

Erythrotoxicity of aliphatic hydroxylamines : mechanic aspects and parameters for biological effect monitoring

Citation for published version (APA):

Spooren, A. A. M. G. (2000). *Erythrotoxicity of aliphatic hydroxylamines : mechanic aspects and parameters for biological effect monitoring*. UM.

Document status and date:

Published: 01/01/2000

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Chapter 9

Summary

The working environment will always present the risk of workers' overexposure to various chemicals. It is self-evident that the control of these risks cannot wait until epidemiological studies have defined the no-adverse-effect level directly in man. However, extrapolation from animal data has its limitations. A combination of experimental studies on animals and/or human tissue and surveillance studies on workers is more effective to evaluate the potential risks of industrial chemicals. This thesis illustrates how integration of these two approaches helps to accomplish an acceptable situation for workers in a production facility for one of the studied hydroxylamines (i.e. O-methyl hydroxylamine).

The toxic potency of six industrially used hydroxylamines was studied in human blood cells *in vitro* in *chapter 2 and 3*. The parent compound hydroxylamine and the O-ethyl and O-methyl derivative gave very similar results. All three compounds induced methemoglobin, leading to liberation of free radicals which cause lipid peroxidation, inhibition of glutathion S-transferase (GST) and NADPH methemoglobin reductase (MHbR), and depletion of glutathion (GSH). Other enzyme activities like glutathion reductase (GR) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) were not or only slightly impaired by hydroxylamine, O-ethyl hydroxylamine or O-methyl hydroxylamine. Hydroxylamine and O-ethyl hydroxylamine had also no effect on the glucose phosphate isomerase and NADH methemoglobin reductase activity. By contrast, a different scheme of reactivity was found for N,O-dimethyl hydroxylamine and N-methyl hydroxylamine, two single N-substituted derivatives of hydroxylamine. These compounds gave much less methemoglobin formation, lipid peroxidation was not detectable and GST and MHbR activity was not decreased. On the other hand GR and G6PDH activities were inhibited. These results indicate the existence of two different routes of hematotoxicity induced by hydroxylamines. Hydroxylamine as well as its O-derivatives primarily induce methemoglobin, a process involving radical formation. The radical stress occurring is probably responsible for most other effects. N-derivatives like N,O-dimethyl and N-methyl hydroxylamine primarily lead to inhibition of the protective enzymes G6PDH and GR. In other words, the oxidative potency of hydroxylamine and its O-derivatives is larger than the potency of single N-substituted derivatives. This indicates that the attachment of an alkyl group to the nitrogen atom of hydroxylamine leads to decreased reactivity. However, N-dimethyl hydroxylamine, a double N-substituted compound, caused a strikingly different scheme of reactivity: inhibition of G6PDH but not of GR, severe methemoglobin formation, only little lipid peroxidation and some impairment of MHbR but not of GST. These results for N-dimethyl hydroxylamine indicate that a simple classification in O-derivatives and N-derivatives of hydroxylamine is too simplistic and that this classification has to be extended for double N-substituted compounds which give a mixture of effects.

In *chapter 4* the effects of hydroxylamines on the enzymatic antioxidant defence system in human erythrocytes was investigated. The activity of catalase and superoxide dismutase was not significantly decreased by any of the six hydroxylamines tested. However, the activity of glutathion peroxidase (GPX) was strongly inhibited by hydroxylamine itself and its O-derivatives (O-methyl and O-ethyl hydroxylamine). GPX was also inhibited by N-dimethyl and N,O-dimethyl hydroxylamine. GST activity was decreased by hydroxylamine, O-methyl, and O-ethyl hydroxylamine (as was also seen in *chapter 2* and *3*). This activity loss of GST and GPX is likely to involve oxidation of critical cysteine residues, since GST as well as GPX have cysteine residues at the active site of the enzymes. These cysteine residues are susceptible to formation of protein-mixed disulphides or intramolecular disulphides which can lead to an increase or decrease in the enzyme activity. In principle this is also true for GR, which in this study was only inhibited by the single N-substituted hydroxylamines (i.e. N-methyl and N,O-methyl hydroxylamine). However, GR is capable to reduce these disulphides by taking up two electrons, either from its substrate NADPH or from another reductant. In other words, the activity loss of GR, induced by single N-substituted hydroxylamines, must probably be explained by other modifications than oxidation of cysteine residues. The practical consequence of these findings is that the cellular prooxidant state that may arise in erythrocytes exposed to hydroxylamines can be further increased by activity loss of protective enzymes, which may decrease the average life span of the red blood cell.

The effect of hydroxylamine on the morphology, sulfhydryl status and membrane skeletal protein of human erythrocytes were studied in *chapter 5*. A large amount of intracellular GSH was lost and this loss was not compensated by increases in intracellular oxidised glutathion (GSSG) or extracellular total glutathion. This extracellular glutathion was mainly oxidised which is in agreement with the fact that only GSSG is exported from the erythrocytes. These results indicated that the GSH that disappeared did not become available as intracellular GSSG. After reduction of the erythrocyte incubates the lost GSH was almost completely recovered indicating that the lost GSH is present in the cell as protein-glutathion mixed disulphides. Under favourable conditions this stored GSH can be quickly recovered by thioltransferase and GR activity. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of membrane ghosts from human red cells revealed changes in skeletal proteins with a smearing of bands 1, 2 and 3 to the higher molecular weight end of the gel and the appearance of new monomeric and dimeric hemoglobin monomers. Hydroxylamine induced severe Heinz body formation but the outside morphology of the red cell was only marginally altered. Therefore, it is concluded that the described changes in the sulphhydryl status of erythrocytes are likely to play a major role in the premature splenic sequestration of hydroxylamine-damaged red cells.

The hemoglobin dependence of the toxicity, the occurrence of cell damaging products like superoxide and hydrogen peroxide, and the cellular kinetics of hydroxylamine analogues is investigated in *chapter 6* to elucidate the difference in toxicity profiles. All hydroxylamine

were found to depend on the presence and accessibility of oxyhemoglobin to exert their toxicity. This did not provide an explanation for the different toxicity profiles. It is known that radical intermediates are formed in the reaction with hydroxylamines and oxyhemoglobin. Differences in the stability of these radical products are known to occur and this can contribute to the difference in toxicity. In this respect production of superoxide radicals was demonstrated for all hydroxylamines in the reaction with oxyhemoglobin. Evidence for hydrogen peroxide generation during the reaction of hydroxylamine, O-methyl, O-ethyl and N-dimethyl hydroxylamine with oxyhemoglobin was also found. Next to variations in the products formed, difference in cellular kinetics is likely to be among the most important factors that can explain the different toxicity patterns seen for the hydroxylamines in erythrocytes. Beside the fact that the final methemoglobin level in erythrocytes after exposure to N-derivatives is much lower, the reaction rate with oxyhemoglobin was also slower than with hydroxylamine and its O-derivatives. The same pattern was also seen in hemolysates, except for N,O-dimethyl hydroxylamine which tripled its effects on hemoglobin. This latter effect implies that cellular uptake is a limiting factor for N,O-dimethyl hydroxylamine. Altogether, this indicates that: (1) the toxicity of all hydroxylamines depends on an interaction with oxyhemoglobin, (2) the interaction with hemoglobin produces radical intermediates and concomitant superoxide radicals and hydrogen peroxide, and (3) differences in uptake, reaction rate with hemoglobin and stability of the intermediates formed do exist for the different hydroxylamines and contribute to their differences in toxicity.

In the last chapter (*chapter 7*) an integrated strategy was adopted to prevent risks related to O-methyl hydroxylamine exposure in a recently started O-methyl hydroxylamine production facility. The pre-opening phase consisted of a toxicological evaluation of available data for two structurally related compounds, hydroxylamine and O-ethyl hydroxylamine. Considering the structure analogy, we assumed that the main toxicity hazard for O-methyl hydroxylamine would also be erythrotoxicity and that the potency of O-methyl hydroxylamine would be about equal to that of hydroxylamine and O-ethyl hydroxylamine. This was confirmed by the marginal data on toxicity of O-methyl hydroxylamine itself present in the literature and the *in vitro* studies carried out in the previous chapters. Based on these data an advised maximum exposure level for O-methyl hydroxylamine was set at 0.1 ppm. This phase also consisted of development of a production design that would minimise exposure risk and adoption of a lay-out of work regulations that would almost exclude exposure. In the check phase environmental and biochemical effect monitoring was performed which showed that the O-methyl exposure was clearly below the level of 0.1 ppm and no detectable adverse biochemical effects, related to O-methyl hydroxylamine, were found. As such, it was concluded that the strategy used ensures an acceptable situation for workers exposed to O-methyl hydroxylamine.

Altogether, it can be concluded that the described studies give an insight into mechanistic aspects of hydroxylamine induced adverse effects in man, and illustrate the value of *in vitro* techniques in hazard assessment for structurally related compounds.

Hoofdstuk 10

Samenvatting

In de arbeidsomgeving kunnen werknemers langdurig blootgesteld worden aan verschillende chemicaliën. Het is duidelijk dat men voor het in de hand houden van deze risico's niet kan wachten tot dat epidemiologische studies een 'no-adverse-effect level' in de mens hebben gedefinieerd. Extrapolatie van dierexperimentele gegevens naar de mens heeft echter ook zijn beperkingen. Een combinatie van experimenteel onderzoek bij dieren en/of weefsels van mensen en monitoringstudies bij werknemers op de arbeidsplek is een effectievere manier om de potentiële gevaren van industriële chemicaliën te evalueren. Dit proefschrift laat zien hoe integratie van deze twee benaderingen kan leiden tot het tot stand komen van een acceptabele situatie voor werknemers in een productie-faciliteit van een van de geteste hydroxylamines (O-methyl hydroxylamine).

In hoofdstuk 2 en 3 werd de toxische potentie van zes industrieel gebruikte hydroxylamines *in vitro* bestudeerd in humane rode bloedcellen. De moederstof hydroxylamine (HYAM) en de O-ethyl en O-methyl derivaten gaven overeenkomende effecten. Alle drie de stoffen zorgen voor de vorming van methemoglobine, hetgeen leidt tot het vrijkomen van vrije radicalen die vervolgens lipide peroxidatie, afname van glutathion (GSH) en remming van NADPH methemoglobine reductase (MHbR) en glutathion S-transferase (GST) veroorzaken. Andere enzym activiteiten zoals glutathion reductase (GR) en glucose 6-fosfaat dehydrogenase (G6PDH) werden niet of nauwelijks geremd door HYAM, O-methyl hydroxylamine (OMH) en O-ethyl hydroxylamine (OEH). HYAM en OEH hadden evenmin een effect op de glucose isomerase en NADH methemoglobine reductase activiteit. In tegenstelling tot HYAM, OEH en OMH vertoonden N,O-dimethyl hydroxylamine (NODMH) en N-methyl hydroxylamine (NMH), twee enkel N-gesubstitueerde verbindingen, een geheel ander patroon van reactiviteit. Deze verbindingen veroorzaakten aanzienlijk minder methemoglobine vorming, nauwelijks lipide peroxidatie, en in het geheel geen GST of NADPH MHbR activiteit remming. Wel bleken deze verbindingen een remmend effect te hebben op de GR en G6PDH activiteit. De resultaten van deze studies wijzen erop dat twee verschillende routes bestaan aangaande de hematotoxiciteit van hydroxylamines. HYAM en de O-derivaten induceren voornamelijk methemoglobine, een proces waarbij radicalen betrokken zijn. Deze radicalen zijn hoogstwaarschijnlijk verantwoordelijk voor alle andere effecten die optreden in de rode bloedcel. Daarentegen veroorzaken NODMH en NMH met name remming van de beschermende enzymen G6PDH en GR. Met andere woorden, de oxidatieve potentie van HYAM en de O-derivaten is groter dan de potentie van de enkel N-gesubstitueerde derivaten. Dit impliceert dat de reactiviteit van hydroxylamines blijkt af te nemen wanneer er een alkyl groep gebonden zit aan het stikstof atoom. De aanwezigheid van een alkyl groep aan het zuurstof atoom heeft geen invloed op de oxidatieve potentie van

de hydroxylamines (OEH en OMH). N-dimethyl hydroxylamine (NDMH), een dubbel N-gesubstitueerde verbinding, vertoonde echter een geheel ander patroon van reactiviteit: remming van G6PDH maar niet van GR, sterke methemoglobine vorming en remming van NADPH MHbR activiteit maar bijna geen lipide peroxidatie, GST activiteit remming en glutathion afname. De effecten van NDMH geven dan ook aan dat de structuur-activiteitsrelatie niet zo makkelijk is als men in eerste instantie zou verwachten op basis van de eenvoudige structuren. Indeling van hydroxylamines in O-derivaten en N-derivaten is dus niet zonder meer mogelijk en deze indeling moet uitgebreid worden met dubbel N-gesubstitueerde verbindingen.

In hoofdstuk 4 werd het effect van de verschillende hydroxylamines op de antioxidant enzymen in de rode bloedcel bestudeerd. Alle zes de hydroxylamines hadden geen invloed op de activiteit van superoxide dismutase (SOD) en catalase. Alle hydroxylamines behalve NMH remden het enzym glutathion peroxidase (GPX). De GST activiteit werd geremd door HYAM, OEH en OMH (zoals ook al eerder aangetoond in hfdst 2 en 3). Aangezien zowel GST als GPX een cysteine-thiol groep bezitten die essentieel is voor de enzymactiviteit, is het zeer waarschijnlijk dat oxidatie van deze kritische cysteine groepen verantwoordelijk is voor het verloren gaan van de enzymactiviteit na blootstelling aan hydroxylamines. Deze cysteine groepen zijn gevoelig voor vorming van eiwitbruggen en intramoleculaire disulfide bruggen, hetgeen in principe kan leiden tot remming of verhoging van de enzym activiteit. GR bezit ook cysteine groepen. Remming van deze groepen zal echter nooit leiden tot remming van de activiteit van GR omdat dit enzym in staat is om elektronen op te nemen van NADPH of een andere reductor om de eventuele gevormde disulfide bruggen te reduceren. Desondanks, is de activiteit van GR geremd door NMH en NODMH. Deze remming is dan ook alleen te verklaren door andere modificaties aan het enzym. De praktische consequentie van deze bevindingen is dat naast een toename in oxidatieve stress door blootstelling aan hydroxylamines ook de activiteit van de glutathion afhankelijke enzymen GPX, GST en GR geremd wordt. Dit zal uiteindelijk leiden tot een cellulair pro-oxidant situatie wat de levensduur van de rode bloedcel in gevaar zal brengen.

De effecten van HYAM op de sulfhydryl status, morfologie en membraanewitten van humane rode bloedcellen werd bestudeerd in hoofdstuk 5. Verlies van gereduceerd glutathion concentraties was proportioneel aan de gebruikte HYAM concentratie. Dit verlies was groter dan de som van de toename in extracellulair glutathion en het intracellulaire geoxideerde glutathion (GSSG). Het extracellulair glutathion was voornamelijk aanwezig als GSSG hetgeen in overeenstemming is met het feit dat alleen GSSG geëxporteerd wordt door de rode bloedcel. Deze resultaten indiceerden dat het verdwenen glutathion in de rode bloedcel niet geheel uit de cel getransporteerd werd en ook niet beschikbaar kwam als intracellulair geoxideerd glutathion. Na reductie van de hydroxylamine behandelde rode bloedcellen werd het "verdwenen" glutathion bijna geheel teruggevonden. Dit duidt op vorming van glutathion-eiwitbruggen, ook wel aangeduid met mixed-disulfides. Aangezien

GSSG toxisch is voor de rode bloedcel, is opslag van GSSG als mixed-disulfides gunstig voor de cel. Door de vorming van glutathion-eiwitbruggen kan de rode bloedcel, wanneer de condities weer gunstig zijn, snel en gemakkelijk de glutathion concentraties op peil brengen met behulp van thiol transferases en GR.

De SDS-polyacrylamide gel elektroforese patronen van membraan eiwitten van rode bloedcellen laten een smearing van de banden 1 en 2 (spectrine-ankyrine regio; MW ca 250 kD) en band 3 (MW 90 kD) zien en het ontstaan van nieuwe mono- en dimeren hemoglobine banden op ongeveer 16 en 30 kD. Blootstelling aan HYAM veroorzaakte Heinz Bodies en hemolyse, maar de morfologie van de rode bloedcel werd maar marginaal veranderd. Concluderend kan dan ook gesteld worden dat de beschreven veranderingen op de sulfhydryl status in de rode bloedcel een rol spelen bij de vroegtijdige verwijdering van de door hydroxylamine beschadigde cel door de milt.

Om meer inzicht te krijgen in de verschillende toxiciteitsprofielen van hydroxylamine analogen werd de hemoglobine-afhankelijkheid, het ontstaan van celbeschadigende producten zoals waterstofperoxide en superoxide, en de cellulaire kinetiek van de hydroxylamines bestudeerd in hoofdstuk 6. Alle hydroxylamines bleken afhankelijk te zijn van oxyhemoglobine om hun toxiciteit uit te oefenen. Hemoglobine-afhankelijkheid is dus geen verklaring voor het optreden van de verschillende toxiciteitsprofielen van hydroxylamines.

In eerder onderzoek is aangetoond dat radicaal-tussenproducten gevormd worden in de reactie met hydroxylamines en hemoglobine. Deze radicaal-tussenproducten zijn niet allemaal hetzelfde en verschillen in stabiliteit, hetgeen een belangrijke factor kan zijn voor de verschillende toxische effecten aangetoond in rode bloedcellen na blootstelling aan de verschillende hydroxylamines. Verschillen in de productie van vrije radicalen zoals superoxide en waterstofperoxide kan een andere verklaring zijn voor de verschillende toxiciteitsprofielen van de hydroxylamine analogen. Superoxide radicalen werden aangetoond bij de reactie van oxyhemoglobine met alle hydroxylamine analogen. Waterstofperoxide werd in ieder geval aangetoond in rode bloedcel incubaties met HYAM, OMH, OEH en NDMH.

Verschillen in de cellulaire kinetiek –opname en de reactie met oxyhemoglobine– is waarschijnlijk de meest belangrijke factor om de verschillende toxische profielen van hydroxylamines te verklaren. Bij de N-derivaten werd niet alleen aangetoond dat het uiteindelijke gehalte aan methemoglobine lager is maar de reactie snelheid met oxyhemoglobine is ook langzamer dan met HYAM en zijn O-derivaten. Dit zelfde patroon was ook te zien in hemolysaten, behalve voor NODMH dat een verdrievoudigd effect te zien gaf in hemolysaten ten opzichte van rode bloedcellen. Dit betekent dat cellulaire opname een beperkende factor is voor NODMH. Concluderend kan gesteld worden dat: (1) alle hydroxylamines afhankelijk zijn van oxyhemoglobine om hun toxiciteit uit te oefenen, (2) de

interactie met oxyhemoglobine radicaal-tussenproducten produceert en tegelijkertijd ook superoxide radicalen en waterstofperoxide, en (3) verschillen in cellulaire opname, in de reactie snelheid met oxyhemoglobine en in de stabiliteit van de gevormde radicalen optreden bij de verschillende hydroxylamines en dat deze aspecten mede zullen leiden tot de uiteindelijke verschillen in de hydroxylamine toxiciteitsprofielen.

In het laatste hoofdstuk (hoofdstuk 7) is een geïntegreerde strategie gebruikt om risico's, gerelateerd aan OMH blootstelling in een recent opgestarte OMH productie faciliteit, te voorkomen. De pre-start fase bestond uit een toxicologische evaluatie van beschikbare gegevens van twee structuur-ervante analogen, HYAM en OEH. Op basis van de structuuranalogie werd aangenomen dat het belangrijkste toxische gevaar van OMH toxische effecten op de rode bloedcel zouden zijn en dat de potentie van OMH vergelijkbaar is met HYAM en OEH. Dit werd bevestigd door de marginale toxische gegevens die voorhanden zijn in de literatuur over OMH zelf en de uitgevoerde *in vitro* studies zoals beschreven in de voorgaande hoofdstukken. Op basis van deze gegevens werd voorgesteld de maximale blootstellingconcentratie van OMH vast te stellen op 0,1 ppm. Deze fase bestond eveneens uit het ontwikkelen van een productie plan waarbij de blootstelling tot een minimum werd beperkt en het opzetten van werkvoorschriften die blootstelling bijna uitsluiten. In de check-fase werd omgevings- en biologische effect monitoring uitgevoerd. Deze monitoringstechnieken toonden aan dat de blootstellingconcentratie van OMH beduidend lager was dan 0,1 ppm en dat geen detecteerbare biochemische effecten, gerelateerd aan OMH, werden aangetoond. Geconcludeerd werd dan ook dat de gevolgde strategie een acceptabele situatie verzekerde voor werknemers in de OMH fabriek.

Samenvattend, kan geconcludeerd worden dat de beschreven studies een inzicht geven in de mechanistische aspecten van hydroxylamine-geïnduceerde toxische effecten in de mens, en bovendien laten zien wat de waarde van *in vitro* technieken bij 'hazard' karakterisering kan zijn.