

ДОСЛІДЖЕННЯ КІНЕТИКИ УТВОРЕННЯ МЕТГЕМОГЛОБІНУ ЗА УМОВ ОКРЕМОЇ ТА ОДНОЧАСНОЇ ДІЇ НІТРИТУ І НІТРАТУ НАТРІЮ

Федоренко В.І., Кіцула Л.М., Федоренко Ю.В.

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів, Україна

Анотація. В експериментальних дослідженнях на статевозрілих білих щурах за умов однократної окремої та одночасної дії нітриту і нітрату натрію у різних їхніх співвідношеннях за середньо смертельними дозами встановлено, що кінетика утворення метгемоглобіну в крові істотно відрізняється. Нітрит натрію призводить до стрімкого зростання і повільного зниження концентрації метгемоглобіну, нітрат натрію викликає повільне утворення метгемоглобіну в крові і значно нижчий максимальний ефект. Утворення метгемоглобіну в крові при одночасній дії речовин залежить від їхнього співвідношення. Збільшення у суміші частки нітриту натрію підвищує концентрацію метгемоглобіну в крові і призводить до незалежної дії виникнення ефекту, характер внеску частки нітрату натрію до розвитку ефекту залежить від тривалості одночасної дії речовин. Особливості кінетики концентрації метгемоглобіну свідчать про неоднозначність ролі гемічної і гістотоксичної гіпоксії в патогенезі гострих отруєнь нітритами і нітратами.

Ключові слова: *нітрат натрію, нітрит натрію, метгемоглобін, концентрація, кінетика, окрема та одночасна дія.*

Вступ. Метгемоглобін (MtHb) – одна із форм гемоглобіну, у якому гемове залізо є тривалентне, метгемоглобінемія – стан, коли концентрація MtHb в еритроцитах перевищує 1% - 2% (фізіологічний рівень для дітей – 1,1%) від загальної кількості гемоглобіну. В організмі людини постійно відбувається утворення та відновлення метгемоглобіну. Утворення метгемоглобіну є одним із захисних механізмів знешкодження нітратів, нітритів, та інших речовин, які мають нітрогрупу, у разі надходження їх в організм за умов гранично допустимих кількостей. Метгемоглобінемії виникають за умов перевищення швидкості утворення MtHb в еритроцитах порівняно з швидкістю оберненої реакції перетворення його до гемоглобіну. Розрізняють вроджені та набуті метгемоглобінемії. Набуті метгемоглобінемії виникають унаслідок дії різних ксенобіотиків: прямих (органічних і неорганічних сполук, що містять нітрогрупи, які безпосередньо окиснюють залізо гемоглобіну) і непрямих метгемоглобіноутворювачів, до яких належать токсичні хімічні речовини, у т.ч. важкі метали, лікарські препарати тощо. Поряд з цим відомо, що MtHb може утворюватися в крові при різних захворюваннях дихальних шляхів, виразковій хворобі шлунка і 12-ти палої кишки, лейкемії, гастроентеритах вірусної та бактеріальної природи тощо. Клінічно виражені метгемоглобінемії виникають за умов дії високих доз нітратів чи нітритів. Тривале

надходження навіть низьких концентрацій може викликати безсимптомну метгемоглобінемію, яка є небезпечною для здоров'я дітей, оскільки викликає гемічну і гістотоксичну гіпоксію. Метгемоглобінемії у дітей передусім пов'язують з надходженням нітратів і нітритів з водою та продуктами харчування. Нітрати малотоксичні і в організмі під впливом кишкової мікрофлори вони відновлюються до нітритів, які є токсичні, і одним із основних механізмів їхньої токсичної дії і є перетворення гемоглобіну в MtHb [1-5].

Уперше ця реакція описана А. Гамжи 1868 р., пізніше різними авторами доповнювалася проміжними етапами та проміжними продуктами окиснення цієї складної реакції [6]. Після надходження у кров іони NO^{2-} проникають через еритроцитарну мембрану і реагують з гемоглобіном. Відбувається окисно-відновна реакція, за якої дезоксигемоглобін окиснюється до MtHb, аніони NO^{2-} відновлюються до NO: $\text{Hb}^{2+} + \text{NO}^{2-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{MtHb} + \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$, при цьому NO утворює стабільні комплекси Hb-NO. MtHb не здатен до зворотної реакції з киснем. Двовалентне залізо в молекулі гемоглобіну окиснюється до тривалентного. Утворення MtHb залежить від віку, дози нітратів (нітритів), тривалості і швидкості надходження в організм та елімінації.

Найбільш чутливі до нітратів і нітритів діти, передусім першого року життя. Це, зокрема зумовлено: 1) слабкою активністю метгемоглобінредуктази; 2) наявністю фетального гемоглобіну, який швидше окиснюється до MtHb; 3) вживанням більшої кількості рідини на одиницю маси тіла, порівняно з дорослими; 4) зниженою кислотністю шлункового соку, що своєю чергою, сприяє розвитку мікроорганізмів, ферменти яких каталізують процеси відновлення нітратів до нітритів. Вікову чутливість до дії нітратів підтверджують експериментальні дослідження. У токсикологічних дослідженнях також встановлено, що токсичність для білих щурів віком 14 днів є вищою у 6 разів, порівняно з статевозрілими, зі збільшенням віку тварин зменшується утворення концентрації метгемоглобіну [7]. Хоча є дані, що у дітей віком 12-15 років утворення MtHb у 2-2,5 рази є вищим порівняно з дітьми віком 7-12 років за однакових умов надходження нітратів з водою [4]. Поряд з цим дія нітриту і нітрату натрію на кінетику утворення MtHb у крові не вивчалася.

Мета дослідження. Дослідити кінетику концентрації MtHb у крові експериментальних тварин за умов однократного окремого й одночасного надходження нітриту натрію (NaNO_2) і нітрату натрію (NaNO_3).

Матеріали та методи досліджень. Досліди проведені на 168 статевозрілих білих щурах – самках (NaNO_3 токсичніший для самок, стосовно NaNO_2 відмінностей у токсичності для самок і самців не виявлено). Тварини отримували віварний корм, у якому концентрація нітратів знаходилася на рівні 150 мг/кг, концентрація нітритів - 5 мг/кг, що не мало нітратного й нітритного навантаження на організм тварин, у питній воді концентрація речовин

знаходилася на порядок нижче, ніж їхні ГДК. Проведено три серії дослідів. У першій серії групі тварин вводили водні розчини NaNO_2 у дозі 100 мг/кг маси тіла (0,55 ЛД₅₀ середньо смертельної дози) і концентрацію МтНб у крові визначали через 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 і 24 години після введення. У другій серії дослідів тваринам вводили водні розчини NaNO_3 у дозі 4800 мг/кг маси тіла (0,75 ЛД₅₀), МтНб визначали через 1, 2, 4, 8, 12 і 24 години після введення. Третя серія дослідів присвячена вивченню кінетики МтНб у крові через 1, 4 і 24 години після введення суміші NaNO_2 і NaNO_3 у співвідношенні 1:1 за 0,5ЛД₅₀, і через 1 і 4 години після дії суміші речовин 0,55 ЛД₅₀ NaNO_2 та змінних доз NaNO_3 – 0,75, 0,33, 0,04, 0,017 і 0,01 ЛД₅₀. Концентрацію МтНб у крові (у % від загального гемоглобіну) визначали за методом Кушаковського М. С. [8]. Для опису залежностей "час – концентрація МтНб у крові" використовували методи кінетики ферментативного каталізу в присутності інгібіторів і методи токсикокінетики [9,10].

Результати та їх обговорення. Кінетика МтНб у крові за умов окремого введення NaNO_2 і NaNO_3 мала суттєві відмінності. Концентрація МтНб у крові у терміни через 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 і 24 години після від введення NaNO_2 становила (%) $28,2 \pm 1,9$; $54,5 \pm 3,1$; $49,2 \pm 2,7$; $45,0 \pm 2,2$; $42,9 \pm 4,1$; $32,8 \pm 1,9$; $13,7 \pm 0,7$, за введення NaNO_3 $11,9 \pm 0,7$; $19,8 \pm 1,1$; $28,4 \pm 1,5$; $25,6 \pm 1,7$; $19,9 \pm 2,0$ і $13,0 \pm 0,8$ % (контрольна величина $2,2 \pm 0,4$ %). Дія нітриту натрію призвела до швидкого утворення і відповідно зростання концентрації МтНб і повільного зниження концентрації МтНб. Час максимуму ефекту (t_{\max}) склав менше, ніж 0,5 години, при цьому максимальний ефект = 50%, період півзниження Т концентрації МтНб у крові становив 11,4 години. При ентеральному надходженні речовин період півзниження ефекту є складовою частиною сумарного часу існування ефекту $T_c = t_{\max} + T$, T_c і складає близько або дорівнює 11,9 години. Дія NaNO_3 зростає повільно і концентрація МтНб є значно нижчою, час максимуму ефекту становив 5,2 години, максимальний ефект 25,3 %, період півзниження Т концентрації МтНб у крові – 15,4 години, $T_c = 20,6$ годин. Додамо, що концентрація МтНб у крові за умов дії 0,75 ЛД₅₀ NaNO_3 у 2 рази є нижчою, ніж за умов дії 0,55 ЛД₅₀ NaNO_2 .

За умов одночасного надходження NaNO_2 і NaNO_3 у співвідношенні 1:1 за ЛД₅₀ (по 0,5 ЛД₅₀) через 1 годину концентрація МтНб (%) становила $24,6 \pm 2,1$ %, через 4 години – $44,8 \pm 3,2$ %, наприкінці доби знизилася до $15,9 \pm 1,6$ % порівняно з контролем $1,9 \pm 0,2$ %. За кінетичною кривою з урахуванням експериментальних точок через 1, 4 і 24 години максимальне значення ефекту складає 55,09 % і відображає внесок NaNO_2 , $T = 13,3$ годин, $T_c = 17,3$ годин. Збільшення частки NaNO_3 (0,75 ЛД₅₀) практично не вплинуло на концентрацію МтНб у крові $25,0 \pm 1,9$ % через годину і $43,2 \pm 3,7$ % через 4 години порівняно з ефектом суміші у співвідношенні 1 : 1 за ЛД₅₀.

Концентрації МтНб (%) у крові при дії NaNO_2 у суміші з іншими дозами NaNO_3 через годину виявилися наступні: $36,5 \pm 2,7$; $48,1 \pm 2,8$; $41,6 \pm 3,2$ і $50,9 \pm 4,1$, відповідно через 4 години $-38,0 \pm 2,6$; $40,2 \pm 3,9$; $28,2 \pm 1,9$ і $36,2 \pm 3,4$ (контроль $1,9 \pm 0,2$). Отже, отримані результати свідчать, що утворення МтНб у крові при одночасній дії речовин залежить від їхнього співвідношення. Зниження частки NaNO_3 у суміші призвело до збільшення утворення рівня МтНб і чим меншою є частка NaNO_3 , тим більший відсоток утворення МтНб. Збільшення частки NaNO_2 у суміші за масою призводить до його незалежної дії у процесі утворення МтНб. Такий процес можна описати за допомогою рівняння регресії, яке отримано за ортогональним планом 2^2 [11], використовуючи при цьому показники концентрації МтНб за умов окремої дії речовин та їхньої одночасної дії у суміші у дозах 100 мг/кг і 4800 мг/кг маси тіла відповідно на першій і четвертій годині дослідження. Рівняння регресії наступні: $y = 22,0 + 15,1x_1 - 3,6x_2 - 8,5x_1x_2$ (1 година), $y = 29,1 + 13,9x_1 + 6,7x_2 - 6,5x_1x_2$ (4 години), де $y = E$ (ефект, %), x_1 і x_2 - коди доз NaNO_2 і NaNO_3 відповідно. Величину контрольного рівня прийнято за 2 % МтНб. Коефіцієнти у рівняннях регресії свідчать про зростання концентрації МтНб за умов збільшення частки дози NaNO_2 , характер внеску частки дози NaNO_3 залежить від терміну дії суміші, взаємодія речовин призводить до зниження утворення МтНб в обидва терміни спостереження. Зі зменшенням масової частки NaNO_3 до 74,3 % - 41,6 % у рівняннях мають значення лише коефіцієнти, що пов'язані з NaNO_2 , тобто $15,1x_1$ і $13,9x_1$, що характеризують незалежну дію NaNO_2 .

Відомо, що в механізмі дії нітриту натрію задіяні ланцюги утворення МтНб унаслідок швидкого окиснення гемоглобіну іоном NO_2^- (радикалом NO_2) і відносно повільної взаємодії HbO_2 з H_2O_2 , утворення NO і нітрозильних комплексів гемового і негемового заліза у крові і тканинах, утворення супероксидного аніон-радикала O_2^- й інших радикальних метаболітів з наступною пероксидацією ліпідів і гальмуванням ферментів антиоксидантного захисту. У патогенезі гострої інтоксикації NaNO_2 передусім визначальним є стрімкий розвиток гемічної гіпоксії, потім виникають гістотоксична гіпоксія, мембранотоксична дія радикалів і їхня взаємодія з сульфгідрильними групами білків [6,12]. За умов дії нітрату натрію необхідно також урахувати його нижчу токсичність, ніж нітриту натрію, і повільне утворення МтНб у крові. Імовірно, реалізація токсичності NaNO_3 може бути пов'язана з більшою патогенетичною значимістю повільних реакцій на фоні високого навантаження натрієм, що викликає підвищення осмотичного тиску і порушення функції калій-натрієвого насоса іонного гомеостазу. Переважання нітрату, імовірно, акцентує роль радикальнонатрієвого механізму і порушення клітинного дихання, а переважання нітриту - роль чистого метгемоглобіноутворення.

Висновки. Дія NaNO_2 призводить до швидкого зростання і повільного зниження концентрації метгемоглобіну. Надходження NaNO_3 викликає значно менший ефект, ніж NaNO_2 , сам ефект зростає повільно. За умов одночасної дії нітрату і нітриту натрію концентрація метгемоглобіну у крові підвищується зі збільшенням у суміші частки NaNO_2 , характер внеску частки NaNO_3 до розвитку ефекту залежить від тривалості дії, збільшення частки NaNO_2 у суміші призводить до його незалежної дії у процесі утворення MtHb . Особливості кінетики концентрації метгемоглобіну у крові свідчать про неоднозначність ролі гемічної і гістотоксичної гіпоксії у патогенезі гострих отруень нітритами і нітратами.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Avery A. A. Infantile Methemoglobinemia: Reexamining the Role of Drinking Water Nitrates. *Environmental Health Perspectives*. 1999. V. 107. № 7. P. 583–586.
2. Fewtrell L. Drinking-water nitrate, methemoglobinemia, and global burden of disease: a discussion. *Environmental Health Perspectives*. 2004. V. 112. №14. P. 1371-1374.
3. Гигиенические критерии состояния окружающей среды. 5. Нитраты, нитриты и N-нитрозосоединения. Женева: ВОЗ, 1981. 246 с.
4. Горішна О. В. Особливості перебігу гострої та хронічної нітратної інтоксикації у віковому аспекті. *Проблеми педіатрії на сучасному етапі*: Матеріали 10-го з'їзду педіатрів України. К., 1999. С. 162-163.
5. Смоляр В. І., Петрашенко Г. І. Особливості отруєння нітратами у дітей. *Проблеми харчування*. 2012. № 3-4. С. 45-48.
6. Ажипа Я. И., Реутов В. П., Каюшин Л. П. Экологические и медико-биологические аспекты проблемы загрязнения окружающей среды нитратами и нитритами. *Физиология человека*. 1990. Т.16. № 3. С.131-149.
7. Янчук В. В., Власик Л. І. Вікові особливості розвитку хроноконцентраційного ефекту під впливом смертельних доз натрію нітрату та свинцю ацетату. *Современные проблемы токсикологии*. 2001. № 4. С. 37-39.
8. Кушаковский М. С. Клинические формы повреждения гемоглобина. Л.: Медицина, 1968. 323 с.
9. Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма: Пер. с англ. М.: Мир, 1966. - 882 с.
10. Штабский Б. М. Модели в токсикологии. *Вестник Академии медицинский наук СССР*. 1991. №2. С.12-16.
11. Сова Р. Е. Использование математической теории эксперимента при оценке комбинированного действия химических веществ. *Гигиена и санитария*. 1984. №1. С. 39-41.
12. Шугалей И. В., Целинский И. В., Малинина Т. В. О токсическом действии нитрита натрия. *Гигиена и санитария*. 1991. №4. С. 49-53.

REFERENCES

1. Avery A. A. Infantile Methemoglobinemia: Reexamining the Role of Drinking Water Nitrates. *Environmental Health Perspectives*. 1999;107(7):583–586.
2. Fewtrell L. Drinking-water nitrate, methemoglobinemia, and global burden of disease: a discussion. *Environmental Health Perspectives*. 2004;11 (14): 1371-1374.
3. Gigienicheskie kriterii sostoyaniya okruzhaiushchei sredy № 5. Nitraty, nitrity i N-nitrosoedineniya [Hygienic Criteria of the Environment State № 5. Nitrates, Nitrites, and N-NitrosoCompounds]. Geneva: WHO; 1981: 246 s. Russian
4. Horishna O.V. Osoblyvosti perebihu hostroi ta khronichnoi nitratnoi intoksykatsii u vikovomu aspekti. Problemy pediatrii na suchasnomu etapi: materialy 10-ho zizdu pediatrii Ukrainy [*Problems of Pediatrics at Present Stage: Materials of the 10th Congress of the Pediatricians of Ukraine*]. Kyiv, 1999:162-163. Ukrainian.
5. Smoliar V. I., Petrashenko H. I. Osoblyvosti otruiennia nitratamy u ditei [Features of nitrate poisoning in children]. *Problemy kharchuvannia*. 2012; 3-4:45-48. Ukrainian.
6. Azhipa Ya. I., Reutov V. P., Kayushin L. P. Ekologicheskiye i mediko-biologicheskiye aspekty problemy zagryazneniya okruzhayushchey sredy nitratami i nitritami. [Ecological and medico-biological aspects of the problem of environmental pollution by nitrates and nitrites]. *Fiziologiya cheloveka*. 1990; 16 (3):131-149. Russian.
7. Ianchuk V. V., Vlasyk L. I. Vikovi osoblyvosti rozvytku khronokontsentratsiinoho efektu pid vplyvom smertelnykh doz natriu nitratu ta svyntsiu atsetatu. [Age features of development of chronoconcentration effect under the influence of lethal doses of sodium nitrate and lead acetate]. *Sovremennye problemy toksykolohyi*. 2001; 4: 37-39. Ukrainian.
8. Kushakovskii M. S. Klinicheskie formy povrezhdeniia gemoglobina. [Clinical Forms of Hemoglobin Injuries]. Leningrad: Medicina; 1968: 323 p. Russian.
9. Ueb L. Inhibitory fermentov i metabolizma [Inhibitors of enzymes and metabolism]. Per. s angl. M.: Mir. 1966: 882 p. Russian.
10. Shtabskyi B. M. Modely v toksykolohy. [Models in toxicology]. *Vestnyk Akademiyi medytsynskiy nauk SSSR*. 1991;2:12-16. Russian.
11. Sova R. E. Ispolzovaniye matematicheskoy teorii eksperimenta pri otsenke kombinirovannogo deystviya khimicheskikh veshchestv. [Use of the mathematical theory of experiment at an estimation of the combined action of chemical substances]. *Gigiyena i sanitariya*. 1984;1:39-41. Russian.
12. Shugaley I. V., Tselinskiy I. V., Malinina T. V. O toksicheskom deystvii nitrata natriya. [On the toxic effects of sodium nitrite]. *Gigiyena i sanitariya*. 1991;4:49-53. Russian.

**RESEARCH OF KINETICS OF METHEMOGLOBIN FORMATION UNDER
CONDITIONS OF SEPARATE AND COMBINED ACTION
OF SODIUM NITRITE AND NITRATE**

Fedorenko V. I., Kitsula L. M., Fedorenko Yu. V.

Abstract. The effect of NaNO₂ is rapid growth and slow decrease in methemoglobin concentration, NaNO₃ is slow formation of methemoglobin in the blood and much lower maximum effect. The increase in the mixture of sodium nitrite increases the concentration of methemoglobin in the blood and leads to an independent effect, the nature of the contribution of sodium nitrate to the development of the effect depends on the duration of the combined action of substances. Peculiarities of methemoglobin concentration kinetics indicate ambiguity of the role of hemic and histotoxic hypoxia in the pathogenesis of acute sodium nitrite and nitrate poisoning.

Key words: *sodium nitrate, sodium nitrite, methemoglobin, kinetics, separate and combined action.*

Федоренко Віра Іларіонівна ORCID ID 0000-0001-8979-8351, +380674184892,

Inmu.fedorenkov.i@gmail.com

Кіцула Л.М. ORCID ID 0000-0003-4529-5749

Федоренко Ю. В. ORCID ID 0000-0002-8394-0326