

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

## ЭПР-АНАЛИЗ КОЛИЧЕСТВА НИТРОКСИДА В ЭПИДЕРМИСЕ НА ФОНЕ ПРИЕМА МИЛДРОНАТА: СВЯЗЬ С УРОВНЕМ СЫВОРОТОЧНОГО ФЕРРИТИНА

**В.И. Петухов<sup>1\*</sup>, Л.Х. Баумане<sup>2</sup>, И.Я. Калвиньш<sup>2</sup>, М.А. Романова<sup>1</sup>,  
Е.Я. Быкова<sup>3</sup>, Л.Р. Хемий<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Владимирский государственный университет, г. Владимир, Россия

<sup>2</sup> Латвийский институт органического синтеза, г. Рига, Латвия

<sup>3</sup> Рижский центр репродукции, г. Рига, Латвия

**РЕЗЮМЕ.** Представлены результаты количественной оценки содержания оксида азота (NO) в деривате эпидермиса (волосы) у 34 добровольцев (4 мужчин и 30 женщин в возрасте от 19 до 78 лет) на фоне приема милдроната. Измерения проводили с помощью метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) с применением (в качестве «ловушки») диэтилтиокарбамата (ДЭТК) *in vitro*. У 116 человек (32 мужчины и 84 женщины в возрасте 17–78 лет) был сделан анализ корреляционной связи (Pearson) между интенсивностью NO-радикального сигнала на спектрограмме и уровнем сывороточного ферритина (как критерия обеспеченности организма железом). Обнаружено, что приём милдроната приводил у практически здоровых людей к достоверному увеличению высоты NO-пика на ЭПР-спектрограмме. При этом высота NO-пика положительно коррелировала с уровнем сывороточного ферритина.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** оксид азота (NO), ЭПР-спектроскопия, милдронат, Fe-дефицит.

### ВВЕДЕНИЕ

Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) с использованием эпидермиса (волосы) в качестве субстрата, а также диэтилтиокарбамата (ДЭТК) как ловушки для NO – *in vitro*, который применялся в предыдущих исследованиях (Petukhov et al., 2013), показал свою пригодность для количественной оценки уровня нитроксида. Поэтому мы воспользовались этой методикой при измерении уровня NO у здоровых лиц, получавших *милдронат* [3-(2,2,2-trimethylhydrazinium) propionate, 3-[(trimethylazaniumyl)amino]propionate] на протяжении двух месяцев.

Несмотря на значительное количество сообщений о позитивном влиянии милдроната на адаптивную способность различных систем организма (в первую очередь, сердечно-сосудистой), механизм действия этого препарата вряд ли можно считать окончательно расшифрованным. Наиболее хорошо изучено адаптивное влияние милдроната на энергетический метаболизм, которое осуществляется путем снижения концентрации карнитина в организме человека и животных (Dambrova et al., 2016). Биосинтез карнитина подавляется путем конкурентного ингиби-

рования *гамма*-бутиробетаин-гидроксилазы. Взаимодействуя с транспортером карнитина и органических катионов (OCTN2), милдронат одновременно снижает и эффективность реабсорбции карнитина из мочи (Dambrova et al., 2016). Вслед за этим уменьшается концентрация активированных транспортных форм жирных кислот – длинноцепочных ацилкарнитинов и происходит активация альтернативного пути производства энергии – аэробного гликолиза. Показано также, что милдронат снижает уровень триметиламин-оксида (одного из метаболитов карнитина, который является одним из про-атерогенных факторов) (Dambrova et al., 2016).

Тем не менее вышеприведенные механизмы не объясняют быстрых эффектов милдроната. Так, на модели скрещивания кровообращения у собак было показано, что милдронат обладает прямым хронотропным и инотропным эффектом (Chiba et al., 1989). Одним из авторов было показано, что милдронат является трансрегулятором адренергических и пуринергических рецепторов (Хейдеманис et al., 1988; Kagan et al., 1991). Позднее было обнаружено, что милдронат является прямым  $\beta_2$ -адреносенсибилизатором

\* Адрес для переписки:

**Петухов Валерий Иванович**

E-mail: vip-val@yandex.ru

(Циркин и др., 2002; Циркин и др., 2004). К быстрым эффектам милдроната относится также его влияние на тонус и контрактильную активность матки (Павлова и др., 2001), что послужило основанием для его внедрения в акушерскую практику с целью устранения дискоординации родовой деятельности (Павлова и др., 2001; Котайш, 2003).

Более подробного анализа заслуживает взаимоотношение милдроната с продукцией NO в клетке. Результаты опубликованных работ по этой проблеме были получены преимущественно в условиях эксперимента (Orapina et al., 2001; Sjakste et al., 2004; Pokrovskii et al., 2009), в то время как в клинических наблюдениях продукция оксида азота оценивалась с помощью непрямых методов исследования (Воронков и др., 2008).

Кроме того, практически не изучена возможная связь NO-продукции (и/или биодоступности NO) с обеспеченностью организма железом (Fe). Хотя вероятность такой зависимости логично вытекает из современного представления о функционирующей в клетке трёхкомпонентной системе (NO, свободные тиолы, негемовое Fe) как главного и постоянного источника монооксида азота, точнее, его наиболее реактогенных форм: ионов нитрозония ( $\text{NO}^+$ ) и нитроксила ( $\text{NO}^-$ ) [14].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под наблюдением находилось 116 человек (32 мужчины и 84 женщины) в возрасте 17–78 лет (медиана – 20 лет), большинство из них (93 чел.) – студенты университета (г. Владимир). Милдронат получали 34 добровольца (4 мужчин и 30 женщин в возрасте от 19 до 78 лет), которые были информированы о действии милдроната и дали своё согласие на проведение исследований.

Получение образца эпидермальных клеток для ЭПР-спектроскопии, которое также происходило с обязательного добровольного согласия исследуемых, сводилось к следующему. В затылочной области непосредственно у кожи волосистой части головы отрезали пучок волос (длиной 2 см и толщиной 0,5 см) и помещали его в инсулиновый шприц с раствором ДЭТК (40 мг ДЭТК на 0,4 мл физиологического раствора), присутствие которого способствует образованию парамагнитных мононитрозильных комплексов железа (МНКЖ). Образец инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем замораживали в жидком азоте при температуре  $-196^\circ\text{C}$ . После замораживания столбики с биосубстратом извлекали из шприца и помещали в кварцевый сосуд Дьюара с жидким азотом в резонаторе

ЭПР-спектрометра (Radiopan, Польша). Типичный сигнал МНКЖ-ДЭТК, регистрируемый при температуре  $-196^\circ\text{C}$ , характеризуется значениями g-фактора  $g_{\parallel} = 2,02$  и  $g_{\perp} = 2,035$  с триплетной сверхтонкой структурой (СТС). По интенсивности третьей (высокопольной) компоненты определяли в образце количество NO радикалов. Результат выражали в условных единицах (u) в расчёте на 1 г субстрата [1].

У всех испытуемых исследовали кровь (общий анализ) и уровень ферритина в сыворотке. Для измерения сывороточного ферритина использовали стандартный метод (ELISA).

Статистический анализ проводили с помощью стандартных пакетов компьютерных статистических программ Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общая группа из 116 человек была разделена на две части: в меньшую (34 чел.) – вошли добровольцы, которые принимали милдронат *per os* в суточной дозе 500 мг; а в большую (82 чел.) – испытуемые, не получавшие препарат. Уровень гемоглобина (Hb) в общей группе колебался от 93 до 178 г/л (в среднем – 133, 8 г/л), содержание ферритина в сыворотке – от 0,6 до 231 нг/мл (в среднем – 33,5 нг/мл). Другие показатели гемограммы (количество эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов) были в пределах нормы.

Среди испытуемых, не получавших милдронат (82 чел.), уровень сывороточного ферритина был от 0,6 до 94,2 нг/мл (в среднем – 25,8 нг/мл). У 72 человек (87,8%) в этой группе были выявлены железодефицитные состояния (ЖДС), в том числе у 12 человек (14,6%) – железодефицитная анемия (ЖДА), у 60 (73,2%) – латентный дефицит железа (ЛДЖ), у 10 испытуемых (12,2%) отклонений от нормы не обнаружено.

Среди принимавших милдронат колебания уровня ферритина наблюдались в диапазоне от 1,8 до 231 нг/мл (в среднем – 56,4 нг/мл), у 8 из 34 человек (23,5%) был диагностирован ЛДЖ. У остальных 26 человек (76,5%) гематологические показатели оказались в пределах нормы.

Динамика уровня NO в эпидермисе на фоне приема милдроната (ЭПР-анализ) представлена в таблице. Поясним, как распределялись испытуемые по группам.

Исходный уровень ЭПР-сигнала NO (до приема милдроната) – 1-я группа. Во 2-ю группу вошли 18 человек после одной недели приёма капсул милдроната (500 мг в день), которые продолжали его получать на протяжении 4–8 недель от начала приема. У восьми из них взяты образ-

цы волос для ЭПР-анализа в конце четвёртой недели (7 чел.) и восьмой недели (1 чел.) приема препарата. Эти 8 человек и еще 16 испытуемых, у которых первичный забор образцов был сделан по прошествии четырех (10 чел.) и восьми недель (6 чел.) от начала приема милдроната, вошли в 3-ю группу. Из испытуемых 2-й и 3-й групп была составлена 4-я группа.

Как следует из таблицы, уже семидневный прием милдроната (500 мг/день) приводит к достоверному ( $p < 0,05$ ) увеличению ЭПР-сигнала нитроксида по сравнению с исходным уровнем (1-я группа). Однако достоверность этого увеличения на 4–8-й неделе приема (3-я группа) подтвердить не удалось ( $p = 0,08$ ). Вместе с тем средняя величина NO-сигнала на ЭПР-спектрограмме за весь период наблюдения (1–8 недель) – 4-я группа – достоверно превышала исходное значение (таблица).

Полученные результаты подтверждают стимулирующий NO-продукцию эффект милдроната, обнаруженный ранее в экспериментах на крысах методом ЭПР-анализа с введением ДЭТК в качестве ловушки для нитроксильного радикала *in vivo* (Sjakste et al., 2004). Авторы исключают прямое воздействие милдроната на синтез NO конститутивными синтазами (eNOS и nNOS), но допускают его опосредованный (рецептор-зависимый) характер.

Оставляя в стороне возможные механизмы NO-стимулирующего действия милдроната, обсудим следующее.

Заслуживает внимания не только сам факт повышения уровня монооксида азота в эпидермисе (на фоне милдроната), но и довольно короткий период (всего 7 дней), в течение которого удается обнаружить этот эффект. Другими словами, при использовании деривата эпидермиса

*Таблица. Динамика величины ЭПР-сигнала нитроксида в клетках эпидермиса на фоне приема милдроната,  $M \pm m$*

Группа	Величина ЭПР-сигнала в условных единицах (u)
1-я (до приема), $n=34$	$26,7 \pm 2,9^*$
2-я (1-я неделя), $n=18$	$38,5 \pm 6,1^*$
3-я (4–8 недель), $n=24$	$32,7 \pm 3,1$
4-я (1–8 недель), $n=42$	$35,2 \pm 3,1^*$

Примечание: \* – достоверность различия средней ( $p < 0,05$ ) в группах по сравнению с исходным уровнем (1-я группа).

(волосы) в качестве биосубстрата сдвиги в гомеостазе эпидермальных клеток можно, по видимому, наблюдать в текущем (реальном) времени. Хорошо известно, что скорость роста человеческого волоса не превышает 0,2 мм в сутки, поэтому взятые в первые несколько дней пробы волос практически идентичны. В этом отношении представляет интерес количественный ЭПР-анализ содержания NO в эпидермисе, начиная с первого дня приема милдроната, что может стать предметом предстоящих исследований.

Для того чтобы выяснить, как связаны между собой интенсивность ЭПР-сигнала нитроксида и обеспеченность организма железом (которую оценивали наряду с другими клиническими признаками по уровню сывороточного ферритина), был сделан анализ возможных линейных корреляций (Pearson) между этими параметрами. Результаты анализа уровня ферритина и интенсивности ЭПР-сигнала нитроксида в группе «здоровые +ЖДС» ( $n = 116$ ) следующие:

Уровень ферритина в сыворотке крови, нг/мл ( $M \pm m$ ) .....  $33,5 \pm 3,7$   
Средняя высота NO-пика, и ( $M \pm m$ ) .....  $20,5 \pm 1,2$   
Корреляция (Pearson) между NO и уровнем ферритина,  $r$  ( $n=116$ ) .....  $0,57$  ( $p < 0,05$ )

Как свидетельствуют представленные данные, величина NO-пика на ЭПР-грамме имеет линейную позитивную зависимость от обеспеченности организма железом (критерий Fe-обеспеченности – уровень сывороточного ферритина). Этот факт был обнаружен нами ранее при меньшем количестве наблюдений ( $n = 50$ ) и несколько меньшем значении коэффициента  $r$  ( $r = 0,49$ ;  $p < 0,05$ ) (Petukhov et al., 2013). Показательно, что увеличение размера выборки в данном случае привело к возрастанию  $r$ , что может служить дополнительным подтверждением достоверности этой линейной связи.

Как уже говорилось, существование зависимости NO-продукции от уровня железа в организме (и, очевидно, в самой клетке) вполне согласуется с представлением о трехкомпонентной биосистеме (NO + свободные тиолы + негемовое железо) (Vanin, 2016). В рамках этой системы постоянно синтезируются S-нитрозотиолы и динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами (ДНКЖ), причем как в моноядерной (по железу)  $[(RS)_2Fe(NO)_2]$  – М-ДНКЖ, так и в биядерной  $[(RS)_2Fe_2(NO)_4]$  форме – Б-ДНКЖ. Одним из главных условий нормального функционирования этой системы, где в режиме автоколебаний (по типу реакции

Белоусова–Жаботинского) происходит постоянная взаимотрансформация ДНКЖ и S-нитрозолинов (RS-NO), является обязательное пополнение ее необходимыми компонентами взамен израсходованных, в первую очередь, NO и внутриклеточного Fe (при наличии в достаточном количестве в клетке доноров SH-групп). Поэтому в условиях Fe-дефицита мы вправе ожидать снижения численности автоколебательных систем и уменьшения плотности их распределения в цитоплазме, что, очевидно, не может не повлиять на биодоступность NO.

Согласно современным представлениям, RS-NO↔ДНКЖ-осцилляторы в ходе взаимопревращений RS-NO и ДНКЖ способны генерировать наиболее реактогенные формы NO – ионы нитрозония (NO<sup>+</sup>) и нитроксила (NO<sup>-</sup> или HNO), обладающие заметно большим сроком существования по сравнению с монооксидом азота (напомним, что срок жизни NO<sup>•</sup> радикала измеряется миллисекундами). В результате создаются условия для стабильного (долговременного) функционирования короткоживущей молекулы-радикала NO в качестве универсального менеджера (Vanin, 2016).

Кроме того, требуют обсуждения возможные варианты существования в клетке RS-NO↔ДНКЖ-осцилляторов. Дело в том, что, обладая способностью к автоколебаниям, эти системы при достижении определенной (пороговой) плотности в цитоплазме должны упорядочить (синхронизировать) свои колебания или, по терминологии теории самоорганизованной критичности (Вак, 1996), *критически самоорганизоваться*, перейти в *критическое состояние*. Одним из признаков последнего является величина так называемого *параметра ветвления* (branching parameter)  $\sigma$ , равного среднему числу ближайших соседей, которым каждый из осцилляторов передает возбуждающий импульс. В критическом состоянии  $\sigma = 1$ . Наряду с критическим, выделяют *докритическое* ( $\sigma < 1$ ) и *надкритическое* ( $\sigma > 1$ ) состояния (или режимы самоорганизации). Добавим, что синхронизация является разновидностью (частным случаем) критического состояния.

Синхронный (критический) режим функционирования RS-NO↔ДНКЖ-систем имеет важное значение и явные преимущества перед до- и надкритическими режимами в трансмембранном трафике ионов электрогенных металлов (в первую очередь, Ca<sup>2+</sup>), поскольку синхронизированная, бесперебойная продукция NO<sup>+</sup> и HNO в условиях критического режима обеспечивает необходимую для нормальной работы активацию АТФаз за счет нитрозилирования SH-групп ци-

стеина в молекулах этих белков. Кроме того, в условиях критического состояния возможен контроль над поступлением и выходом из клетки ионов электрогенных металлов, который необходим для соблюдения (в допустимых пределах) динамического баланса между этими параметрами. Это может быть вполне реальным хотя бы потому, что в роли активаторов мембранных помп (для входа и выхода металлов), принадлежащих одному семейству АТФаз (P-type), оказываются продуценты автоколебательных RS-NO↔ДНКЖ-систем – ионы нитрозония и нитроксила. Единственное условие, которое непременно должно соблюдаться в работе этих систем, – их критическое состояние. Заметим, что синхронное («залповое») появление Ca<sup>2+</sup> в гиалоплазме («кальциевые спарки»), которое удалось обнаружить с помощью конфокальной микроскопии (Pinsky et al., 1997), хорошо иллюстрирует такую возможность.

Докритический ( $\sigma < 1$ ) режим работы RS-NO↔ДНКЖ-осцилляторов наиболее вероятен для ЖДС и ситуаций с недостаточным синтезом NO конститутивными NO-синтазами (cNOS). При этом нельзя исключить, что дефицит NO<sup>+</sup> и HNO, который здесь вполне ожидаем, может помешать полноценной активации (нитрозилированию) мембранных АТФаз. Это неминуемо приведет к сдвигам в гомеостазе электрогенных металлов на уровне клетки и к возможным клиническим проявлениям этих сдвигов.

Например, нарушение кальциевого гомеостаза в миоците, независимо от «специализации» этой клетки (кардиомиоцит, гладкие мышцы сосудов и полых органов, скелетная мускулатура), может вести к «сбоям» в трансмембранном трафике Ca<sup>2+</sup>: недостаточному восполнению депо Ca<sup>2+</sup> в саркоплазматическом ретикулуме (СР) и связанному с этим сокращению выхода Ca<sup>2+</sup> в цитозоль. Как результат – снижение сократительной способности мышечной ткани. Экспериментально доказано, что милдронат влияет на обмен кальция как в изолированных клетках (Хейдеманис et al., 1990), так и в СР кардиомиоцитов (Hayashi et al., 2000), что можно объяснить вышеупомянутым механизмом.

В клинической картине ЖДС нарушение сократительной способности миоцитов носит универсальный характер (не зависит от типа мускулатуры). Известно, что слабость сфинктеров и скелетных мышц – патогномичный симптом Fe-дефицитной анемии. У этих же больных можно наблюдать ухудшение не только коронарного кровотока (как следствие нарушенной перистальтики коронарных сосудов), но и сократительной функции миокарда, а также ослабление

тонуса и перистальтических сокращений полых мышечных органов.

Кажется не случайным, что уже через 4–5 дней после начала терапии препаратами Fe (срок слишком короткий для восстановления эритропоэза, но, по-видимому, достаточный для перехода системы RS-NO↔ДНКЖ из докритического в критическое состояние) заметно уменьшается количество приступов стенокардии у больных ЖДА.

Надокритическое состояние ( $\sigma > 1$ ), в котором могут оказаться работающие RS-NO↔ДНКЖ-осцилляторы, скорее всего, связано с резким возрастанием NO-продукции при сверхактивации индуцибельной NOS (iNOS), например, при сепсисе и всех видах шока.

В качестве еще одного подтверждения возможного участия самоорганизованной критичности в биодоступности NO могут служить следующие клинические наблюдения.

Кардиологам (вот уже более 10 лет) удается купировать ангиальный синдром у больных с коронарной недостаточностью без дополнительного (за счет нитратов) введения нитроксида. Это оказалось возможным при использовании в клинике электромагнитных колебаний терагерцевого диапазона (от 100 ГГц до 10 ТГц) на частотах молекулярного спектра нитроксида [19]. По мнению авторов, купирование болевого синдрома, скорее всего, связано с повышением дееспособности NO за счет удлинения срока его активной посреднической деятельности. Нельзя исключить, что терагерцевые волны могут способствовать синхронизации автоколебаний (NO<sup>+</sup>/NO<sup>-</sup>)-генерирующих осцилляторов, т.е. переходу системы из докритического в критическое состояние.

## ВЫВОДЫ

1. Прием милдроната *per os* в дозе 500 мг в день приводил у практически здоровых людей к достоверному увеличению высоты NO-пика на спектрограмме при ЭПР-анализе клеток эпидермиса (волосы).
2. Сравнительно короткий срок (7 дней от начала приема препарата), в течение которого удается обнаружить указанные изменения, может свидетельствовать о возможности применения данного биосубстрата (волосы) для ЭПР-анализа уровня нитроксида в эпидермисе практически в текущем (реальном) времени.
3. Высота NO-пика на ЭПР-спектрограмме достоверно ( $p < 0,05$ ) и позитивно коррелирует (Pearson) с уровнем сывороточного ферри-

тина (критерий обеспеченности организма железом).

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

Воронков Л.Г., Шкурат И.А., Луцак Е.А. Влияние милдроната на эндотелийзависимую вазодилатацию у больных хронической сердечной недостаточностью: двойное слепое перекрестное исследование. Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2008. № 2. С. 38–40.

(Vorontkov L.G., Shkurat I.A., Lutsak E.A. [Mildronate effect on endothelium-dependent vasodilation in patients with chronic heart failure: double blind crossover study]. Rational Pharmacotherapy in Cardiology. 2008, 2:38–40 [in Russ]).

Котайш Г.А. Эффективность прогноза и комплексного лечения дискоординации родовой деятельности. Автореф. дисс. канд. мед. наук. М., 2003.

(Kotajsh G.A. [Effectiveness of prognosis and complex treatment at discoordination of labor]. PhD Thesis Abstract. Moscow, 2003 [in Russ]).

Павлова Н.Г., Кривцова Е.Н., Константинова Н.Н. Применение препарата милдронат в акушерстве. Журнал акушерства и женских болезней. 2001. Т. 50. № 4. С. 29–33.

(Pavlova N.G., Krivtsova E.N., Konstantinova N.N. [Application of mildronate in obstetrics]. Journal of Obstetrics and Women's Diseases. 2001, 50(4):29–33 [in Russ]).

Хейдеманис К., Балцере А., Белянина Т. / В кн. Экспериментальная биология. Литовская академия наук. 1990, 2:176–177.

Hejdemanis K., Balcere A., Beljanina T. In: Eksperimentine Biologija, Lietuvos Mokslu Akademija. 1990, 2:176–177.

Хейдеманис К.К., Аузиня И.О., Калвиньш И.Я. Актуальные проблемы диагностики и лечения эндокринных заболеваний. Тезисы докладов симпозиума Латвийского науч. об-ва эндокринологов. Рига, 1988. С. 160–161.

(Hejdemanis K.K., Auzinja I.O., Kalvin'sh I.Ya. [Actual problems of diagnosis and treatment of endocrine diseases]. Tezisy dokladov simpoziuma Latvijaskogo nauch. ob-va jendokrinologov. Riga, 1988. 160–161 [in Russ]).

Циркин В.И., Сизова Е.Н., Подтетнев А.Д., Братчикова Т.В., Анисимова О.В., Трухин А.Н., Дворянский С.А. Триметазидин и милдронат как бета2-адреносенсибилизаторы прямого действия (экспериментальные доказательства). Российский кардиологический журнал. 2002. Т. 1. № 33. С. 45–52.

(Tsirkin V.I., Sizova E.N., Podtetenev A.D., Bratchikova T.V., Anisimova O.V., Trukhin A.N., Dvoryanskiy S.A. [Trimetazidine and mildronate as beta2-adrenosensitizers of direct action (experimental evidence)]. Russian Journal of Cardiology. 2002, 1(33):45–52 [in Russ]).

Циркин В.И., Сизова Е.Н., Туманова Т.В., Сазонов А.В. Влияние ряда лекарственных веществ на р-адрено- и м-холинореактивность миометрия крысы. Вятский медицинский вестник. 2004. № 1. С. 25–29.

(Tsirkin V.I., Sizova E.N., Tumanova T.V., Sazonov A.V. [Influence of a number of drugs on p-adreno- and m-cholinoreactivity of rat myometrium]. Vyatskiy medicinskiy vestnik. 2004, 1:25–29 [in Russ]).

- Bak P. How Nature Works. Copernicus, New York, 1996.
- Chiba S., Akahane K., Furukawa Y., Karasawa Y. Direct chronotropic and inotropic effects of mildronate using cross-circulated dog atrial and ventricular preparations. *Japanese Heart J.* 1989, 30(5):743–750.
- Dambrova M., Makrecka-Kuka M., Vilskersts R., Makarova E., Kuka J., Liepinsh E. Pharmacological effects of meldonium: biochemical mechanisms and biomarkers of cardiometabolic activity. *Pharmacol Res.* 2016, 113(Part B): 771–780.
- Hayashi Y., Ishida H., Hoshiai M., et al. MET-88, a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor, improves cardiac SR Ca<sup>2+</sup> uptake activity in rats with congestive heart failure following myocardial infarction. *Mol. Cell Biochem.* 2000, 209(1–2):39–46.
- Kagan T., Priedēna I., Sjakste N., Kalviņš I., Lukevics E. Pharmacology of novel centrally and peripherally acting drugs. *Abstr Meet Est, Latv, Lith Pharmacologists.* Riga: Inst of Organic Synthesis, Latv Acad Sci., 1991. P. 35–36.
- Oparina T.I., Krivtsova E.I., Pavlova N.G., Blyudzin Y.A. *Advances in Gerontology.* 2001, 6:64.
- Parshina S.S., Afanasjeva T.N., Tupikin V.D., et al. / In book: *New Information Technology in Medicine, Pharmacology, Biology and Ecology*, IT+M&Ec Press. Yalta-Gurzuf, 2013. P. 112–115.
- Petukhov V.I., Baumane L., Zvagule T.Y., Reste E.D., Romanova M.A., Shushkevich N.I., Sushkova L.T., Skavronsky S.V., Shchukov A.N. Diagnosis of nitrosative stress by quantitative EPR-spectrometry of epidermal cells. *Bull Exp Biol Med.* 2013, 154(6):734–736.
- Pinsky, D.J., Patton, S., Mesaros, S., Brovkovich V, Kubaszewski E, Grunfeld S, Malinski T. Mechanical transduction of nitric oxide synthesis in the beating heart. *Circ Res.* 1997, 81:372–379.
- Pokrovsky, M.V., Kochkarov, V.I., Pokrovskaya, T.G. et al. Comparative study of potential endothelioprotectors and impaza in modeled nitric oxide deficiency. *Bull Exp Biol Med* 2009, 148(3):514–517.
- Sjakste N., Kleschyov A.L., Boucher J-L., Baumane L., Dzintare M., Meirena D., Sjakste J., Lauberte L., Sydow K., Münzel T., Kalvins I. Endothelium- and Nitric Oxide – Dependent Vasorelaxing Activities of Gamma-Butyrobetaine Esters: Possible Link to the Anti-Ischemic Activities of Mildronate. *Eur J Pharmacol.* 2004, 495:67–73.
- Vanin A.F. Nitric Oxide. *Biol Chem.* 2016, 54:5–29.

## EPR QUANTIFICATION OF NITROXIDE IN EPIDERMIS ON THE BACKGROUND OF MILDRONATE TAKING: CORRELATION WITH SERUM FERRITIN LEVEL

**V.I. Petukhov<sup>1</sup>, L. Baumane<sup>2</sup>, I. Kalvinsh<sup>2</sup>, M.A. Romanova<sup>1</sup>, E. Bykova<sup>3</sup>, L. Hemij<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Vladimir State University, Gorky str., 87, Vladimir, 600000, Russia

<sup>2</sup> Latvian Institute of Organic Synthesis, Aizkuraukles str., 21, Riga, LV1006, Latvia

<sup>3</sup> Riga Reproduction Centre, Antonijas str. 8, 1. st., Riga, LV1010, Latvia

**ABSTRACT.** The article reports on the results of a quantitative estimation of nitric oxide (NO) level in the derivatives of epidermis (hair) in 34 volunteers (4 men and 30 women aged 19 to 78 years) while taking Mildronate. Measurements were made by the Electron Paramagnetic Resonance (EPR) method using diethylthiocarbamate (DETC) *in vitro* (as a «trap»). For 116 subjects (32 males and 84 females aged 17 to 78), we analysed the correlation (Pearson) between the NO-radical signal intensity on the spectrogram and the serum ferritin level (as a body iron level criterion).

It was found that Mildronate administration resulted in a significant increase of NO-peak height on the EPR spectrogram in apparently healthy subjects. The NO-peak height showed positive correlation with the serum ferritin level.

**KEYWORDS:** nitric oxide (NO), EPR spectroscopy, Mildronate, Fe deficiency.