

## Влияние антиоксиданта на основе янтарной кислоты на превращение метгемоглобина в оксигемоглобин *in vitro*

А. М. Черныш<sup>1,2</sup>, Е. К. Козлова<sup>1,2</sup>, В. В. Мороз<sup>1</sup>, В. А. Сергунова<sup>1</sup>,  
О. Е. Гудкова<sup>1</sup>, Е. А. Манченко<sup>1,2</sup>, А. П. Козлов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии,  
Россия, 107031, Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России,  
Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

## Effects of Succinate-Based Antioxidant on *in vitro* Conversion of Methemoglobin in Oxyhemoglobin

Alexander M. Chernysh<sup>1,2</sup>, Elena K. Kozlova<sup>1,2</sup>, Victor V. Moroz<sup>1</sup>, Victoria A. Sergunova<sup>1</sup>,  
Olga E. Gudkova<sup>1</sup>, Ekaterina A. Manchenko<sup>1,2</sup>, Alexander P. Kozlov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,  
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation  
25 Petrovka Str., Build. 2, 107031 Moscow, Russia

<sup>2</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia,  
8 Trubetskaya Str., Build. 2, 119991 Moscow, Russia

**Цель исследования** — показать возможность использования антиоксиданта на основе янтарной кислоты для восстановления метгемоглобина до оксигемоглобина в крови *in vitro*.

**Материалы и методы.** Забор крови в микроветты, содержащие ЭДТА, производили у пяти здоровых доноров при профилактических осмотрах. В кровь *in vitro* добавляли раствор  $\text{NaNO}_2$  для получения метгемоглобина (MetHb). В качестве антиоксиданта использовали комплексный препарат, состоящий из следующих активных компонентов: янтарная кислота, инозин, рибофлавин и никотинамид. Измеряли спектр поглощения суспензий эритроцитов с различным содержанием препарата  $D_t(\lambda_t)_{\text{exper}}$  с шагом 1 нм. Методом нелинейной регрессии рассчитывали концентрации производных гемоглобина в суспензиях.

**Результаты.** В экспериментах, когда метгемоглобин взаимодействовал с препаратом, оптическая плотность пиков, характерных для оксигемоглобина, увеличивалась, а спектральный пик метгемоглобина снижался. Чем больше были концентрация препарата и время инкубации, тем эффективнее был процесс восстановления метгемоглобина до оксигемоглобина.

**Заключение.** Экспериментально доказали, что при начальной концентрации метгемоглобина в крови 91–93% добавление препарата снижает его концентрацию до 25–27%. В то же время, благодаря автовосстановлению, концентрация метгемоглобина уменьшается только до 84%. Показанный эффект может иметь практическое применение при критических состояниях, при хранении донорской крови, при проведении гемотрансфузии, при воздействии физико-химических факторов на кровь.

**Ключевые слова:** эритроциты; метгемоглобин; оксигемоглобин; восстановление; янтарная кислота; инозин; рибофлавин; никотинамид; цитофлавин

**The purpose of the study** — to determine the feasibility of using the succinate-based antioxidant for the *in vitro* reduction of excessive methemoglobin to oxyhemoglobin in blood.

**Materials and Methods.** Blood sampling was performed in five healthy donors in microvettes containing EDTA during prophylactic examinations.  $\text{NaNO}_2$  solution was added to blood samples *in vitro* in order to yield methemoglobin (MetHb). The complex drug containing the following active ingredients: succinic acid, inosine, riboflavin, nicotinamide, was used as an antioxidant. The absorption spectrum of red cell suspensions with different drug content  $D_t(\lambda_t)_{\text{exper}}$  was measured with 1 nm increments. The non-linear regression method was used to calculate concentrations of hemoglobin derivatives in suspensions.

**Results.** In our experiments, when methemoglobin reacted with drug the optical density of peaks typical for oxyhemoglobin increased and the spectral peak of methemoglobin decreased. The greater the concentration of drug, the more was the incubation time, the more efficient was the process of reduction of MetHb to  $\text{HbO}_2$ .

**Conclusion.** We proved experimentally that while the baseline concentration of MetHb was an average of 91–93%, addition of drug decreased its concentration to 25–7%. Without drug, due to autoreduction, the con-

Адрес для корреспонденции:

Александр Черныш  
E-mail: orbf@mail.ru

Correspondence to:

Alexander Chernysh  
E-mail: orbf@mail.ru

centration of MetHb decreases only to 84%. The revealed effect provide a potential for practical applications in critical illness, during the storage of donor blood, in blood transfusions, and under the action of physico-chemical factors on blood.

**Keywords:** red blood cells; methemoglobin; oxyhemoglobin; reduction; succinic acid; inosine; riboflavin; nicotinamide; cytoflavin

DOI:10.15360/1813-9779-2018-2-46-59

## Введение

Эндогенная и экзогенная интоксикация различной природы может вызывать образование активных форм кислорода (АФК) в крови и модифицировать молекулы гемоглобина в эритроцитах. При этом происходят процессы окисления железа  $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$  и превращения молекулы гемоглобина (Hb) и оксигемоглобина ( $HbO_2$ ) в метгемоглобин (MetHb) [1–3]. В нормальном состоянии организм поддерживает биохимическое равновесие, и метгемоглобин в крови человека всегда присутствует в небольших количествах (0,5–1,5%).

Нарушение равновесия между содержанием образующихся АФК и антиоксидантными защитными механизмами клетки может произойти под влиянием различных эндогенных и экзогенных факторов (бактерии, вирусы, химические агенты, ряд препаратов, загрязнение окружающей среды, ионизирующие излучения, травмы, массивные кровотечения и др.) [4–6]. Кроме того, метгемоглобинемия может быть вызвана передозировкой некоторых лекарственных средств (лидокаин, новокаин, противомаларийные препараты и др.), отравлением химическими веществами (анилиновыми красителями, нитратами, хлорбензолом) [7].

При усилении окислительных процессов собственная антиоксидантная система уже не может «справляться» с увеличенным количеством активных форм кислорода и азота и образованием MetHb. Увеличение содержания метгемоглобина выше физиологического уровня приводит к нарушению газообмена. При удельной концентрации MetHb более 30% в жизненно важных органах могут развиваться необратимые изменения [4]. Известно, что для лечения метгемоглобинемии применяется метиленовый синий. Однако он не всегда эффективен и обладает рядом побочных токсических эффектов [4, 5].

Поэтому поиск лекарственных препаратов, способных усилить эффективность антиоксидантной системы эритроцитов и предотвратить образование АФК и MetHb, является актуальным.

Особенный интерес представляют вещества, содержащие природные компоненты. Примером таких препаратов является цитофлавин (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН», Российская Федерация). Его фармакологические эффекты определяются совместным действием, составляющих его ингредиентов: янтарная кислота, инозин, никотинамид, мононуклеотид рибофлавина натрия [8].

## Introduction

Endogenous and exogenous intoxications of various causes may lead to the formation of active forms of oxygen (ROS) in the blood and modify hemoglobin molecules in erythrocytes. At the same time, the oxidation processes  $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$  occurs, and molecules of deoxyhemoglobin (Hb) and oxyhemoglobin ( $HbO_2$ ) are converted to methemoglobin (MetHb) [1–3]. In its normal state, the body maintains a biochemical balance, and methemoglobin is always present in small amounts (0.5–1.5%) in human blood.

The imbalance between the amount of ROS formed and the antioxidant defense mechanisms may occur in cells under the influence of various endogenous and exogenous factors: bacteria, viruses, chemical agents, a number of pharmaceuticals, environmental pollution, ionizing radiations, traumas, massive bleeding, etc. [4–6]. In addition, methemoglobinemia can be caused by an overdose of some drugs (lidocaine, novocaine, antimalarials, etc.) and poisoning with chemicals (aniline dyes, nitrates, chlorobenzene) [7]. With increasing of oxidative processes, own antioxidant system can no longer deal with an increased amount of active forms of oxygen and nitrogen and MetHb formation. If MetHb level is higher than the physiological level, the disturbance of gas exchange occurs, because the oxidized heme is not capable to deliver the oxygen to tissues. At the level of MetHb of more than 30%, irreversible changes in vital organs can develop [4]. It is known that methylene blue is used to treat methemoglobinemia. However, it is not always effective and has a number of toxic side effects [4, 5].

Therefore, the search for drugs that can enhance the effectiveness of the antioxidant system of erythrocytes and prevent the formation of ROS and MetHb is always urgent.

Substances containing natural ingredients are of a special interest. One of such drugs is cytoflavin (STPF «POLISAN», Russian Federation). Cytoflavin as a therapeutic category relates to «a metabolic regulator», pharmacological effects of which is regulated by a combined action of the formulation' ingredients: succinic acid, inosine, nicotinamide, riboflavin mononucleotide sodium [8]. Cytoflavin has been shown to serve as a pharmacological agent capable to aid in enhancing the energy formation, decreasing reactive oxygen species (ROS), activating metabolic processes after ischemia and reoxygenation [9, 10].

The aim of the work is to show the feasibility of using of cytoflavin for *in vitro* reduction of excessive methemoglobin to oxyhemoglobin in blood.

Цитофлавин может стимулировать образование энергии; уменьшать образование АФК; активировать метаболические процессы после ишемии и реоксигенации [9, 10].

Цель работы – показать возможность использования антиоксиданта на основе янтарной кислоты для восстановления метгемоглобина до оксигемоглобина в крови *in vitro*.

## Материал и методы

Кровь (150 мкл) брали в микроветты с ЭДТА (Sarstedt AG and Co., Germany) у пяти доноров во время профилактических скринингов.

Исследование проводили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и было одобрено этическим комитетом Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитации НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского. Согласие было получено от каждого участника до начала исследования.

Параметры гематологии измеряли с помощью гематологического анализатора Advia 60-CT (Bayer, Germany). В исходной крови гематокрит составлял 39–45%, концентрация гемоглобина составляла 110–146 г/л.

Для окисления гемоглобина в крови *in vitro* использовали раствор нитрита натрия  $\text{NaNO}_2$ . Для приготовления базового раствора нитрита натрия (раствор *L*) 1.4 г  $\text{NaNO}_2$  (Sigma–Aldrich Co. LLC) разбавляли в 10 мл фосфатного буфера (PBS), pH=7.4 (MP Biomedicals, USA). Раствор *S* получали разбавлением раствора *L* в 10 раз. Цитофлавин – комплексное лекарственное средство, содержащее активные вещества – янтарная кислота – 100 г, никотинамид – 10 г, рибоксин (инозин) – 20 г, рибофлавина фосфат натрия (рибофлавин) – 2 г, вспомогательные вещества: меглюмин – 165 г, натрия гидроксид – 34 г, вода для инъекций – до 1 литра [8].

Оптическая плотность растворов измерялась с помощью цифрового спектрофотометра Unicо 2800 (USA). Измеряли спектр поглощения  $D_I(\lambda_l)_{exp}$  суспензии эритроцитов в буфере PBS (pH 7,4) в диапазоне длин волн 500–700 нм с шагом 0,5–1 нм. Здесь  $\lambda_l$  – длины волн света, на которых измеряли оптическую плотность, *l* – номер длины волны.

Для нахождения концентраций производных гемоглобина использовали метод Nonlinear Fitting [7, 11–13]. Эмпирический спектр  $D_I(\lambda_l)_{exp}$  аппроксимировали теоретической кривой  $D_I(\lambda_l)_{theor}$ , которая наилучшим способом вписывается в экспериментальную кривую. При аппроксимации учитывали поглощение света разными производными гемоглобина. Одновременно учитывались эффекты ралеевского рассеяния света как на структурах размером  $D \ll \lambda$  (коэффициент *S*), так и на частицах размером  $D \gg \lambda$  (коэффициент *K*):

$$D_I(\lambda_l)_{theor} = \sum_h^n \varepsilon_{h,l}(\lambda_l) C_h L + K + S/\lambda_l^4 \quad (1)$$

Здесь индекс *h* обозначает производные гемоглобина:  $\text{HbO}_2$  (оксигенированный *Hb*), *Hb* (дезоксигенированный *Hb*), *MetHb* (метгемоглобин), *HbNO* (нитрозил железа *Hb*), *MetHbNO*<sub>2</sub><sup>-</sup> (связанный нитритом *MetHb*), *MetHbNO* (трехвалентный нитрозил *Hb*). *L* – это толщина слоя раствора.

Для расчета концентрации производных гемоглобина был использован метод аппроксимации кривой в программе Origin (OriginLab, Northampton, MA). С помощью Function Builder мы создаем функцию  $D_I(\lambda_l)_{theor}$  (уравнение (1)). При этом статус зависимой переменной

## Materials and Methods

The blood samples (150  $\mu\text{l}$ ) were withdrawn from five donors into microvettes with EDTA (Sarstedt AG and Co., Germany) during prophylactic screenings.

The study was performed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and was approved by Ethics Committee of Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, V. A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology. An informed consent was obtained from each participant prior to the study.

Hematology parameters were measured by Hematology Analyzer Advia 60-CT (Bayer, Germany). The baseline hematocrit was 39–45%, the concentration of hemoglobin was 11.0–14.6 g/dl.

For *in vitro* oxidation of hemoglobin in blood, we used sodium nitrite  $\text{NaNO}_2$  solution. To make the sodium nitrite stock solution, 1.4 g of sodium nitrite  $\text{NaNO}_2$  (Sigma–Aldrich Co. LLC) was diluted in 10 ml of phosphate buffer (PBS) pH=7.4 (MP Biomedicals, USA) to form the «solution *L*». The latter was diluted 10 times to obtain the solution *S*. Cytoflavin (STPF «POLISAN», Russian Federation) is a complex drug containing the following active ingredients: succinic acid 100 g, inosine 20 g, nicotinamide 10 g, riboflavin sodium phosphate (riboflavin) 2 g, and the following excipients: meglumine 165 g, sodium hydroxide 34 g, water for injections qs up to 1 liter [8].

The absorbancy of solutions was measured by a digital spectrophotometer Unicо 2800 (USA). The absorption spectra  $D_I(\lambda_l)_{exp}$  of erythrocyte suspension in buffer (PBS pH 7.4) was measured at a wavelength range 500–700 nm with 0.5–1 nm increments. Here  $\lambda_l$  stands for the wavelengths of light for which the absorbancy were measured, and *l* is the number of wavelength.

The Nonlinear Fitting method was used to find the concentrations of hemoglobin derivatives [7, 11–13]. The empirical spectrum  $D_I(\lambda_l)_{exp}$  was approximated by the theoretical curve  $D_I(\lambda_l)_{theor}$  which fits the experimental curve in the best way. Under approximation, the light absorption by different hemoglobin derivatives was considered. The effects of Rayleigh light scattering on structures with size  $D \ll \lambda$  (coefficient *S*) and light scattering on particles with size  $D \gg \lambda$  (coefficient *K*) were taken into account:

$$D_I(\lambda_l)_{theor} = \sum_h^n \varepsilon_{h,l}(\lambda_l) C_h L + K + S/\lambda_l^4 \quad (1)$$

Here, the index *h* stands for hemoglobin derivatives:  $\text{HbO}_2$  (oxygenated hemoglobin), *Hb* (deoxygenated hemoglobin), *MetHb* (methemoglobin), *HbNO* (ferrous nitrosyl hemoglobin), *MetHbNO*<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrite bound methemoglobin), *MetHbNO* (ferric nitrosyl hemoglobin). *L* stands for the thickness of a solution layer.

To calculate the concentration of hemoglobin derivatives, the method of curve approximation was used by means of the Origin software (OriginLab, Northampton, MA). By means of Function Builder, the function  $D_I(\lambda_l)_{theor}$  (equation (1)) was created. In this case, the status of dependent variable was assigned to  $D_I(\lambda_l)_{exp}$ . Parameters of individual absorption at different wavelengths  $\varepsilon_{h,l}(\lambda_l)$  were independent variables [10]. Independent concentrations of  $C_{\text{HbO}_2}$ ,  $C_{\text{Hb}}$ ,  $C_{\text{MetHb}}$ ,  $C_{\text{HbNO}}$ ,  $C_{\text{MetHbNO}_2^-}$ ,  $C_{\text{MetHbNO}}$ , and scattering coefficients *K* and *S* were considered model parameters. These model parameters have been chosen in a manner where the theoretical curve  $D_I(\lambda_l)_{theor}$  describes the experimental data  $D_I(\lambda_l)_{exp}$  the best. In the approximation, the condition that  $C_i \geq 0$  must be satisfied.

был присвоен  $D_i(\lambda_i)_{exp}$ . Индивидуальная поглотительная способность при различных длинах волн  $\epsilon_{Hb}(\lambda_i)$  являлись независимыми переменными [10]. Независимые концентрации  $C_{HbO_2}$ ,  $C_{Hb}$ ,  $C_{MetHb}$ ,  $C_{HbNO}$ ,  $C_{MetHbNO_2}$ ,  $C_{MetHbNO}$ , а также коэффициенты рассеяния  $K$  и  $S$  рассматривались модельными параметрами. Эти параметры модели подбираются так, чтобы теоретическая кривая  $D_i(\lambda_i)_{theor}$  описывала экспериментальные данные  $D_i(\lambda_i)_{exp}$  лучшим способом. При аппроксимации должно выполняться условие, что  $C_i \geq 0$ .

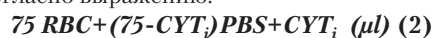
Эксперименты *in vitro* провели по схеме, представленной на рис. 1.

Микроветты со свежей цельной кровью 150 мкл были приготовлены (стадия 1). К каждой микроветте с цельной кровью добавляли 10 мкл растворов  $NaNO_2$  с концентрацией  $C=0,14$  г / мл (стадия 2). Поэтому в микроветте концентрация  $NaNO_2$  составляла 100 мМ. Суспензию с этой концентрации назвали  $NaNO_2(L)$ . Также исследовали эффекты  $NaNO_2$  с концентрацией 10 мМ  $NaNO_2(S)$ . В течение 10 мин инкубации образовался MetHb, и кровь становилась коричневой. Раствор  $NaNO_2$  не добавляли к контрольным микроветтам (контроль). На 3 стадии отмывали суспензии от  $NaNO_2$ . Для этого суспензии с эритроцитами из каждой микроветты переливали в свою соответствующую пробирку эппендорф с 1 мл PBS. Суспензии в пробирках эппендорф центрифугировали ( $1500 \text{ мин}^{-1}$ , 5 мин), затем удаляли надосадочную жидкость и добавляли снова по 1 мл буфера в каждый эппендорф и снова центрифугировали. Таким образом, концентрация  $NaNO_2$  существенно уменьшилась после третьей промывки и была близка к 0. После третьей промывки полный объем суспензии эритроцитов в каждом эппендорфе составлял 150 мкл, что равно исходному объему крови.

Далее в каждый эппендорф добавляли соответствующее количество цитофлавина (стадия 4). Перед добавлением цитофлавина в количестве  $CYT_i$  (мкл) удаляли такое же количество буфера  $CYT_i$  (мкл) из эппендорфа. Индекса  $i$  в записи  $CYT_i$  указывает объем цитофлавина (в мкл) в данном эппендорфе.

Приготовление суспензий эритроцитов с цитофлавином провели согласно схеме 2–5 и таблице. Суммарный объем суспензии сохраняли всегда равным 150 мкл.  $(L/S)$  обозначает раствор  $NaNO_2$  с концентрацией  $L$  или  $S$ .

Контрольные суспензии (в них не был добавлен раствор  $NaNO_2$ , но был добавлен цитофлавин) выполняли согласно выражению:



Такие суспензии обозначены как  $\text{RBC } \text{CYT}_i \text{ (3)}$

Исследуемые суспензии (в них был добавлен раствор  $NaNO_2$  и после промывки добавлен цитофлавин) выполняли следующим образом:

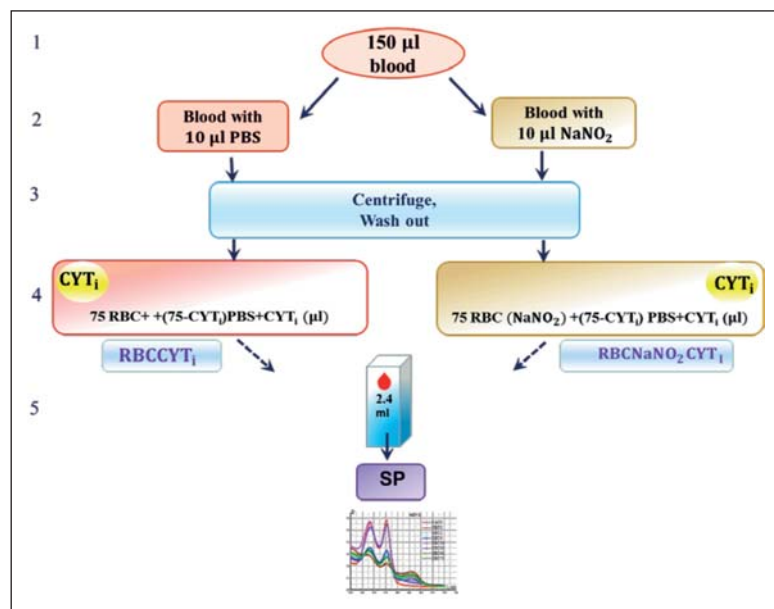


Рис. 1. Схема экспериментов по восстановлению метгемоглобина до оксигемоглобина после добавления цитофлавина.

Fig. 1. The scheme of experiments of reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin after cytoflavin addition.

**Note.** Stages of the experiments are marked with numbers: 1 — whole blood in microvette; 2 — addition of  $NaNO_2$  solution (10  $\mu\text{l}$ ) or PBS, 10 min incubation, formation of MetHb; 3 — elimination of  $NaNO_2$  using triple centrifugation ( $1500 \text{ мин}^{-1}$ , 5 min), and rinsing of RBC in PBS; 4 — addition of cytoflavin or PBS, incubation of suspension for 1–24 h; 5 — measurements of absorption spectra of solutions, calculation of concentrations of hemoglobin derivatives.

**Примечание.** Стадии экспериментов отмечены цифрами: 1 — цельная кровь в микроветте; 2 — добавление раствора  $NaNO_2$  (10 мкл) или PBS, 10 мин инкубации, образование MetHb; 3 — отмыв от  $NaNO_2$  с помощью тройного центрифугирования ( $1500 \text{ мин}^{-1}$ , 5 мин) и промывание красных клеток крови в PBS; 4 — добавление цитофлавина или PBS, инкубация суспензии в течение 1–24 ч; 5 — измерения спектров поглощения растворов, вычисление концентраций производных гемоглобина.

We carried out experiments *in vitro* according the following scheme (Fig. 1).

Microvettes with fresh whole blood (150  $\mu\text{l}$ ) were prepared (stage 1). 10  $\mu\text{l}$  of  $NaNO_2$  solutions with the concentration  $C=0.14$  g / ml were added to each microvette with whole blood (stage 2). Therefore, in microvettes, the concentration of  $NaNO_2$  was 100 mM. The suspensions with this concentration we called  $NaNO_2(L)$ . In addition, we studied the effects of  $NaNO_2$  with a concentration of 10 mM ( $NaNO_2(S)$ ). Within 10 min of incubation, MetHb was formed, and blood turned brown.  $NaNO_2$  solution was not added to the reference microvettes (reference sample). In the 3d stage, the suspensions were washed from  $NaNO_2$ . For this, suspension with red blood cells (RBC) from each microvette was added into a corresponding Eppendorf tube with 1 ml of PBS. The suspensions in Eppendorf tubes were centrifuged ( $1500 \text{ мин}^{-1}$ , 5 min), then the supernatant was removed and 1 ml of buffer was added again to each Eppendorf tube, and they were centrifuged again. Thus the concentration of  $NaNO_2$  substantially diminished after the third washing and was close to 0. After the third washing, the total volume of erythrocyte suspension was 150  $\mu\text{l}$  in each Eppendorf tube, which is equal to the baseline volume of blood.

Next, an appropriate amount of cytoflavin was added to each Eppendorf tube (step 4). Before adding cytoflavin

**Состав суспензий и их обозначение.****Composition of suspensions and their designations.**

Eppendorf	Suspension	Symbol
1	75 $\mu$ l RBC+ +75 $\mu$ l PBS	RBC CYT <sub>0</sub>
2	75 $\mu$ l RBC NaNO <sub>2</sub> +75 $\mu$ l PBS	RBCNaNO <sub>2</sub> (L/S)CYT <sub>0</sub>
3	75 $\mu$ l RBC + 72.5 $\mu$ l PBS + 2.5 $\mu$ l CYT	RBC CYT <sub>2.5</sub>
4	75 $\mu$ l RBC NaNO <sub>2</sub> + 72.5 $\mu$ l PBS + 2.5 $\mu$ l CYT	RBCNaNO <sub>2</sub> (L/S)CYT <sub>2.5</sub>
5	75 $\mu$ l RBC+ +70 $\mu$ l PBS + 5 $\mu$ l CYT	RBC CYT <sub>5</sub>
6	75 $\mu$ l RBC NaNO <sub>2</sub> + 70 $\mu$ l PBS + 5 $\mu$ l CYT	RBCNaNO <sub>2</sub> (L/S)CYT <sub>5</sub>
7	75 $\mu$ l RBC+ +65 $\mu$ l PBS + 10 $\mu$ l CYT	RBC CYT <sub>10</sub>
8	75 $\mu$ l RBC NaNO <sub>2</sub> + 65 $\mu$ l PBS + 10 $\mu$ l CYT	RBCNaNO <sub>2</sub> (L/S)CYT <sub>10</sub>

**Note.** Eppendorf – номера пробирок; Suspension – суспензия; Symbol – обозначение суспензии.

**75 RBC NaNO<sub>2</sub> (L/S) + (75-CYT<sub>i</sub>) PBS + CYT<sub>i</sub> ( $\mu$ l) (4)**

Такие суспензии обозначены как

**RBC NaNO<sub>2</sub> (L/S) CYT<sub>i</sub> (5)**

В опытах величины CYT<sub>i</sub> составили:

CYT<sub>0</sub> = 0  $\mu$ l CYT, CYT<sub>2.5</sub> = 2,5  $\mu$ l CYT, CYT<sub>5</sub> = 5  $\mu$ l CYT, CYT<sub>10</sub> = 10  $\mu$ l CYT.

В данном случае CYT<sub>i</sub> – это объем цитофлавина в 150 мкл суспензии (не концентрации). Для расчета объемной концентрации цитофлавина в каждом эппендорфе можно воспользоваться формулой: CYT<sub>i</sub>/150 (мкл/мл).

Гематокрит в эппендорфе почти совпадает с отправной точкой для каждой серии экспериментов с точностью до 10%. Суспензии эритроцитов инкубировали CYT<sub>i</sub> в течение от 1 часа до 24 часов, затем измеряли спектры поглощения (стадия 5). Для измерения спектров поглощения  $V_{susp} = 20$  мкл суспензии из эппендорфа добавляли к кварцевой кювете с 2,4 мл PBS и измеряли оптическую плотность. Этот процесс повторяли для суспензии каждого эппендорфа.

Эксперименты с кровью каждого донора проводили по три раза. Для каждого эппендорфа спектр измеряли 3 раза. Так провели 45 серий экспериментов по схеме (рис. 1). В каждой серии измеряли спектры контрольных растворов, а также растворов с разным количеством цитофлавина. Спектры, показанные на рис. 2, типичны для данных концентраций NaNO<sub>2</sub> и CYT<sub>i</sub> для крови разных доноров.

Статистический анализ экспериментальных данных провели с использованием программы Origin (OriginLab, Northampton, MA). Для определения неизвестных концентраций производных гемоглобина аппроксимирующую кривую построили по схеме Analysis – Fitting – Nonlinear Curve Fit – the Function (1). В результате аппроксимации, получили параметр R-Square, который являлся количественным представлением уровня аппроксимации. Параметр R-Square должен быть больше 0,98. Данные представили как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Использовали программу One-Way ANOVA для определения статистической значимости влияния цитофлавина (в разных концентрациях) на снижение MetHb по сравнению с автовосстановлением (RBCNaNO<sub>2</sub>(L/S)CYT<sub>0</sub>). Значимые различия отмечали при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты и обсуждение**

Цитофлавин, введенный в суспензию эритроцитов, способствовал восстановлению метгемоглобина до оксигемоглобина. После добавления NaNO<sub>2</sub> почти весь гемоглобин превращался в мет-

in the amount of CYT<sub>i</sub> ( $\mu$ l), the same amount of buffer CYT<sub>i</sub> ( $\mu$ l) was removed from the Eppendorf tube. The index  $i$  in CYT<sub>i</sub> indicates the volume of cytoflavin (in  $\mu$ l) in a given Eppendorf tube.

The preparation of suspensions of RBC with cytoflavin was carried out according to scheme 2–5 and Table 1. The total volume of the suspension was always kept at 150  $\mu$ l (L/S) means the NaNO<sub>2</sub> solution at a concentration equal  $L$  or  $S$ .

Reference solutions (NaNO<sub>2</sub> solution was not added, but cytoflavin was added) were carried out according to the equation:

**75 RBC + (75-CYT<sub>i</sub>)PBS + CYT<sub>i</sub> ( $\mu$ l) (2)**

Such suspensions were designated as

**RBC CYT<sub>i</sub> (3)**

The investigated samples (NaNO<sub>2</sub> solution was added followed by cytoflavin was also added after washing) were carried out according to the equation

**75 RBC NaNO<sub>2</sub> (L/S) + (75-CYT<sub>i</sub>) PBS + CYT<sub>i</sub> ( $\mu$ l) (4)**

Such suspensions were designated as

**RBC NaNO<sub>2</sub> (L/S) CYT<sub>i</sub> (5)**

In our experiments the CYT<sub>i</sub> values were as follows:

CYT<sub>0</sub> = 0  $\mu$ l CYT,  
CYT<sub>2.5</sub> = 2.5  $\mu$ l CYT,  
CYT<sub>5</sub> = 5  $\mu$ l CYT,  
CYT<sub>10</sub> = 10  $\mu$ l CYT

In this case, CYT<sub>i</sub> is not a concentration, but the volume of cytoflavin in 150  $\mu$ l of suspension. To calculate the volume concentration of cytoflavin in each Eppendorf tube, we can use the formula: CYT<sub>i</sub>/150 ( $\mu$ l/ml).

Hematocrit in Eppendorf tubes nearly almost coincided with the baseline for each series of experiments at an accuracy of 10%. The RBC suspensions were incubated with CYT<sub>i</sub> from 1 hour to 24 hours; then, the absorption spectra were measured (stage 5). For measuring of absorption spectra,  $V_{susp} = 20$   $\mu$ l of suspension from Eppendorf tube were added to a quartz cuvette with 2.4 ml of PBS and optical density was measured. This process was repeated for the suspension in each Eppendorf tube.

The experiments for blood taken from each donor were carried out thrice. For each Eppendorf tube, the spectrum was measured thrice. Thus, 45 series of experiments were carried out according to the scheme (Fig. 1). In each series, the spectra of reference solutions as well as of solutions with different amount of cytoflavin were measured. The spectra shown further in Figs. 2 and 3 are typical for

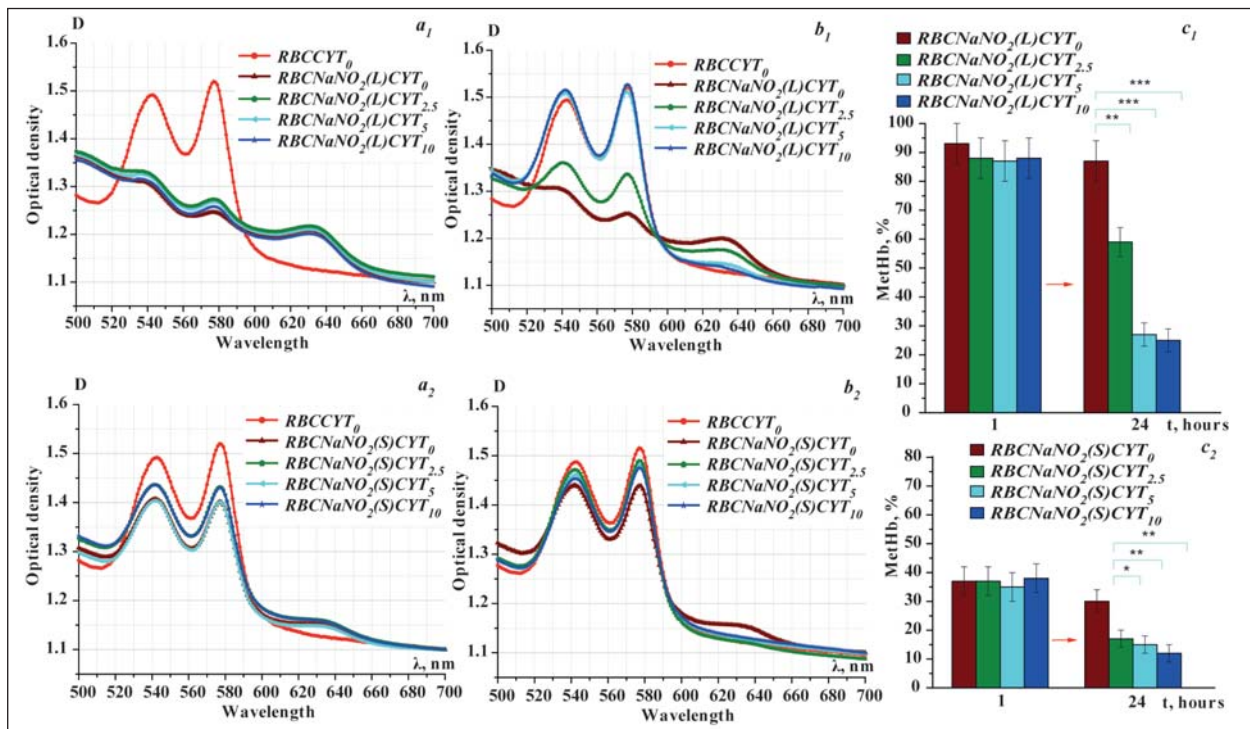


Рис. 2. Спектры поглощения образцов с различными концентрациями цитофлавина и гистограммы MetHb (%) после воздействия  $\text{NaNO}_2$  (L/S) и цитофлавина.

Fig.2. Absorption spectra of the samples with different values of cytoflavin & Histograms of MetHb (%) after effect of  $\text{NaNO}_2$  (L/S) and cytoflavin.

Note.  $a_1, b_1, c_1$  for  $\text{NaNO}_2$  (L);  $a_2, b_2, c_2$  for  $\text{NaNO}_2$  (S). Incubation time is:  $t_1=1$  hour (a),  $t_2=24$  hours (b). Names of curves correspond to equations and signs (2–5);  $c_1$  and  $c_2$  – data for each concentration of cytoflavin  $\text{CYT}_{2.5}, \text{CYT}_5, \text{CYT}_{10}$  were compared to corresponding data of  $\text{CYT}_0$  (autoreduction) for each incubation timepoint (\* –  $P<0.05$ ; \*\* –  $P<0.01$ ; \*\*\* –  $P<0.001$ ).

Примечание. Optical density – оптическая плотность; wavelength – длина волны; hours – часы.  $a_1, b_1, c_1$  – для  $\text{NaNO}_2$  (L);  $a_2, b_2, c_2$  – для  $\text{NaNO}_2$  (S). Время инкубации  $a - t_1=1$  час;  $b - t_2=24$  часа. Названия кривых для  $a, b$  соответствуют уравнениям и подписям (2–5);  $c_1$  и  $c_2$  – данные для каждой концентрации цитофлавина  $\text{CYT}_{2.5}, \text{CYT}_5, \text{CYT}_{10}$  были сопоставлены с соответствующими данными (автосамовосстановление) для каждого времени инкубации (\* –  $p<0.05$ ; \*\* –  $p<0.01$ ; \*\*\* –  $p<0.001$ ).

гемоглобин, для которого характерны определенные пики в спектре поглощения. Особенно выделялся пик на длине волны  $\lambda=630$  нм. После промыва эритроцитов по-прежнему преобладал MetHb (около 93%).

Добавление разного количества цитофлавина  $\text{CYT}_i$  привело к изменению спектра поглощения, и при этом наблюдали концентрационную зависимость.

На рис. 2 для  $\text{NaNO}_2$  (L) и для  $\text{NaNO}_2$  (S) привели спектры поглощения суспензий эритроцитов для контрольной  $\text{RBCCYT}_0$  и  $\text{RBCNaNO}_2(\text{L/S})\text{CYT}_i$  для различных концентраций цитофлавина –  $\text{CYT}_0, \text{CYT}_{2.5}, \text{CYT}_5$  и  $\text{CYT}_{10}$  после инкубации в течение  $t_1=1$  часа и  $t_2=24$  часов.

Для суспензии L после 1 часа инкубации с цитофлавином наблюдали спектры, характерные для MetHb для всех образцов (рис. 2,  $a_1$ ). Можно сделать вывод, что  $\text{CYT}_{0,2.5,5,10}$  практически не повлияли на снижение MetHb.

После 24 часов инкубации для образца  $\text{RBCNaNO}_2(\text{L})\text{CYT}_0$ , в который не добавляли цитофлавин, наблюдали спектр, характерный для MetHb (рис. 2,  $b_1$  коричневая кривая). Произошел

given concentrations of  $\text{NaNO}_2$  and  $\text{CYT}_i$  for blood from different donors.

The statistical analysis of experimental data was performed using the Origin software (OriginLab, Northampton, MA). To determine unknown concentrations of hemoglobin derivatives the fitting curve was constructed according the scheme: Analysis – Fitting – Nonlinear Curve Fit – the Function (1). In resulting approximation, the  $R$ -Square parameter, the quantitative representative of the fitting level, was determined. The  $R$ -Square parameter should be greater than 0.98. Data are shown as the mean  $\pm$  standard deviation. We used One-Way ANOVA for determining statistical significance of effect of cytoflavin in different concentrations on reduction of MetHb in comparison with autoreduction values ( $\text{RBCNaNO}_2(\text{L/S})\text{CYT}_0$ ). Significant differences were reported at  $P \leq 0.05$ .

## Results and Discussion

The experiments demonstrated that cytoflavin administered into a suspension of RBC contributed to the reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin. After addition of  $\text{NaNO}_2$ , almost all hemoglobin molecules were transformed to methemoglobin, for which certain peaks in the absorption spectrum were specific. The peak at the wavelength  $\lambda=630$  nm was most spe-

процесс автовосстановления [14]. Но он был незначительным – не более 2–10%.

При концентрации цитофлавина  $RBCNaNO_2(L)CYT_{2.5}$  стали проявляться пики на длинах волн  $\lambda=542$  нм и  $\lambda=577$  нм, характерные для  $HbO_2$  (рис. 2,  $b_1$ , зеленая кривая). Однако восстановление  $MetHb$  до  $HbO_2$  и  $Hb$  было не полным. За это время инкубации восстановилось только 59% метгемоглобина.

Повышение концентрации цитофлавина до  $CYT_{10}$  существенно усилило эффект восстановления метгемоглобина в образцах  $RBCNaNO_2(L)CYT_5$  (рис. 2,  $b_1$ , голубая кривая) и  $RBCNaNO_2(L)CYT_{10}$  (рис. 2,  $b_1$ , синяя линия). Пики, характерные для оксигемоглобина, почти достигли контрольных значений, наблюдаемых в образце  $RBCCYT_0$  без воздействия  $NaNO_2$  (рис. 2,  $b_1$ , красная кривая). В этом случае уже восстановилось около 25–27% метгемоглобина.

Для суспензий  $S$  после 1 часа инкубации во всех образцах наблюдали спектральные характеристики для комбинации различных производных гемоглобина (рис. 2,  $a_2$ ). Для всех концентраций  $CYT_{0,2.5,5,10}$  спектры были приблизительно одинаковыми с небольшим, но очевидным пиком при  $\lambda=630$  нм. Это соответствует 30–40%  $MetHb$  в суспензиях. После 24 часов инкубации для образца  $RBCNaNO_2(S)CYT_0$ , в который цитофлавин не добавлялся, этот пик остался неизменным (рис. 2,  $b_2$ , коричневая кривая).

Пики при  $\lambda=542$  нм и  $\lambda=577$  нм, характерные для  $HbO_2$ , начали увеличиваться для всех образцов с цитофлавином. Для  $RBCNaNO_2(L)CYT_5$  (рис. 3,  $b_2$ , голубая кривая) и  $RBCNaNO_2(L)CYT_{10}$  (рис. 3,  $b_2$ , синяя кривая) пики, типичные для метгемоглобина, практически исчезли. В этом случае концентрация  $MetHb$  снизилась до 10–12%, но наблюдали небольшой пик для  $RBCNaNO_2(L)CYT_{2.5}$  (рис. 2,  $b_2$ , зеленая кривая). Это соответствовало 16–18%  $MetHb$ .

Визуальный эффект влияния цитофлавина на восстановление  $MetHb$  до  $HbO_2$  показан на рис. 3.

На фотографии представлены суспензии  $L$  красных клеток крови в PBS, время инкубации эритроцитов с  $CYT_{10}$  (или с PBS) составляло  $t_1=1$  ч (рис. 3,  $a$ ) и  $t_{24}=24$  ч (рис. 3,  $b$ ). В течение  $t_1=1$  часа инкубация цитофлавина с суспензией эритроцитов не влияла на концентрацию  $MetHb$  (рис. 4,  $a$ ). Суспензия для образца  $RBCNaNO_2(L)CYT_{10}$  была по-прежнему коричневой также, как и для образца  $RBCNaNO_2(L)CYT_0$  без цитофлавина.

Однако после инкубации в течение  $t_{24}=24$  часов суспензия с цитофлавином  $RBCNaNO_2(L)CYT_{10}$  покраснела (рис. 3,  $b$ ), что наглядно показывает, что в суспензии произошел процесс восстановления метгемоглобина до оксигемоглобина. В то же время суспензия  $RBCNaNO_2(L)CYT_0$  без цитофлавина осталась коричневой – процесс самовосстановления почти отсутствовал. Контрольная суспензия  $RBCS_0$  без добавления  $NaNO_2$  и цитофлавина была красной

циф. Following washing of red blood cells,  $MetHb$  still prevailed (about 93%).

The addition of different amount of cytoflavin ( $CYT_i$ ) resulted in changing the absorption spectra, and the concentration dependence was observed.

Absorption spectra of RBC suspensions for reference  $RBCCYT_0$  and  $RBCNaNO_2(L/S)CYT_i$  for various concentrations of cytoflavin –  $CYT_0, CYT_{2.5}, CYT_5$  and  $CYT_{10}$  after incubation during  $t_1=1$  hour and  $t_{24}=24$  hours are shown in Fig. 2 for  $NaNO_2(L)$  and  $NaNO_2(S)$ .

For suspensions  $L$  after 1 hour of incubation with cytoflavin, spectra typical for  $MetHb$  were observed for all samples (Fig. 2,  $a_1$ ). It can be concluded that  $CYT_{0,2.5,5,10}$  almost did not affect the reduction of  $MetHb$ .

After 24 hours of incubation, for the sample  $RBCNaNO_2(L)CYT_0$ , in which cytoflavin was not added, a spectrum typical for  $MetHb$  (Fig. 2,  $b_1$  brown curve) was observed. The process of autoreduction occurred [14], however it was insignificant.

The peaks at  $\lambda=542$  nm and  $\lambda=577$  nm characteristic for  $HbO_2$  (Fig. 2,  $b_1$ , green curve) began to appear for a sample with cytoflavin  $RBCNaNO_2(L)CYT_{2.5}$ . However, the reduction of  $MetHb$  to  $HbO_2$  and  $Hb$  was incomplete. During this time of incubation, only 59% of methemoglobin was reduced.

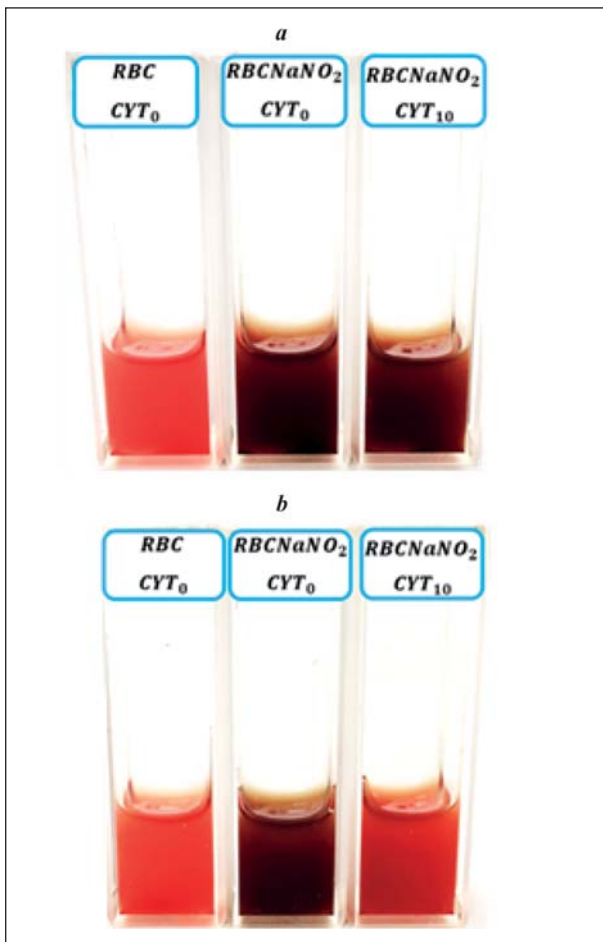
An increase in concentration of cytoflavin to  $CYT_{10}$  significantly enhanced the effect of reduction of methemoglobin in samples  $RBCNaNO_2(L)CYT_5$  (Fig. 2,  $b_1$ , cyan curve) and  $RBCNaNO_2(L)CYT_{10}$  (Fig. 2,  $b_1$ , blue curve). The peaks characteristic for oxyhemoglobin almost reached the reference values observed in sample  $RBCCYT_0$  without the impact of  $NaNO_2$  (Fig. 2,  $b_1$  red curve). In this case methemoglobin was already reduced to about 25–27%.

As for suspensions  $S$  after 1 hour of incubation, spectra characteristics for a combination of different hemoglobin derivatives (Fig. 2,  $a_2$ ) were observed for all samples. For all concentrations of  $CYT_{0,2.5,5,10}$ , spectra were approximately the same with a small but obvious peak at  $\lambda=630$  nm. This peak corresponded to 30–40% of  $MetHb$  in suspensions. After 24 hours of incubation, for the sample  $RBCNaNO_2(S)CYT_0$  in which cytoflavin was not added, this peak remained the same (Fig. 2,  $b_2$ , brown curve).

The peaks at  $\lambda=542$  nm and  $\lambda=577$  nm typical for  $HbO_2$  began to increase for all samples with cytoflavin. For  $RBCNaNO_2(L)CYT_5$  (Fig. 2,  $b_2$ , cyan curve) and  $RBCNaNO_2(L)CYT_{10}$  (Fig. 2,  $b_2$ , blue curve), the peaks typical for methemoglobin almost disappeared. In this case, the concentration of  $MetHb$  decreased to 10–12%. However, only small peak was observed for  $RBCNaNO_2(L)CYT_{2.5}$  (Fig. 2,  $b_2$ , green curve). This peak corresponded to 16–18% of  $MetHb$ .

A visual image of the effect of cytoflavin on the reduction of  $MetHb$  to  $HbO_2$  is shown in Fig. 3.

Fig. 3 shows suspensions  $L$  of RBC in PBS. The incubation time of RBC with  $CYT_{10}$  (or with PBS) was



**Рис. 3.** Фотографии суспензий красных клеток крови в кварцевых кюветках после добавления  $\text{NaNO}_2$  и цитофлавина.

**Fig. 3.** Suspensions of red blood cells in quartz cuvettes after addition of  $\text{NaNO}_2$  and cytoflavin.

**Note.** 1 h (a) and 24 h (b). Notes under the cuvettes correspond to different concentrations of  $\text{NaNO}_2$  and cytoflavin in accordance with equations 2–5.

**Примечание.** 1 ч (a) и 24 ч (b). Названия кювет соответствуют различным концентрациям  $\text{NaNO}_2$  и цитофлавина в соответствии с уравнениями 2–5.

как исходно, так и через 24 часа.

Эти фотографии качественно иллюстрируют эффект изменения концентраций производных гемоглобина. Они соответствуют количественным результатам экспериментов и расчетов.

Во время реакций возможно образование следующих производных гемоглобина  $\text{HbO}_2$ ,  $\text{Hb}$ ,  $\text{MetHb}$ ,  $\text{HbNO}$ ,  $\text{MetHbNO}_2$ ,  $\text{MetHbNO}$ . Был использован метод аппроксимации кривой. Экспериментальные зависимости  $D_i(\lambda)_{\text{exp}}$  и аппроксимированные кривые  $D_i(\lambda)_{\text{teor}}$  представлены на рис. 4:

$$D_i(\lambda)_{\text{teor}} = \varepsilon_{\text{HbO}_2, i} C_{\text{HbO}_2} L + \varepsilon_{\text{Hb}, i} C_{\text{Hb}} L + \varepsilon_{\text{MetHb}, i} C_{\text{MetHb}} L + \varepsilon_{\text{HbNO}, i} C_{\text{HbNO}} L + \varepsilon_{\text{MetHbNO}_2, i} C_{\text{MetHbNO}_2} L + \varepsilon_{\text{MetHbNO}, i} C_{\text{MetHbNO}} L + K + S/\lambda_i^2 \quad (6)$$

Концентрации шести производных гемоглобина были определены аппроксимацией экспери-

$t_1=1$  hour (Fig. 3, a) and  $t_{24}=24$  hours (Fig. 3, b). During  $t_1=1$  hour the incubation of cytoflavin with RBC suspension did not affect the concentration of  $\text{MetHb}$  (Fig. 3, a). The suspension  $\text{RBCNaNO}_2(L)\text{CYT}_{10}$  continued to keep a brown color similar to specimen  $\text{RBCNaNO}_2(L)\text{CYT}_0$  without cytoflavin.

However, after incubation for  $t_{24}=24$  hours, the suspension with cytoflavin  $\text{RBCNaNO}_2(L)\text{CYT}_{10}$  turned red (Fig. 3, b) that clearly demonstrated the process of reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin in the suspension. The suspension  $\text{RBCNaNO}_2(L)\text{CYT}_0$  without cytoflavin remained brown, i. e. the process of autoreduction was almost absent. Reference suspension  $\text{RBCC}_0$  without addition of  $\text{NaNO}_2$  and cytoflavin was red at a baseline and in 24 hours.

These images qualitatively illustrate the effect of changes in the concentrations of hemoglobin derivatives that is in good agreement with the quantitative results of experiments.

During reactions, the formation of the following hemoglobin species are possible:  $\text{HbO}_2$ ,  $\text{Hb}$ ,  $\text{MetHb}$ ,  $\text{HbNO}$ ,  $\text{MetHbNO}_2$ ,  $\text{MetHbNO}$ . Curve fitting method was used. Experimental relations  $D_i(\lambda)_{\text{exp}}$  and fitted curves  $D_i(\lambda)_{\text{teor}}$  are presented in Fig. 4:

$$D_i(\lambda)_{\text{teor}} = \varepsilon_{\text{HbO}_2, i} C_{\text{HbO}_2} L + \varepsilon_{\text{Hb}, i} C_{\text{Hb}} L + \varepsilon_{\text{MetHb}, i} C_{\text{MetHb}} L + \varepsilon_{\text{HbNO}, i} C_{\text{HbNO}} L + \varepsilon_{\text{MetHbNO}_2, i} C_{\text{MetHbNO}_2} L + \varepsilon_{\text{MetHbNO}, i} C_{\text{MetHbNO}} L + K + S/\lambda_i^2 \quad (6)$$

Concentrations of six hemoglobin derivatives were identified by best approximation of the experimentally measured spectra by theoretical curves.

Fig. 4, a and Fig. 4, b show good approximation of experimental spectra by theoretical curves for calculated concentrations of hemoglobin derivatives.

The kinetics of reduction of hemoglobin derivatives in the presence of cytoflavin was studied in the experiments (Fig. 5) once every 3 hours during 24 hours of incubation (suspension L). The dependences of changes in hemoglobin derivatives concentrations with  $c \text{Fe}^{3+} - \text{MetHb} + \text{MetHbNO}_2 + \text{MetHbNO}$  are shown in Fig. 5, a. The dependences of changes in hemoglobin derivatives concentrations with  $\text{Fe}^{2+} - \text{HbO}_2 + \text{Hb} + \text{HbNO}$  are shown in Fig. 5, b.

Cytoflavin increased the concentration of  $\text{Fe}^{2+}$  hemoglobin derivatives and decreased concentration  $\text{Fe}^{3+} \text{Hb}$ .

Importantly, the action of cytoflavin developed gradually over time. This was demonstrated by the kinetics of the level of significance. For each incubation timepoint, data for each concentration of cytoflavin  $\text{CYT}_{2.5}$ ,  $\text{CYT}_5$ ,  $\text{CYT}_{10}$  were compared to corresponding data of  $\text{CYT}_0$  (autoreduction). At timepoints  $t_1=1$  hour and  $t_3=3$  hours, there were no significant differences in a drug action at all concentrations of cytoflavin.

At time  $t_6=6$  hours there was no significant difference for suspension with  $\text{CYT}_{2.5}$ , but significant differences appeared for  $\text{CYT}_5$  and  $\text{CYT}_{10}$  at  $* - P < 0.05$ . At a timepoint  $t_9$  (9 hours) the levels of significance



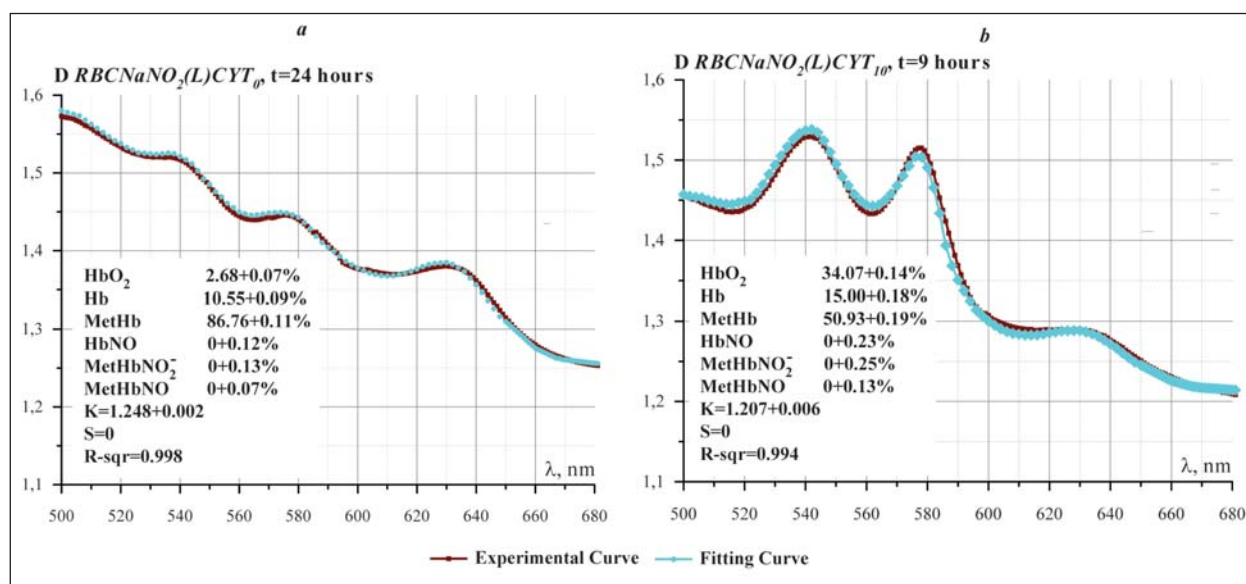


Рис. 4. Сравнение экспериментальных  $D_1(\lambda)_{\text{exper}}$  и аппроксимированных кривых  $D_1(\lambda)_{\text{theor}}$  с учетом расчетных концентраций производных гемоглобина.

Fig. 4. Comparison of experimental  $D_1(\lambda)_{\text{exper}}$  and fitting curves  $D_1(\lambda)_{\text{theor}}$  considering the calculated concentrations of hemoglobin species.

**Note.** Concentrations of hemoglobin species are shown; calculations were made by the curve fitting method. (a)  $CYT_0$ ,  $t_{24}$ =24 hours, 87% *MetHb*, *R-Square*=0.998. (b)  $CYT_{10}$ ,  $t_9$ =9 hours. There was a partial reduction of methemoglobin, 51% *MetHb*, *R-Square*=0.994.

**Примечание.** Концентрации производных гемоглобина показаны на каждом графике, они были рассчитаны методом аппроксимации кривой. *a* —  $CYT_0$ ,  $t_{24}$ =24 ч. Наблюдается 87% *MetHb*, *R-Square*=0,998; *b* —  $t_9$ =9 ч. Произошло частичное восстановление метгемоглобина до 51%, *R-Square*=0,994.

ментально измеренных спектров теоретическими кривыми.

На рис. 4, *a* и рис. 4, *b* показана аппроксимация экспериментальных спектров теоретическими кривыми для расчетных концентраций производных гемоглобина.

Через каждые 3 часа в течение 24 часов инкубации в экспериментах изучали кинетику восстановления производных гемоглобина в присутствии цитофлавина (рис. 5) для суспензии *L*. На рис. 5, *a* представлены зависимости изменения концентраций производных гемоглобина с  $Fe^{3+}$  — *MetHb*+*MetHbNO*<sub>2</sub><sup>-</sup>+*MetHbNO*. На рис. 5, *b* представлены зависимости изменения концентраций производных гемоглобина с  $Fe^{2+}$  — *HbO*<sub>2</sub>+*Hb*+*HbNO*.

Цитофлавин увеличивал концентрацию производных гемоглобина с  $Fe^{2+}$  и, соответственно, уменьшал концентрацию с  $Fe^{3+}$ .

Важно, что действие цитофлавина постепенно развивалось со временем. Это может быть продемонстрировано кинетикой уровня значимости. Данные для каждой точки времени инкубации при определенной концентрации цитофлавина  $CYT_{2.5}$ ,  $CYT_5$ ,  $CYT_{10}$  сравнивали с соответствующими данными  $CYT_0$  (автовосстановление). В моменты времени  $t_1$ =1 час и  $t_3$ =3 часа не было существенных различий в эффекте препарата при всех концентрациях цитофлавина.

В момент времени  $t_6$ =6 часов не было выявлено никаких существенных различий для суспензии с  $CYT_{2.5}$ , но для  $CYT_5$  и  $CYT_{10}$  появились существен-

ные различия —  $P<0.001$  для  $CYT_5$  и  $CYT_{10}$ . The drug effects at  $CYT_{2.5}$  also increased,  $** - P<0.01$ .

Fig. 2 represents histograms of the *MetHb* percentage in suspensions of the *L* series (Fig. 2, *a*) and *S* series (Fig. 2, *b*) depending on different concentrations of *NaNO*<sub>2</sub> and corresponding different baseline levels of methemoglobin. At  $t_1$ =1 hour, there were no significant differences between *MetHb* levels for all concentrations of cytoflavin ( $CYT_{2.5}$ ,  $CYT_5$  and  $CYT_{10}$ ) compared to  $CYT_0$  (Fig. 2). After  $t_{24}$ =24 hours, for both series, there were significant differences between group with cytoflavin and control suspensions with no drug. Moreover, significance level was different for different concentrations of cytoflavin: (a) for  $CYT_{2.5}$  \* —  $P<0.05$  (for *S*) and \*\* —  $P<0.01$  (for *L*); (b) for  $CYT_5$  and  $CYT_{10}$ , \*\* —  $P<0.01$  (for *S*) and \*\*\* —  $P<0.001$  (for *L*).

There were no statistical differences between values of *MetHb* (%) due to autoreduction in samples after 24 hours and 1 hour,  $P=0.4$ .

In a separate experiment, it was shown that under the action of cytoflavin, the excessive methemoglobin is converted to oxyhemoglobin and not to carboxyhemoglobin. The standard methods based on the use of sodium dithionite were employed in this experiment. After addition of dithionite, the spectral parameters specific for oxyhemoglobin disappeared, and the spectrum appeared to exhibit only one maximum typical for deoxyhemoglobin at  $\lambda=554$  nm.

The high level of *MetHb* can be reached at poisonings with aniline and its derivatives, some local

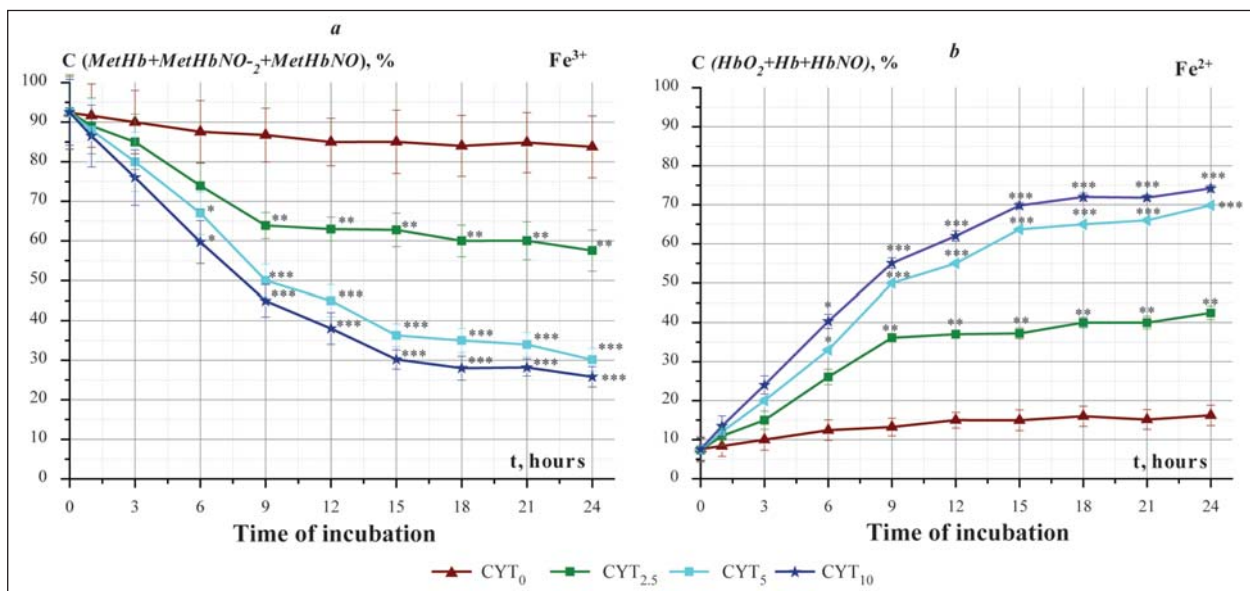


Рис. 5. Кинетика изменения производных гемоглобина при различных концентрациях цитофлавина при  $\text{NaNO}_2$  (L).

Fig. 5. Kinetics of changes of hemoglobin derivatives for different concentrations of cytoflavin, for  $\text{NaNO}_2$  (L).

Note. *a* – Species with  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{MetHb} + \text{MetHbNO}_2 + \text{MetHbNO}$ ); *b* – Species with  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{HbO}_2 + \text{Hb} + \text{HbNO}$ ). Data represent three independent experiments for each of five donors, each point is the mean, standard error of the mean is displayed as error bars. For each timepoint, the data obtained for each concentration of cytoflavin  $\text{CYT}_{2.5}$ ,  $\text{CYT}_5$ ,  $\text{CYT}_{10}$  were compared to corresponding data of  $\text{CYT}_0$  (autoreduction) (\* –  $P < 0.05$ ; \*\* –  $P < 0.01$ ; \*\*\* –  $P < 0.001$ ).

Примечание. *a* – производные с  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{MetHb} + \text{MetHbNO}_2 + \text{MetHbNO}$ ) не способные нести кислород; *b* – производные с  $\text{Fe}^{2+}$ , способные переносить кислород ( $\text{HbO}_2 + \text{Hb} + \text{HbNO}$ ). Данные взяты из трех независимых экспериментов для каждого из пяти доноров, каждая точка – среднее значение, стандартная ошибка среднего значения отображается, как полосы ошибок. При каждом времени инкубации данные для каждой концентрации цитофлавина  $\text{CYT}_{2.5}$ ,  $\text{CYT}_5$ ,  $\text{CYT}_{10}$  были сопоставлены с соответствующими данными  $\text{CYT}_0$  (автовосстановление) (\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ ).

ные различия при \* –  $p < 0,05$ . И к  $t_9 = 9$  часам уровень значимости стал \*\*\* –  $p < 0,001$  для  $\text{CYT}_5$  и  $\text{CYT}_{10}$ . Также был увеличен эффект при использовании концентрации препарата  $\text{CYT}_{2.5}$ , \*\* –  $p < 0,01$ .

На рис. 2 представлены гистограммы процента  $\text{MetHb}$  в суспензиях серии L (рис. 2,  $c_1$ ) и S (рис. 2,  $c_2$ ) в зависимости от разных концентраций  $\text{NaNO}_2$  и соответствующего различного начального содержания метгемоглобина. При  $t_1 = 1$  час не было существенных различий между содержанием  $\text{MetHb}$  для всех концентраций цитофлавина –  $\text{CYT}_{2.5}$ ,  $\text{CYT}_5$  и  $\text{CYT}_{10}$  относительно  $\text{CYT}_0$  (рис. 2). Но после  $t_{24} = 24$  часа для обеих серий наблюдали существенные различия между данными для образцов с цитофлавином по сравнению с суспензиями без него. Более того, уровень значимости не был одинаковым для разных концентраций цитофлавина. Поэтому для  $\text{CYT}_{2.5}$  \* –  $p < 0,05$  (для S) и \*\* –  $p < 0,01$  (для L). В то же время для  $\text{CYT}_5$  и  $\text{CYT}_{10}$  \*\* –  $p < 0,01$  (для S) и \*\*\* –  $p < 0,001$  (для L).

Не было статистических различий между средними значениями  $\text{MetHb}$  (%) из-за автовосстановления в образцах через 24 часа и 1 час,  $p < 0,4$ .

В отдельном эксперименте было показано, что метгемоглобин с помощью цитофлавина превращается именно в оксигемоглобин, а не в карбоксигемоглобин. Для доказательства применили стандартную методику, основанную на использовании дитионита натрия. После добавления дитионита характерные для оксигемоглобина параметры спек-

anesthetics, nitrites and nitrates [1, 3, 6]. Due to the development of the pharmaceutical and chemical industries, the methemoglobinemia of the exogenous origin occurs more often [15].

In our experiments, hemoglobin was converted into methemoglobin when erythrocyte suspension was exposed to  $\text{NaNO}_2$ , and as a result, there was a conversion  $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ . Under such conditions, the formation of following hemoglobin derivatives becomes possible: with iron  $\text{Fe}^{3+}$  (et  $\text{MetHb} + \text{MetHbNO}_2 + \text{MetHbNO}$ ) or  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{HbO}_2 + \text{Hb} + \text{HbNO}$ ) in the solution [16]. Only  $\text{HbO}_2$  of these 6 components is capable to deliver the oxygen to the tissues whereas Hb is potentially capable to attach oxygen. Oxidative processes in the blood lead to tissue hypoxia, to shape changes of RBC and to distortion of the membrane nanostructure [17–19]. Exact manner in which all these derivatives of hemoglobin interact with one another is not clear enough. For example, possible reduction reactions were shown in work [20]. The change in the forms of hemoglobin was investigated not only *in vitro*, but also *in vivo* [2, 3, 14]. Reactions of conversion  $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$  are associated with redox processes in the RBC. Therefore, the addition of pharmaceuticals to the RBC suspension, which affects the redox processes, may also affect the interactions of hemoglobin derivatives. As a result, the ratio of the concentrations of hemoglobin derivatives changes significantly. Earlier we have shown that perfluorocarbon com-

тра исчезали, а спектр имел только один максимум, характерный для дезоксигемоглобина при  $\lambda=554$  нм.

Высокое содержание *MetHb* в крови может возникать при отравлении анилином и его производными, некоторыми местными анестетиками, нитритами и нитратами [1, 3, 6]. В связи с развитием фармацевтической и химической промышленности метгемоглобинемия экзогенной обусловленности встречается очень часто [15].

В наших опытах гемоглобин превращался в метгемоглобин при действии  $\text{NaNO}_2$  на суспензию эритроцитов: при этом  $\text{Fe}^{2+}$  переходит в  $\text{Fe}^{3+}$ . В таких условиях возможно образование производных гемоглобина с железом  $\text{Fe}^{3+}$ :  $\text{MetHb} + \text{MetHbNO}_2 + \text{MetHbNO}$ . Также в растворе могут содержаться и производные с  $\text{Fe}^{2+}$ :  $\text{HbO}_2 + \text{Hb} + \text{HbNO}$  [16]. Из этих 6 компонентов только  $\text{HbO}_2$  переносит кислород и только Hb потенциально способен присоединить кислород. Нарушение окислительных процессов в крови ведет к гипоксии тканей, изменению форм и наноструктуры мембран красных клеток крови [17–19]. Характер взаимодействия производных гемоглобина пока недостаточно ясен. Например, возможные реакции восстановления  $\text{Fe}^{3+}$  в  $\text{Fe}^{2+}$  были показаны в работе [20]. Изменение форм гемоглобина было исследовано не только *in vitro*, но также *in vivo* [2, 3, 14]. Реакции превращения  $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$  так или иначе связаны с окислительно-восстановительными процессами в эритроцитах. Поэтому добавление в суспензию эритроцитов химфармпрепаратов, способных влиять на окислительно-восстановительные процессы, может также влиять и на процессы взаимодействия производных гемоглобина. В результате соотношение их концентраций может существенно измениться. Ранее нами было показано, что восстановлению метгемоглобина до оксигемоглобина способствуют перфторуглеродные соединения [7].

Положительное действие цитофлавина на организм человека при кардиохирургических операциях, в постоперационный период, при последствиях инфаркта мозга известно с 2004 года. Цитофлавин имеет цитопротекторный эффект. Он является метаболическим регулятором. Этот препарат оказывает антиоксидантное и антигипоксическое действие, положительное влияние на выработку энергии в клетке, уменьшает образование свободных радикалов и восстанавливает активность антиоксидантных ферментов. Цитофлавин обладает ангиошиемическим действием, улучшает коронарный и церебральный кровоток, ограничивает зону некроза [9, 10, 21–23].

В работе [10] приведены клинические результаты антиокислительного действия цитофлавина на организм человека. Представляет научный интерес показать действие цитофлавина на гемоглобин в прямом биофизическом эксперименте *in vitro*. Это может позволить в дальнейшем раскрыть механизмы антиокислительного действия этого препарата.

pounds contribute to reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin [7].

It could be particularly useful, however, to study biomimetic pharmaceuticals, which are similar to natural, functionally significant components of the body. The positive effect of cytoflavin on the human body is known since 2004 due to clinical use in cardiosurgeries, postsurgery and after cerebral infarctions and other cerebrovascular diseases. Cytoflavin provided a cytoprotective effect. It is a metabolic regulator. This drug has an antioxidant and antihypoxic action, exerting a positive effect on energy production in cells reducing the production of free radicals and restoring antioxidant enzyme activity. Cytoflavin has an anti-ischemic effect, improves coronary and cerebral blood flow limiting the zone of necrosis [9, 10, 21–23].

Clinical results of the studies of the antioxidant effect of cytoflavin in the human body are presented in a publication [10]. It was of interest to investigate the effect of cytoflavin on hemoglobin in a direct experiment *in vitro*. Further, these studies may reveal the mechanisms of antioxidant action of this drug.

Pharmacological effects of cytoflavin are regulated by the combined action of several components of the formulation as described [8, 9]. The complex formulation is composed of two metabolites (succinic acid and inosine) and two coenzymes (riboflavin mononucleotide and nicotinamide). The pharmacological effects of each component are well-known. Each component contributes to the redox processes in the RBC suspension.

Succinic acid is a key biochemical molecule. It is employed for energy metabolism in plants, human and animal tissue representing an intermediate in the Krebs cycle. Studies have shown, however, that the role of succinic acid goes far beyond energy processes. Antihypoxic and antioxidant effects of succinic acid has also been demonstrated [9, 25].

Inosine is used in to improve the quality of the donor blood components during long-term storage [26]. Nicotinamide has been included as a component of a composition for cryopreservation. Nicotinamide is employed for membrane stabilization and fluidity [27]. Riboflavin mononucleotide sodium (FMN-Na, Flavin mononucleotide) plays an important role in oxidation-reduction reactions. Riboflavin is a water soluble vitamin, also known as Vitamin B2. In the body, riboflavin is primarily found as an integral component of the coenzyme, one of which is riboflavin mononucleotide sodium. There is a significantly impaired relationship between plasma riboflavin mononucleotide sodium and riboflavin in patients with critical illness [28]. Flavins act as a cofactor in many enzymes and catalyse a wide variety of biological reactions due to one of the most versatile *in vivo* redox centers in its structure. Organic redox active materials dissolved in electrolyte materials have received increasing interest

Фармакологические эффекты цитофлавина регулируются совместным действием составляющих его ингредиентов [8, 9]. Этот комплексный препарат состоит из двух метаболитов (янтарной кислоты и инозина) и двух коферментов (моноклеотида рибофлавина и никотинамида). Широко известно фармакологическое действие каждого компонента по отдельности. Каждая компонента способна внести вклад в окислительно-восстановительные процессы, происходящие в суспензии красных клеток крови.

Янтарная кислота является ключевой биохимической молекулой. Природа использует ее для энергетического метаболизма в растениях, тканях человека и животных. Янтарная кислота является промежуточным продуктом цикла Кребса. Исследования показали, что роль янтарной кислоты выходит далеко за пределы энергетических процессов. Также известно антигипоксическое и антиоксидантное действие янтарной кислоты [9, 25].

Инозин используют в растворах с целью повышения качества компонент донорской крови при длительном хранении [26].

Никотинамид, предназначенный для стабилизации мембраны эритроцитов и текучести крови [27], включен в состав для криоконсервации.

Моноклеотид рибофлавина натрия (FMN-Na, моноклеотид флавина) играет важную роль в окислительно-восстановительных реакциях. Рибофлавин – это водорастворимый витамин, также известен как витамин В2. В организме рибофлавин встречается прежде всего как неотъемлемый компонент ко-ферментов, одним из которых является моноклеотид рибофлавина натрия. Существует значительное нарушение соотношения между плазменным моноклеотидом рибофлавина натрия и рибофлавином у пациентов в критических состояниях [28]. Флавины действуют как кофактор во многих ферментах, которые катализируют самые разнообразные биологические реакции и содержат один из самых универсальных окислительно-восстановительных центров *in vivo*. Использование органических окислительно-восстановительных активных веществ, растворенных в электролитах, приобретает все больший интерес для создания стабильной биомиметической системы аккумуляции энергии – окислительно-восстановительных батарей [29].

Таким образом все 4 компонента цитофлавина могут внести вклад в окислительно-восстановительные процессы, происходящие с производными гемоглобина. Возможно, их комбинированное действие и привело к явлению восстановления метгемоглобина до оксигемоглобина в присутствии цитофлавина. При этом возможно два пути влияния цитофлавина на процессы превращений железа  $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$ .

Непосредственное химическое участие молекул компонент цитофлавина в цепочках окислительно-восстановительных процессов. Это влияние

for creation of stable biomimetic energy storage system, i.e. redox flow batteries [29].

All four components of cytoflavin are capable to contribute to redox properties of hemoglobin derivatives. Presumably, a combined effect of cytoflavin components might lead to the reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin in the presence of cytoflavin. In this case, there are two possible ways of the influence of cytoflavin on the processes of iron conversion  $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$ .

Direct chemical involvement of cytoflavin components in a redox processes is possible. This influence can be similar to that of methylene blue or ascorbic acid used in the treatment of methemoglobinemia [5].

Binding of cytoflavin components to active oxidation centers, thereby participating in the inhibition of oxidation processes.

To calculate the concentrations of hemoglobin derivatives, the Nonlinear Fitting method was used for the approximation of the experimental spectra. Good agreement between the theoretical data and the experimental data with the coefficient *R-Square*  $\geq 0.99$  was obtained. The theoretical data agreed not only in the description of the spectrum, but also in the estimation of the residual *K* level.

The antioxidant property of cytoflavin was demonstrated in our work for the first time in a direct biophysical *in vitro* experiment. For this purpose, blood from healthy donors was used as control exhibiting initially normal concentration of oxyhemoglobin and methemoglobin. The situation of using already initially poisoned blood containing a large amount of methemoglobin was excluded. The use of cytoflavin in this model experiment led to the reduction of excessive methemoglobin to oxyhemoglobin. In this case, the reduction effect of cytoflavin occurred only if the methemoglobin was located inside the cell. The effect of  $NaNO_2$  on free hemoglobin in distilled water led to the appearance of methemoglobin. However, in this case, the addition of cytoflavin did not result in a reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin. This interesting phenomenon will be studied in details in future experiments.

Performed experiments might contribute to future studies validating the role of cytoflavin in blood recovery after acute poisoning. Clarifying the role of separate components of the drug would contribute to mechanistic studies of cytoflavin action.

## Conclusion

The revealed effects may have a fundamental and practical application. Based on results with cytoflavin it would be possible to study and develop pharmacological methods for reduction  $Fe^{3+}$  to  $Fe^{2+}$  in blood. Cytoflavin can be used directly in treatment of methemoglobinemia in clinics. It would be

может быть аналогично действию метиленового синего или аскорбиновой кислоты, используемых при лечении метгемоглобинемии [5].

Связывание компонентов цитофлавина с активными окислительными центрами обеспечивает участие в ингибировании процессов окисления.

Для расчетов концентраций производных гемоглобина использован метод Nonlinear Fitting для обработки экспериментальных спектров. Получено хорошее согласование теоретических данных с экспериментальными с коэффициентом  $R\text{-Square} \geq 0,99$ . Теоретические данные согласованы не только в описании спектра, но и в оценке остаточного уровня  $K$ .

В нашей работе впервые показано антиокислительное свойство цитофлавина в прямом биофизическом эксперименте *in vitro*. Кровь от здоровых доноров использовали для того, чтобы изначально иметь нормальную концентрацию оксигемоглобина и метгемоглобина. Использование цитофлавина в данном модельном эксперименте привело к восстановлению метгемоглобин до оксигемоглобина. При этом восстанавливающий эффект цитофлавина происходит только, если метгемоглобин находится внутри клетки. Воздействие  $\text{NaNO}_2$  на свободный гемоглобин в дистиллированной воде приводило к возникновению метгемоглобина. Однако добавление цитофлавина в этом случае не приводило к восстановлению метгемоглобина до оксигемоглобина. Это

also important to validate the use of the drug during the storage of donor blood, in blood transfusion and for the development of blood substitutes. Clarification of the molecular mechanisms of the protective action of cytoflavin and determining its protective patterns when using various chemical oxidants seems a promising area of translational studies.

интересное явление будет детально изучено в будущих экспериментах.

Проделанные нами эксперименты могут стать основой для исследования возможности использования цитофлавина для восстановительных процессов в крови пациентов с острыми отравлениями, также планируется изучить действие отдельных компонент на этот процесс.

## Заключение

Показанный эффект может иметь как фундаментальное, так и практическое применение. Цитофлавин может быть использован непосредственно при лечении метгемоглобинемии в клинике. Также важно будет использовать его во время хранения донорской крови, при проведении гемотрансфузии и при разработке кровезаменителей. Весьма перспективным также является изучение молекулярных механизмов протекторного действия цитофлавина при широком спектре экзогенных отравлений.

## Литература

1. Bradberry S.M. Occupational methaemoglobinaemia. Mechanisms of production, features, diagnosis and management including the use of methylene blue. *Toxicol. Rev.* 2003; 22 (1): 13-27. DOI: 10.2165/00139709-200322010-00003. PMID: 14579544
2. Kohn M.C., Melnick R.L., Ye F., Portier C.J. Pharmacokinetics of sodium nitrite-induced methemoglobinemia in the rat. *Drug. Metab. Dispos.* 2002; 30 (6): 676–683. DOI: 10.1124/dmd.30.6.676. PMID: 12019195
3. Lee J., El-Abaddi N., Duke A., Cerussi A.E., Brenner M., Tromberg B.J. Non-invasive *in vivo* monitoring of methemoglobin formation and reduction with broadband diffuse optical spectroscopy. *J. Appl. Physiol.* 2006; 100 (2): 615–622. DOI: 10.1152/jappphysiol.00424.2004. PMID: 16223982
4. Minami M., Katsumata M., Tomoda A. Methemoglobinemia with oxidized hemoglobins and modified hemoglobins found in bloods of workers handling aromatic compounds and in those of a man who drank cresol solution. *Biomed. Biochim. Acta.* 1990; 49 (2-3): S327-S333. PMID: 2386523
5. Greenberg M.I. Methylene Blue: fast-acting antidote for methemoglobinemia. *Emerg. Med. News.* 2001; 23 (9): 26. DOI: 10.1097/01.EEM.0000292322.94148.37
6. Skold A., Cosco D.L., Klein R. Methemoglobinemia: pathogenesis, diagnosis, and management. *South Med. J.* 2011; 104 (11): 757–761. DOI: 10.1097/SMJ.0b013e318232139f. PMID: 22024786
7. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Zavalova A., Kuzovlev A. Nanoparticles of perfluorocarbon emulsion contribute to the reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin. *Int. J. Pharm.* 2016; 497 (1): 88-95. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.11.035. PMID: 26626224
8. CYTOFLAVIN solution for intravenous use. [http://eng.polysan.ru/cytoflavin\\_amp.htm](http://eng.polysan.ru/cytoflavin_amp.htm)
9. Tiuriaeva I.I., Kuranova M.L., Gonchar I.V., Rozanov Iu.M. The energy-corrective and antioxidative effect of cytoflavin in the postischemic period of human dermal fibroblasts *in vitro*. *Cell Tiss. Biol.* 2012; 6 (4): 367–375. DOI: 10.1134/S1990519X1204013X
10. Rumyantseva S.A., Kovalenko A.L., Silina E.V., Stupin V.A., Kabaeva E.N., Chichanovskaya L.V., Nazarov M.V., Tsukurova L.A., Burenichev D.V., Golikov K.V., Sa'nikov M.V., Belova L.A., Mashin V.V., Mazina N.K., Zhilina E.A., Kolotik-Kameneva O.Yu., Sherman M.A. Efficacy of complex antioxidant energy correction of different durations in the treatment of cerebral infarction (results of a multicenter randomized study). *Neurosci. Behav. Physiol.* 2017; 47 (3): 288–295. DOI: 10.1007/s11055-017-0395-1

## References

1. Bradberry S.M. Occupational methaemoglobinaemia. Mechanisms of production, features, diagnosis and management including the use of methylene blue. *Toxicol. Rev.* 2003; 22 (1): 13-27. DOI: 10.2165/00139709-200322010-00003. PMID: 14579544
2. Kohn M.C., Melnick R.L., Ye F., Portier C.J. Pharmacokinetics of sodium nitrite-induced methemoglobinemia in the rat. *Drug. Metab. Dispos.* 2002; 30 (6): 676–683. DOI: 10.1124/dmd.30.6.676. PMID: 12019195
3. Lee J., El-Abaddi N., Duke A., Cerussi A.E., Brenner M., Tromberg B.J. Non-invasive *in vivo* monitoring of methemoglobin formation and reduction with broadband diffuse optical spectroscopy. *J. Appl. Physiol.* 2006; 100 (2): 615–622. DOI: 10.1152/jappphysiol.00424.2004. PMID: 16223982
4. Minami M., Katsumata M., Tomoda A. Methemoglobinemia with oxidized hemoglobins and modified hemoglobins found in bloods of workers handling aromatic compounds and in those of a man who drank cresol solution. *Biomed. Biochim. Acta.* 1990; 49 (2-3): S327-S333. PMID: 2386523
5. Greenberg M.I. Methylene Blue: fast-acting antidote for methemoglobinemia. *Emerg. Med. News.* 2001; 23 (9): 26. DOI: 10.1097/01.EEM.0000292322.94148.37
6. Skold A., Cosco D.L., Klein R. Methemoglobinemia: pathogenesis, diagnosis, and management. *South Med. J.* 2011; 104 (11): 757–761. DOI: 10.1097/SMJ.0b013e318232139f. PMID: 22024786
7. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Zavalova A., Kuzovlev A. Nanoparticles of perfluorocarbon emulsion contribute to the reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin. *Int. J. Pharm.* 2016; 497 (1): 88-95. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.11.035. PMID: 26626224
8. CYTOFLAVIN solution for intravenous use. [http://eng.polysan.ru/cytoflavin\\_amp.htm](http://eng.polysan.ru/cytoflavin_amp.htm)
9. Tiuriaeva I.I., Kuranova M.L., Gonchar I.V., Rozanov Iu.M. The energy-corrective and antioxidative effect of cytoflavin in the postischemic period of human dermal fibroblasts *in vitro*. *Cell Tiss. Biol.* 2012; 6 (4): 367–375. DOI: 10.1134/S1990519X1204013X
10. Rumyantseva S.A., Kovalenko A.L., Silina E.V., Stupin V.A., Kabaeva E.N., Chichanovskaya L.V., Nazarov M.V., Tsukurova L.A., Burenichev D.V., Golikov K.V., Sa'nikov M.V., Belova L.A., Mashin V.V., Mazina N.K., Zhilina E.A., Kolotik-Kameneva O.Yu., Sherman M.A. Efficacy of complex antioxidant energy correction of different durations in the treatment of cerebral infarction (results of a multicenter randomized study). *Neurosci. Behav. Physiol.* 2017; 47 (3): 288–295. DOI: 10.1007/s11055-017-0395-1

11. *Bellavia L., DuMond J.F., Perlegas A., Bruce King S., Kim-Shapiro D.B.* Nitroxyl accelerates the oxidation of oxyhemoglobin by nitrite. *Nitric Oxide*. 2013; 31: 38–47. DOI: 10.1016/j.niox.2013.03.006. PMID: 23545404
12. *Navati M.S., Friedman J.M.* Reactivity of glass-embedded met hemoglobin derivatives toward external NO: implications for nitrite-mediated production of bioactive NO. *J. Am. Chem. Soc.* 2009; 131 (34): 12273–12279. DOI: 10.1021/ja903364h. PMID: 19663497
13. *Jensen F.B.* Nitric oxide formation from nitrite in zebrafish. *J. Exp. Biol.* 2007; 210 (19): 3387–3394. DOI: 10.1242/jeb.008748. PMID: 17872992
14. *Wang D., Piknova B., Solomon S.B., Cortes-Puch I., Kern S.J., Sun J., Kanias T., Gladwin M.T., Helms C., Kim-Shapiro D.B., Schechter A.N., Natanson C.* *In vivo* reduction of cell-free methemoglobin to oxyhemoglobin results in vasoconstriction in canines. *Transfusion*. 2013; 53 (12): 3149–3163. DOI: 10.1111/trf.12162. PMID: 23488474
15. *Katsumata M.* An industrial toxicological study on workers who synthesize aminophenol and anisidine from chloronitrobenzene. *Nihon. Ika. Daigaku Zasshi*. 1994; 61 (6): 590–601. DOI: 10.1272/jnms1923.61.590. PMID: 7829653
16. *Patel R.P., Hogg N., Kim-Shapiro D.B.* The potential role of the red blood cell in nitrite-dependent regulation of blood flow. *Cardiovasc. Res.* 2011; 89 (3): 507–515. DOI: 10.1093/cvr/cvq323. PMID: 20952416
17. *Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Gudkova O., Kuzovlev A.* Nanodeficiencies of membranes cause destruction of packed red blood cells during long-term storage. *Exp. Cell Res.* 2015; 337 (2): 192–201. DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.07.009. PMID: 26169694
18. *Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Gudkova O., Sergunova V., Kuzovlev A.* Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action. *Sci. Rep.* 2014; 4: 6033. DOI: 10.1038/srep0603. PMID: 25112597
19. *Kozlova E.K., Chernysh A.M., Moroz V.V., Kuzovlev A.N.* Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space fourier transform of AFM images. *Micron*. 2013; 44: 218–227. DOI: 10.1016/j.micron.2012.06.012. PMID: 22854216
20. *Hopmann K.H., Cardey B., Gladwin M.T., Kim-Shapiro D.B., Ghosh A.* Hemoglobin as a nitrite anhydrase: modeling methemoglobin-mediated N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> formation. *Chemistry*. 2011; 17 (23): 6348–6358. DOI: 10.1002/chem.201003578. PMID: 21590821
21. *Бузунова С.А.* Клинические и патогенетические подходы в терапии нейроинфекций. *Вестн. Новгородского Гос. университета*. 2011; 62: 101–104.
22. *Гудкова А.Н., Осиновская Н.А., Полунина А.Г., Гехт А.Б.* Исследование влияния цитофлавина на симптомы депрессии и вегетативные нарушения у пациентов с органическим депрессивным расстройством. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2013; 113 (12-1): 50–55. PMID: 24430035
23. *Ponomarev E.A., Maskin S.S., Strepetov N.N., Mochailo Yu.A., Pchelintsev K. E.* Pharmacological neuroprotection of the brain during carotid artery surgery. *Neurosci. Behav. Physi.* 2013; 43 (1): 76–78. DOI: 10.1007/s11055-012-9693-9
24. *Kim H.M., Jung H.S., Shin H.Y., Jung K.Y.* Inhibition of mast cell-dependent anaphylaxis by succinic acid. *Pharmacol. Toxicol.* 1999; 84 (4): 154–158. DOI: 10.1111/j.1600-0773.1999.tb00892.x. PMID: 10227065
25. *Зарубина И.В., Лукк М.В., Шабанов П.Д.* Антигипоксические и антиоксидантные эффекты экзогенной янтарной кислоты и аминокислотных сукцинатсодержащих антигипоксикантов. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2012; 153 (3): 313–317. DOI: 10.1007/s10517-012-1709-5. PMID: 22866305
26. *Ericson D., Thompson J.* Arginine-containing compositions and methods for treating red blood cells. Patent № US 8,980,542 B2.
27. *Livesey S., Burnett M., Connor J., Wagner C.* Composition for cryopreservation comprising nicotinamide, glycerol and red blood cells. Patent № US 8,895,236 B2.
28. *Vasilaki A., McMillan D., Kinsella J., Duncan A., O'Reilly D., Talwar D.* Relation between riboflavin, flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide concentrations in plasma and red cells in patients with critical illness. *Clin. Chim. Acta*. 2010; 411 (21-22): 1750–1755. DOI: 10.1016/j.cca.2010.07.024. PMID: 20667447
29. *Orita A., Verde M., Sakai M., Meng Y.A.* Biomimetic redox flow battery based on flavin mononucleotide. *Nat. Commun.* 2016; 7: 13230. DOI: 10.1038/ncomms13230. PMID: 27767026
11. *Bellavia L., DuMond J.F., Perlegas A., Bruce King S., Kim-Shapiro D.B.* Nitroxyl accelerates the oxidation of oxyhemoglobin by nitrite. *Nitric Oxide*. 2013; 31: 38–47. DOI: 10.1016/j.niox.2013.03.006. PMID: 23545404
12. *Navati M.S., Friedman J.M.* Reactivity of glass-embedded met hemoglobin derivatives toward external NO: implications for nitrite-mediated production of bioactive NO. *J. Am. Chem. Soc.* 2009; 131 (34): 12273–12279. DOI: 10.1021/ja903364h. PMID: 19663497
13. *Jensen F.B.* Nitric oxide formation from nitrite in zebrafish. *J. Exp. Biol.* 2007; 210 (19): 3387–3394. DOI: 10.1242/jeb.008748. PMID: 17872992
14. *Wang D., Piknova B., Solomon S.B., Cortes-Puch I., Kern S.J., Sun J., Kanias T., Gladwin M.T., Helms C., Kim-Shapiro D.B., Schechter A.N., Natanson C.* *In vivo* reduction of cell-free methemoglobin to oxyhemoglobin results in vasoconstriction in canines. *Transfusion*. 2013; 53 (12): 3149–3163. DOI: 10.1111/trf.12162. PMID: 23488474
15. *Katsumata M.* An industrial toxicological study on workers who synthesize aminophenol and anisidine from chloronitrobenzene. *Nihon. Ika. Daigaku Zasshi*. 1994; 61 (6): 590–601. DOI: 10.1272/jnms1923.61.590. PMID: 7829653
16. *Patel R.P., Hogg N., Kim-Shapiro D.B.* The potential role of the red blood cell in nitrite-dependent regulation of blood flow. *Cardiovasc. Res.* 2011; 89 (3): 507–515. DOI: 10.1093/cvr/cvq323. PMID: 20952416
17. *Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Gudkova O., Kuzovlev A.* Nanodeficiencies of membranes cause destruction of packed red blood cells during long-term storage. *Exp. Cell Res.* 2015; 337 (2): 192–201. DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.07.009. PMID: 26169694
18. *Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Gudkova O., Sergunova V., Kuzovlev A.* Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action. *Sci. Rep.* 2014; 4: 6033. DOI: 10.1038/srep0603. PMID: 25112597
19. *Kozlova E.K., Chernysh A.M., Moroz V.V., Kuzovlev A.N.* Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space fourier transform of AFM images. *Micron*. 2013; 44: 218–227. DOI: 10.1016/j.micron.2012.06.012. PMID: 22854216
20. *Hopmann K.H., Cardey B., Gladwin M.T., Kim-Shapiro D.B., Ghosh A.* Hemoglobin as a nitrite anhydrase: modeling methemoglobin-mediated N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> formation. *Chemistry*. 2011; 17 (23): 6348–6358. DOI: 10.1002/chem.201003578. PMID: 21590821
21. *Buzunova S.A.* Clinical and pathogenetic approaches in therapy of neuroinfections. *Vestnik Novgorodskogo Gosudarstvennogo Universiteta*. 2011; 62: 101–104.
22. *Gudkova A.N., Osinovskaja N.A., Polunina A.G., Gekht A.B.* Investigation of the effects of cytoflavin on symptoms of depression and autonomic dysfunction in patients with organic depressive disorder. *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii Imeni S.S. Korsakova*. 2013; 113 (12-1): 50–55. PMID: 24430035. [In Russ., In Engl.]
23. *Ponomarev E.A., Maskin S.S., Strepetov N.N., Mochailo Yu.A., Pchelintsev K. E.* Pharmacological neuroprotection of the brain during carotid artery surgery. *Neurosci. Behav. Physi.* 2013; 43 (1): 76–78. DOI: 10.1007/s11055-012-9693-9
24. *Kim H.M., Jung H.S., Shin H.Y., Jung K.Y.* Inhibition of mast cell-dependent anaphylaxis by succinic acid. *Pharmacol. Toxicol.* 1999; 84 (4): 154–158. DOI: 10.1111/j.1600-0773.1999.tb00892.x. PMID: 10227065
25. *Zarubina I., Lukk M., Shabanov P.* Antihypoxic and antioxidant effects of exogenous succinic acid and aminothiol succinate-containing antihypoxants. *Byulleten Eksperimentalnoi Biologii i Meditsiny*. 2012; 153 (3): 336–339. DOI: 10.1007/s10517-012-1709-5. PMID: 22866305. [In Russ., In Engl.]
26. *Ericson D., Thompson J.* Arginine-containing compositions and methods for treating red blood cells. Patent № US 8,980,542 B2.
27. *Livesey S., Burnett M., Connor J., Wagner C.* Composition for cryopreservation comprising nicotinamide, glycerol and red blood cells. Patent № US 8,895,236 B2.
28. *Vasilaki A., McMillan D., Kinsella J., Duncan A., O'Reilly D., Talwar D.* Relation between riboflavin, flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide concentrations in plasma and red cells in patients with critical illness. *Clin. Chim. Acta*. 2010; 411 (21-22): 1750–1755. DOI: 10.1016/j.cca.2010.07.024. PMID: 20667447
29. *Orita A., Verde M., Sakai M., Meng Y.A.* Biomimetic redox flow battery based on flavin mononucleotide. *Nat. Commun.* 2016; 7: 13230. DOI: 10.1038/ncomms13230. PMID: 27767026

Поступила 23.01.18

Received 23.01.18