышенным в течение суток. В процессе активации ксантиноксидазной реакции увеличивается образование H_2O_2 и супероксида. Спустя 24 ч также возрастает количество Q-убихиноновых свободных радикалов и снижается на 23% и 32% высота ЭПР сигналов соответственно Mn^{2+} и Cu^{2+} центров. Последние изменения могут указывать на ослабление антиоксидантной защи-

ты за счет уменьшения количества супероксиддисмутазы и церрулоплазмينا, в структуру активного центра которых входят эти микроэлементы. Перечисленные проявления оксидативного стресса, очевидно, служат причиной индуцируемого ГAc увеличения спонтанного (около 40%) и аскорбатзависимого (36-40%) уровня малонового диальдегида в печени (табл.5), что указывает на интенсификацию перекисного окисления липидов (ПОЛ). В данном случае, однако, процессы оксидации сопровождаются увеличением уровня свободных SH-групп, основным носителем которых является GSH (табл.5).

Возрастание содержания клеточного GSH может происходить в условиях редуцирующего стресса, характеризующегося увеличением отношения $NADH/NAD^+$ или $NADPH/NADP^+$ и, следовательно, глутатионредуктазной активности [37]. Подобное сочетание оксидативного и редуцирующего стресса в тканях является характерным для метаболической гипоксии, вызванной различными ксенобиотиками, например, нитритами [27], а не только ГAc. В условиях метаболической гипоксии недостаток O_2 приводит, с одной стороны, к гиперпродукции супероксида митохондриальными комплексами I и III в результате активации ксантиноксидазной реакции и инфильтрации тканей лейкоцитами крови, а с другой, — к накоплению восстановленных эквивалентов [38-40]. С последним может быть связана активация NO-синтаз и то небольшое увеличение уровня NO, что наблюдается в печени (табл.1). При гиперпродукции NO в тканях, обусловленной экзогенными его источника-

ми и значительным возрастанием активности индуцибельной NO-синтазы, в отличие от интоксикации ГAc, происходит снижение уровня GSH, в частности, за счет образования S-нитрозоглутатиона [41, 42].

Учитывая изложенное, вряд ли можно рассматривать экзогенный ГAc в качестве непосредственного источника NO в ткани печени, а, следовательно, и других тканях и клетках организма. Так как в плазме крови крыс, получавших ГAc, обнаруживается увеличение суммарного уровня нитритов и нитратов только в 2,3 раза (табл. 6), что намного меньше, чем при введении сходных количеств доноров NO, то образование последнего из ГAc в кровяном русле также представляется проблематичным.

В ответ на введение ГAc в крови крыс происходит снижение содержания GSH (табл. 6). Подавляющее его количество находится в эритроцитах, где он участвует в поддержании Hb в Fe(II) состоянии и антиоксидантной защите с помощью ферментов глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и глутатион-S-трансферазы. Снижение уровня GSH в эритроцитах при действии ГAc и его производных в опытах *in vitro* показано также другими исследователями [1, 20]. Они связывают его с окислением GSH, которое приводит к образованию дисульфидных мостиков между глутатионом и белками и индуцируется свободными радикалами, образующимися в процессе циклической окислительно-восстановительной реакции между ГAc и дезоксигемоглобином.

Принимая во внимание полученные доказательства того, что способность клеток и тканей к обра-

Интенсивность ПОЛ и содержание SH-групп в печени после однократного введения гидросиламин сульфата (M±m; n=6)

Группа животных		Количество МДА, нмоль/г ткани			SH-группы, мкмоль/г ткани
		Фоновое	Спонтанное	Аскорбатзависимое	
Контроль		5,7±1,1	23±2	351±19	24 ± 2
Опыт; время после введения ГАС, ч	0,5	6,2±1,3	34±2*	499±23*	31 ± 3*
	1	6,6±1,1	33±2*	478±18*	28 ± 4
	3	5,7±0,9	33±2*	481±13*	34 ± 3*
	24	6,4±1,1	33±2*	421±26	39 ± 6*

Примечание: * p<0,05 относительно контроля.

Содержание SH-групп в крови и суммарных нитритов и нитратов в плазме после однократного введения гидросиламин сульфата (M±m; n=6)

Таблица 6

Группа животных		SH-группы, мкмоль/мл	NO ₂ + NO ₃ , мкг/мл
Контроль		4,6 ± 0,6	12 ± 1
Опыт; время после введения ГАС, ч	0,5	3,4 ± 0,3	28 ± 2*
	1	3,1 ± 0,3*	24 ± 2*
	3	2,9 ± 0,4*	26 ± 2*
	24	5,7 ± 0,3	21 ± 2*

Примечание: * p< 0,05 относительно контроля

зованию NO из ГАС при его поступлении в организм не реализуется, а определяющим в токсическом действии ГАС является нарушение кислородтранспортной функции и жизнеспособности эритроцитов, нами проведено изучение реакции ГАС с гемоглобином.

Из данных, полученных в опытах in vitro (табл.7), видно, что через 0,5 часа после добавления ГАС в образцах крови отмечается зависимое от концентрации увеличение высоты сигнала ЭПР, свойственного MetHb. Появляется также ЭПР-сигнал комплекса Hb-NO, величина которого возрастает с увеличением концентрации ГАС (табл.7).

В процессе последующей инкубации образцов крови также, как и в опытах in vivo, величины MetHb и комплекса Hb-NO разнонаправленно изменяются, что указывает на наличие между этими показателями взаимосвязи, которая, очевидно, обусловлена окислительно-восстановительным характером реакции ГАС с железом Hb. В MetHb гемовое железо находится в окисленном

состоянии (Fe³⁺), а в нитрозильном комплексе гемоглобина — в восстановленном (Fe²⁺). Первоначально ГАС как сильный окислитель образует MetHb. Например, в присутствии 3 мМ ГАС за 75 мин образуется около 50% MetHb. За последующие 45 мин его уровень снижается в 2 раза и через 20 ч не отличается от уровня MetHb в суспензии эритроцитов без ГАС (контроль). При меньших концентрациях ГАС (0,1-1мМ) количество MetHb через 20 ч снижается ниже контрольных величин — на 35-58%. Одновременно достигает максимальных величин концентрация комплекса Hb-NO (табл.7).

Сходная направленность изменений в содержании metHb и Hb-NO, вызванных ГАС, получена также на лизате эритроцитов методом дифференциальной спектроскопии (рис. 4). В течение 1 ч в оптическом спектре формируются два выраженных пика поглощения комплекса metHb (400-405 нм) и Hb-NO (380-390 нм), первый из которых в дальнейшем за 20 ч снижается вплоть до исчезновения, а второй, наоборот,

усиливается, что характеризует восстановительные свойства ГА ($Fe^{+3}_{гем} \rightarrow Fe^{+2}_{гем}$). Это свойство ГА проявляется и при его добавлении к раствору metHb (рис.4, Д) уменьшением на протяжении всего времени эксперимента интенсивности полосы поглощения metHb (405 нм) одновременно с нарастанием величины поглощения в области 420 нм, характерной для восстановленного гема. Однако при этом не регистрируется полоса поглощения комплекса Hb-NO. При действии на эритроцитарный лизат нитрита натрия отмечаемые первоначально (в течение 1 ч) одинаковые изменения в спектрах поглощения Hb трансформируются в противоположные — к 20-ти часам полоса поглощения комплекса Hb-NO исчезает, а метгемоглобина усиливается. Это характеризует окислительные свойства нитрита натрия ($Fe^{+2}_{гем} \rightarrow Fe^{+3}_{гем}$). Учитывая изложенное, можно предположить, что нитрозильный комплекс Hb-NO образуется только в результате действия ГА на восстановленный гем (оxуHb, deoxуHb). В этой связи, очевидно, в крови крыс, потреблявших с питьем ГАС, отмечается аномально высокий уровень deoxуHb (8,2 %), определяемый методом оптической спектроскопии (табл.2). С состоянием гипоксии и оксидативного стресса, вызванного действием различных факторов, в том числе и поступлением в организм крысы с питьевой водой ГАС, связано значительное повышение уровня metHb. Его отсутствие (табл.2), возможно, объясняется тем, что накапливающийся в крови metHb взаимодействует с излишками свободного ГА. В результате образуется непарамагнитный комплекс Hb с ГА, в котором гемо-

Влияние ГAc на содержание MetHb (г/л) и Hb-NO (г/л) в образцах крови крыс ($M \pm m$, $n=3$).

Концентрация ГAc в пробе, mM		Время инкубации, ч			
		0,5	1,25	2	20
0	MetHb	$0,9 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,3$
	Hb-NO	0	0	0	0
0,1	MetHb	$1,9 \pm 0,4^*$	$1,3 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,3^*$
	Hb-NO	$0,08 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,03$	$1,91 \pm 0,12$
0,5	MetHb	$7,5 \pm 0,9^*$	$4,7 \pm 0,7^*$	$2,1 \pm 0,4^*$	$1,3 \pm 0,3^*$
	Hb-NO	$1,2 \pm 0,1$	$0,92 \pm 0,06$	$1,1 \pm 0,1$	$6,3 \pm 0,5$
1	MetHb	$15 \pm 2^*$	$11 \pm 1^*$	$7,5 \pm 0,8^*$	$1,2 \pm 0,4^*$
	Hb-NO	$3,2 \pm 0,3$	$3,4 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,2$	20 ± 2
3	MetHb	$39 \pm 4^*$	$52 \pm 4^*$	$24 \pm 2^*$	$1,6 \pm 0,4$
	Hb-NO	22 ± 1	26 ± 2	13 ± 2	101 ± 13

Примечание: * - $p < 0,05$ относительно соответствующих величин, полученных в образцах крови без ГAc.

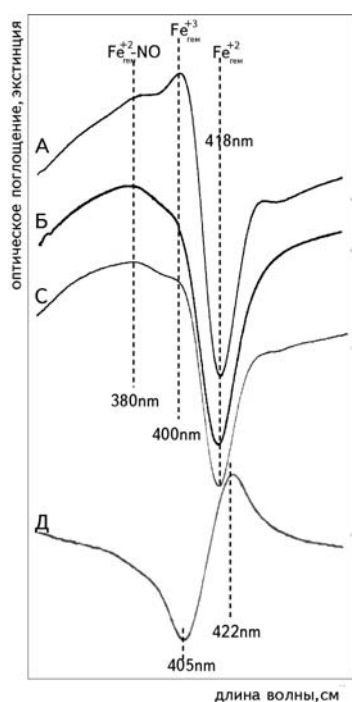


Рисунок 4. Дифференциальные оптические спектры.

А: лизат эритроцитов (ЛЭ) – ЛЭ+ГAc (1 ч), Б: ЛЭ – ЛЭ+ГAc (20 ч), С: ЛЭ – ЛЭ+NaNO₂ (1 ч), Д: metHb – metHb+ГAc (1 ч)

вое железо восстанавливается. Отсутствие в образованном комплексе координационно связанного O₂ и ковалентной связи Fe²⁺_{гем}-NO приводит к тому, что он оптической спектроскопией определяется как deoxyHb, однако, в отличие от реального deoxyHb, этот комплекс не способен переносить O₂ и накапливается в крови.

Согласно полученным нами данным, ГА при взаимодействии с оксидом deoxyHb окисляет гемовое железо, формируя с ним ковалентно связанный аддукт (Fe³⁺_{гем}-NH₂OH), который со временем преобразуется, железо восстанавливается и появляется ковалентная связь Fe²⁺_{гем}-NO. Наличие в среде инкубации эритроцитов вместе с ГAc в качестве источника циан-иона ацетациангидрина не препятствовало образованию MetHb-ГА аддукта. При этом в спектре поглощения отсутствовали полосы, характерные для цианметгемоглобина. С другой стороны, ГAc не препятствовал образованию цианметгемоглобина при воздействии ацетациангидрина на раствор MetHb. Эти данные указывают, что образованный в результате взаимодействия ГAc с гемоглобином в окси- или дезокси- форме MetHb-ГА аддукт нельзя отнести к типичному MetHb, в котором Fe³⁺ легко доступен для воздействия цианидов и восстанавливающих агентов.

Принято считать, что ГА как метгемоглобинообразователь может использоваться в качестве антидота при отравлении цианидами [43,44]. Но полученные нами данные указывают на бесполезность такого его применения. Отчасти это подтверждается и данными литературы, посвященными сравнительному изучению эффективности антидотного действия различных метгемоглобинообразователей. Оказалось, что ГА облегчает состояние отравленных цианидами гораздо менее эффек-

тивно, чем нитрит натрия [43,45].

В MetHb-ГА аддукте окисленное гемовое железо (Fe³⁺) является стойким к действию классических восстановителей. Так, метгемоглобинемия, развившаяся у крыс в течение 2 ч после подкожной инъекции ГAc (80 мг/кг), не устраняется при внутривенном введении метиленового синего в дозе 20 мг/кг за 1 ч до взятия для анализа образцов крови. Но его введение крысам с нитритной интоксикацией (через 2 ч после подкожной инъекции нитрита натрия 60 мг/кг), приводит к значительному (на 74%) восстановлению MetHb. В обоих случаях инъекции крысам метиленового синего не влияли на уровень комплекса Hb-NO (табл. 8).

Полученные данные указывают на то, что в образовавшемся MetHb-ГА аддукте железо самопроизвольно восстанавливается в результате присоединения к нему валентного электрона от NO-группы ГА. При этом разрушения аддукта не происходит. По ЭПР-спектральным характеристикам новообразованный комплекс восстановленного железа с гидроксилминовым аддуктом, как упоминалось выше, полностью идентичен нитрозильному, который образуется при взаимодействии гемоглобина с NO и его донорами, но отличается очень высокой стабильностью. Так, согласно нашим данным, нитрозильный комплекс гемового железа с ГА сохраняется неизменным в течение недель при хранении образцов крови в нормоксических условиях и комнатной темпера-

Влияние метиленового синего на концентрацию MetHb и комплекса Hb-NO в крови крыс с острой интоксикацией, вызванной нитритом натрия и гидросиламин сульфатом

Группа животных	MetHb, г/л	Hb-NO, г/л
Контроль	1,1 ± 0,2	0
Нитрит натрия	28 ± 4	2,8 ± 0,6
Нитрит натрия + метиленовый синий	7,3 ± 2,4 *	2,9 ± 0,9
ГAc	22 ± 5	4,8 ± 1,1
ГAc + метиленовый синий	20 ± 6	4,5 ± 0,9

Примечание: * $p < 0.0001$ относительно группы крыс с нитритной интоксикацией.

туре, в процессе сольобилизации Hb из эритроцитов в гипотоническую среду с pH 2-10 и в присутствии 10 М мочевины в гемолизате эритроцитов. При всех этих условиях образование MetHb не наблюдается. С другой стороны, комплекс Hb-NO, образованный в результате пропускания газообразного NO через суспензию эритроцитов, является неустойчивым и в нормоксических условиях при комнатной температуре распадается за минуты с образованием MetHb. При закислении среды инкубации эритроцитов этот процесс значительно ускоряется.

Анализ полученных в опытах *in vivo* и *in vitro* результатов, отражающих динамику изменений концентраций MetHb и Hb-NO (табл.1 и 7), ставит под сомнение предположение [4,5] о том, что процесс взаимодействия ГА и дезоксигемоглобина является непрерывной циклической окислительно-восстановительной реакцией, которая служит источником образования свободных радикалов, приводящего к возникновению оксидативного стресса в эритроцитах и их разрушению. Более вероятным представляется, что процесс взаимодействия ГА и дезоксигемоглобина в организме является однонаправленным и через промежуточный аддукт с окисленным гемглобиновым железом (Fe^{3+}) заканчивается образованием стойкого комплекса гемового железа (Fe^{2+}) с ГА. При этом переброска электрона между железом и молекулой ГА про-

исходит в гемоглобине без разрушения аддукта и, очевидно, не сопровождается высвобождением свободных радикалов в том масштабе, который мог бы быть в случае функционирования окислительно-восстановительного цикла. Поэтому именно накопление нитрозильного комплекса гемового железа с ГА в эритроцитах каким-то образом влечет за собой стойкие метаболические и структурные изменения, в результате которых клетки распознаются организмом как дефектные, выводятся из кровяного русла и разрушаются обычным путем, преимущественно в селезенке. Отсюда основными синдромами отравления ГА являются активация процессов утилизации эритроцитов и компенсаторного синтеза ретикулоцитов, а также спленомегалия [3]. Нами показано, что уже через 20 ч после введения крысам ГАс весовой коэффициент селезенки возрастает относительно контрольных животных более, чем в 1,5 раза: с $(0,47 \pm 0,07)\%$ до $(0,74 \pm 0,22)\%$ ($n=6$). Возможно, что при утилизации поврежденных эритроцитов, в частности, путем фагоцитирования, происходит высвобождение ГА и обратное поступление его в кровяное русло. Это может быть причиной рецидива клинической картины гидросиламиновой интоксикации спустя 1-2 недели после острого отравления [46]. При остром отравлении ГАс в крови крыс содержание комплекса Hb-NO снижается, хотя и в меньшей

степени, чем уровень MetHb, а в опытах *in vitro* под влиянием ГА в образцах крови на фоне снижения уровня MetHb ниже контрольных величин происходит максимальное увеличение количества комплекса Hb-NO (табл.1 и 7). Эти данные свидетельствуют в пользу того, что в организме при интоксикации ГАс эритроциты в результате накопления определенного количества гидросиламинового аддукта становятся нежизнеспособными и разрушаются, что сопровождается исчезновением самого комплекса. Обнаружение с помощью ЭПР в опытах *in vivo* в крови крыс негемового окисленного железа (Fe^{3+} негем; $g=4,3$), или иначе свободного железа, не сопровождается изменениями концентрации Fe^{3+} трансферрина (табл. 1 и 2) и поэтому вряд ли связано с нарушением обмена железа в организме, которое могло бы возникнуть при образовании из ГАс NO. Появление свободного негемового железа обусловлено скорее его образованием и высвобождением в процессе утилизации дефектных, не способных осуществлять кислородтранспортную функцию эритроцитов, сопровождаемым распадом гидросиламинового Hb-NO аддукта.

В опытах *in vitro*, проведенных на отмытых цельных эритроцитах, также отмечается вызванное ГАс образование свободного окисленного железа. Через 20 ч после добавления в среду инкубации эритроцитов ГАс в зависимости от его концентрации определяются следующие уровни свободного железа: 0,1 мМ ГА — $(0,32 \pm 0,14)$ мг/л; 0,5 мМ ГА — $(0,61 \pm 0,20)$ мг/л; 1 мМ ГА — $(1,0 \pm 0,3)$ мг/л; 3 мМ ГА — $(1,8 \pm 0,7)$ мг/л; в контрольных образцах свободное железо не обнаружено. В отмытых эритроцитах отсутствует трансферрин и поэтому источником свободного негемового железа (Fe^{3+}), сигнал которого фиксируется с помощью ЭПР, может быть только разрушение гемоглобина. Возможно, что именно появление свободного окисленного железа в силу его способности катализировать реакцию Хабера-Вейсса [47] служит основной причиной ускорения развития оксидативного стресса и процессов

ЛИТЕРАТУРА

1. Evelo C.T.A., Spooren A.A.M.G., Bisschops R.A.G., Baars L.G.M. Two mechanisms for toxic effects of hydroxylamines in human erythrocytes: involvement of free radicals and risk of potential // Blood Cells Molecules and Diseases.-1998. -24, N13.-P. 280-295.
2. Проданчук Г.Н., Балан Г.М. Окислительный стресс в формировании ге-

- молитической анемии при токсическом воздействии соединений гидросиламина // *Соврем. пробл. токсикол.*-2005.-№1.-С. 4-10.
3. *Gross P.* Biologic activity of hydroxylamine // *CRC Crit. Rev. Toxicol.*-1985.— 14, N1.— P. 87-99.
 4. *Stolze K., Nohl H.* Detection of free radicals as intermediates in the methemoglobin formation from oxyhemoglobin induced by hydroxylamine // *Biochem. Pharmacol.* -1989.— 38, N 18.— P. 3055-3059
 5. *Stolze K., Dadak A., Liu Y., Nohl H.* Hydroxylamine and phenol-induced formation of methemoglobin and free radical intermediates in erythrocytes // *Biochemical. Pharmacol.* -1996.— 52, N12.— P. 1821-1829.
 6. *Wong P.S., Hyun J., Fukuto J.M., Shiota F.N., DeMaster E.G., Shoeman D.W., Nagasawa H.T.* Reaction between S-nitrosothiols and thiols: generation of nitroxyl (HNO) and subsequent chemistry // *Biochemistry.* -1998.— 37, N 16.— P. 5362-5367.
 7. *Saul R.L., Archer M.C.* Oxidation of ammonia and hydroxylamine to nitrate in the rat and in vitro // *IARC Sci. Publ.*-1984.— 57.-P.241-246.
 8. *Vetrovsky P., Stoclet J.C., Entlicher G.* Possible mechanism of nitric oxide production from N(G)-hydroxy-L-arginine or hydroxylamine by superoxide ion // *Int. J. Biochem. Cell Biol.*-1996.— 28,N 12.-P.-1311-1318;
 9. *Schmidt H. H. W., Hofmann H., Schindler U., Shutenko Z. S., Cunningham D. D., Feilisch M.* NO from NO synthase (NADPH / superoxide dismutase / hydroxylamine / nitroxyl / peroxyxynitrite) // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*-1996.— 93, N.25.— P.— 14492-14497.
 10. *Klink M., Swierzko A., Sulowska Z.* Nitric oxide generation from hydroxylamine in the presence of neutrophils and in the cell-free system // *APMIS.*— 2001.-109, N 7-8.-P.— 493-499.
 11. *Mian K.B., Martin W.* The inhibitory effect of 3-amino-1,2,4-triazole on relaxation induced by hydroxylamine and sodium azide but not hydrogen peroxide or glyceryl trinitrate in rat aorta // *British J. Pharmacol.*— 1995. -116, N 8.— P. 3302-3308.
 12. *Pou S., Pou W.S., Rosen G.M., el-Fakahany E.E.* N-hydroxylamine is not an intermediate in the conversion of L-arginine to an activator of soluble guanylate cyclase in neuroblastoma N1E-115 cells // *Biochem J.*— 1991.— 273, N 3.— P.547-552.
 13. *Fradette C, Yamaguchi N, Du Souich P.* 5-Hydroxytryptamine is biotransformed by CYP2C9, 2C19 and 2B6 to hydroxylamine, which is converted into nitric oxide // *Br. J. Pharmacol.*— 2004.— 141, № 3.-P.407-414.
 14. *Ohta K., Rosner G., Graf R.* Nitric oxide generation from sodium nitroprusside and hydroxylamine in brain // *Neuroreport.*-1997.— 8, N 9.— P. 2229-2235.
 15. *Beauvais F., Michel L., Dubertret L.* The nitric oxide donors, azide and hydroxylamine, inhibit the programmed cell death of cytokine-deprived human eosinophils // *FEBS Lett.*— 1995.— 361, N 2-3.— P. 229-232.
 16. *Huang Y.* Hydroxylamine-induced relaxation inhibited by K⁺ channel blockers in rat aortic rings // *Eur. J. Pharmacol.*— 1998.— 349, N 1.— P. 53-60.
 17. *Ekesson B., Lundquist I.* Influence of nitric oxide modulators on cholinergically stimulated hormone release from mouse islets // *J. Physiol.* -1999.— 515, N2.— P. 463-473.
 18. *Zayas R.M., Sanjive Q., Morton D.B., Trimmer B.A.* Nicotin-acetylcholin receptors are functionally coupled to the nitric oxide/cGMP-pathway in insect neurons // *J. Neurochem.*— 2002.-83.-P.421-431.
 19. *Saul R.L., Archer M.C.* Oxidation of ammonia and hydroxylamine to nitrate in the rat // *IARC Scientific Publication.*-1984.— N 57. -P. 241-246.
 20. *Spooren A.A.M.G., Evelo C.T.A.* Hydroxylamine treatment increases glutathione-protein and protein-protein binding in human erythrocytes // *Blood Cells Molecules and Diseases.*-1997.— 23, N 17.— P. 323-336.
 21. *Spooren A.A.M.G., Evelo C.T.A.* A study on the interaction between hydroxylamine analogues and oxyhemoglobin in intact erythrocytes // *Blood Cells Mol. Dis.*— 2000.— 26, N4.— P.373-386.
 22. *Harwvey J.W.* (1989) In "Clinical Biochemistry of Domestic Animals" (J.J.Kaneko, ed.), 4th Ed. // dir.niehs.nih.gov/dirlep/Webpage/s/assytxt.html
 23. *Taira J., Misik V., Riesz P.* Nitric oxide formation from hydroxylamine by myoglobin and hydrogen peroxide // *Biochim. Biophys. Acta.* -1997.— 1336, N3.— P. 502-508.
 24. *Spooren A.A.M.G.; Evelo C.T.A.* Only the glutathione dependent antioxidant enzymes are inhibited by haematotoxic hydroxylamines // *Human Experimenta. l Toxicology.*— 1998.— 17, N 10.— P. 554-559.
 25. *Tang G, Wu L, Wang R.* The effect of hydroxylamine on KATP channels in vascular smooth muscle and underlying mechanisms // *Mol. Pharmacol.*— 2005.-67, N 5.— P.1723-1731.
 26. *Шукалей И.В., Львов С.Н., Щелюнский И.В., Баяв В.И.* Влияние отравления нитритом натрия на активность ферментов антиоксидантной защиты и процессов пероксидации в эритроцитах мыши // *Укр. биохим. журн.*-1992.— 64, N 2.-С. 111-114.
 27. *Zavodnik I.B., Lapshina E.A., Re-kawiecka K., Zavodnik L.B., Bartosz G., Bryszewska M.* Membrane effects of nitrite-induced oxidation of human red blood cells // *Biochim. Biophys. Acta.*-1999.-1421, № 2.-P.-306-316.
 28. *Кишко Т.О., Дмитренко Н.П., Лобода Ю.И.* Изучение характера гибели тимоцитов крыс, вызванной различными ксенобиотиками // *Современные проблемы токсикол.*-2000, №4.-С.13-16.
 29. *Кишко Т.О., Шандренко С.Г., Дмитренко Н.П.* Об участии оксида азота и супероксида в апоптозе тимоцитов, вызванном папаверином и нитропруссидом натрия // *Современные проблемы токсикол.*-2001.— №1.-С.26-31.
 30. *Ажсина Я.И.* Медико-биологические аспекты применения метода ЭПР.- М.: Наука, 1983.-528 с.
 31. *Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J.G.* Analysis of nitrate, nitrite and 15N-nitrate in biological fluids // *Anal. Biochem.*-1982.-126, N.1.— P.131— 138.
 32. *Смердова Л.Н., Кишко Т.О., Паршиков А.В., Дмитренко Н.П.* Изучение влияния некоторых метаболитов на синтез оксидов азота перитонеальными макрофагами крыс // *Укр. биохим. журн.*— 1999.— 71, №3. -С.30-34.
 33. Биохимические, иммунологические и биофизические методы в токсикологическом эксперименте (метод. рук-во).-Киев, 1989.-184 с.
 34. *Тодоров Й.* Клинические лабораторные исследования в педиатрии. — София: Медицина и физкультура.-1963.— 874с.
 35. *Lockamy V.L.* The search for the mechanism of nitric oxide release in hydroxyurea therapy // *WAKE FOREST UNIVERSITY Dissert. for the Degree of PhD May 2004 Winston-Salem, North Carolina* www.lib.nchu.edu.tw/lib_database_search/94DDC/Biophysics.cs.xls
 36. *Reilly T.P., Woster P.M., Svensson C.K.* Methemoglobin Formation by Hydroxylamine Metabolites of Sulfamethoxazole and Dapsone: Implications for Differences in Adverse Drug Reactions // *J. Pharmacology and Exp. Therap.*— 1999.— 288, N 3.— P. 951-959.
 37. *Kehrer J.P., Lund L.G.* Cellular reducing equivalents and oxidative stress // *Free Radic. Biol. Med.*-1994.— 17, N1.-P.65-75.
 38. *Khan S, O'Brien P.J.* Modulating hypoxia-induced hepatocyte injury by affecting intracellular redox state // *Biochim Biophys Acta.*-1995.— 1269, N 2.— P.153-161.
 39. *Mohanraj P., Merola A.J., Wright V.P., Clanton T.L.* Antioxidants protect rat diaphragmatic muscle function under hypoxic conditions // *J. Appl. Physiol.*-1998.— 84, N 6.-P. 1960-1966.
 40. *Ghyczy M., Boros M.* Electrophilic methyl groups present in the diet ameliorate pathological states induced by

- reductive and oxidative stress: a hypothesis // *British J. of Nutrition.*— 2001.— 85, N4.—P.409-414.
41. *Дмитренко Н.П., Сноз С.В., Шандренко С.Г. и др.* Влияние акцепторов оксида азота на критерияльно значащие биохимические показатели у крыс с нитритной нагрузкой // *Современные проблемы токсикол.*— 1998. — №1. — С.24-28.
42. *Дмитренко Н.П., Холиан А.* Роль взаимодействия путей метаболизма формальдегида и оксида азота в механизме их токсического действия. Токсическое действие оксида азота // *Укр. биохим. журн.*— 2005. — 77, № 5. — С.5-26.
43. *Vick J.A., Froehlich H.* Treatment of cyanide poisoning// *Mil. Med.* — 1991. — 156, № 7. — P.330-339.
44. *Bhattacharya R.* Therapeutic efficacy of sodium nitrite and 4-dimethylaminophenol or hydroxylamine co-administration against cyanide poisoning in rats// *Hum. Exp. Toxicol.*-1995. — 14, № 1. — P. 29-33.
45. Antidotes for poisoning by cyanide// *IPCS/CEC Evaluation of antidotes series.* — vol. 2. www.intox.org/databank/documents/antidote/antidote/ant02.htm — 461k
46. *Проданчук Г.Н., Балан Г.М.* Окислительный стресс в формировании гемолитической анемии при токсическом воздействии соединений гидроксиламина (обзор)// *Соврем. пробл. токсикол.* — 2005. — № 1. — С. 4-10.
47. *Voevodskaya N.V., Serezhenkov V.A., Cooper C.E., Kubrina L.N., Vanin A.F.* // *Biochem. J.*— 2002.— 368, N 3.— P. 633-639.

Г.М.Проданчук, С.Г.Шандренко, Т.О.Кішко, М.П.Дмитренко

G.M.Prodanchuk, S.G.Shandrenko, T.O.Kishko, N.P.Dmitrenko

НОВІ АСПЕКТИ МЕХАНІЗМУ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ ГІДРОКСИЛАМІНУ

NEW ASPECTS OF HYDROXYLAMINE TOXIC ACTION MECHANISM

В дослідках на щурах *in vivo* та *in vitro* із зразками крові, еритроцитів і тимоцитів за допомогою методів ЕПР та фотометричної спектроскопії показано, що при гострому отруєнні гідроксиламіном сульфатом (ГАС) потенційна здатність клітин та тканин організму до утворення NO не реалізується, і він мало причасний до патогенезу отруєння. ГАС утворює міцно зв'язаний аддукт з гемовим залізом, яке спочатку знаходиться в окисленому вигляді (MetHb-ГА), не підлягає дії ціанідів і відновлюючих агентів, зокрема, метиленового синього. MetHb-ГА з часом самотійно відновлюється без руйнування аддукту. За ЕПР-спектральними характеристиками новоутворений комплекс відновленого заліза (Fe²⁺) з ГА аддуктом повністю ідентичний нітрозильному, який утворюється при взаємодії гемоглобіну з NO і його донорами але різниться дуже високою стабільністю при зберіганні, рН 2-10, в розчині 10М сечовини та ін. умовах. Наявність міцного аддукту ГА з залізом (у вигляді Fe³⁺ і Fe²⁺) в еритроцитах позбавляє їх кисневотранспортної функції і призводить до стійких метаболічних та структурних змін, в результаті яких клітини розпізнаються організмом як дефектні, виводяться з кров'яного руслу та утилізуються. Отримані результати слід враховувати при розробці методів профілактики лікування отруєнь ГА.

In *in vivo* and *in vitro* experiments with rats, blood samples, erythrocytes, thymocytes, using EPR and optical spectroscopic methods it has been revealed, that cells and tissues potential ability to form nitric oxide under hydroxylamine (HA) intoxication is not realized and NO is not implicated in a pathogenesis of the intoxication. HA forms a fast combined adduct with a heme iron, which at the first stage exists in a ferric state (metHb-HA) and unavailable for actions of cyanide, reducing agents, such as methylene blue. Then the heme iron is reduced without adduct destruction. The new formed complex (Hb+2-HA) has an identical EPR-signal with nitrosyl complex Hb-NO but differs from Hb-NO with high stability under longtime storage, pH 2-10, 10M urea. HA adduct presence hinders from Hb oxytransport function and lead to steady methabolical and structural changes which result in an identification of the erythrocytes as imperfect ones. Then the erythrocytes are removed from a blood course and utilized. It is necessary to take into account the obtained results for development of HA intoxication prophylaxis and treatment methods