БИОФИЗИКА, 2024, том 69, № 2, с. 349–355

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 577.3

СОХРАНЕНИЕ ГИПОТЕНЗИВНОЙ АКТИВНОСТИ У ЛИОФИЛИЗОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДИНИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С ГЛУТАТИОНОМ («ОКСАКОМА»), ХРАНИВШИХСЯ В ТЕЧЕНИЕ 15 ЛЕТ ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

© 2024 г. А.Ф. Ванин*, #, А.А. Абрамов, А.А. Тимошин**, В.Л. Лакомкин**, Н.А. Ткачев***

**Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия*

***Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. Е.И. Чазова Минздрава РФ, ул. Академика Чазова, 15а, Москва, 121552, Россия*

#E-mail: vanin.dnic@gmail.com

Поступила в редакцию 19.12.2023 г.
После доработки 20.12.2023 г.
Принята к публикации 10.01.2024 г.

Продемонстрировано полное сохранение у препарата «Оксаком» гипотензивной активности, обусловленной наличием у этого препарата биядерной формы динитрозильного комплекса железа с глутатионом, при хранении этого лиофильно высушенного препарата в откачанной от воздуха ампуле в течение 15 лет при комнатной температуре. Предполагается, что окисление лигандов глутатиона в составе динитрозильных комплексов железа постепенно проникавшем в препарат воздухом, которое могло бы привести к распаду этих комплексов, предотвращалось значительным количеством имевшегося в этом препарате свободного (не включенного в динитрозильные комплексы железа) глутатиона.

Ключевые слова: оксид азота, динитрозильные комплексы железа, глутатион, гипотензия.

DOI: 10.31857/S0006302924020174, **EDN:** OTQFQM

В 2008–2010 гг. в Российском Кардиологическом научно-производственном комплексе Минздрава РФ (РКНПК, Москва, Россия) на основе биядерного динитрозильного комплекса железа (ДНКЖ) с глутатионом (Б-ДНКЖ-GSH) был создан препарат, названный «Оксакомом», характеризующийся высокой вазодилататорной и гипотензивной активностью [1]. Присутствующий в нем Б-ДНКЖ-GSH был получен в реакции S-нитрозоглутатиона (GS-NO), двухвалентного железа (Fe^{2+}) и глутатиона (GSH). На первой стадии этого процесса при смешивании указанных реагентов в растворе в соответствии со схемой 1 возникали моноядерные ДНКЖ с глутатионом (М-ДНКЖ-GSH) с последующим образованием из них Б-ДНКЖ-GSH в соответствии со схемой 2.

М-ДНКЖ-GSH возникали в результате реакции диспропорционирования (взаимного одноэлектронного окисления-восстановления) двух молекул GS-NO, попарно связанных с ионом Fe^{2+}. В результате этой реакции возникали неустойчивые окисленная и восстановленная формы GS-NO – NO^+-$GS^\bullet$ и NO-GS^-, распадавшиеся с высвобождением из лигандного окружения железа тиильного радикала ($GS^\bullet$) и ионизованного GS^- при сохранении в этом окружении катиона нитрозония (NO^+) и молекулы NO, что и приводило к образованию М-ДНКЖ-GSH с резонансной структурой $[(GS^-)_2Fe^{2+}(NO)(NO^+)]$. Такая же резонансная структура железо-динитрозильного фрагмента оставалась характерной для Б-ДНКЖ-GSH [2, 5].

Характерное для железо-динитрозильного фрагмента одинаковое наличие молекулы NO и катиона нитрозония делает возможным для М- и Б-ДНКЖ в соответствии с химическим равновесием между этими комплексами и составляющими их компонентами равноэффективно функционировать в качестве как доноров NO, так и доноров NO^+ [5, 7].

Сокращения: ДНКЖ – динитрозильный комплекс железа, Б-ДНКЖ-GSH – биядерный динитрозильный комплекс железа с глутатионом, GS-NO – S-нитрозоглутатион, GSH – глутатион, М-ДНКЖ-GSH – моноядерный динитрозильный комплекс железа с глутатионом, САД – среднее артериальное давление.

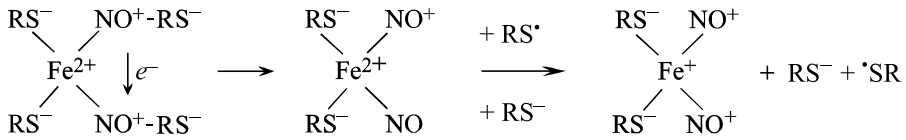

Схема 1. Образование моноядерных ДНКЖ с глутатионом (RS^- – молекулы глутатиона, ионизованные по тиоловой группе [2–6]).

$$2[(RS^-)_2Fe^{2+}(NO)(NO^+)]^+ \longleftrightarrow [(RS^-)_2Fe_2^{2+}(NO)_2(NO^+)_2]^{4+} + 2RS^-$$

Схема 2. Образование биядерных ДНКЖ с глутатионом из М-ДНКЖ-GSH.

В соответствии с протоколом синтеза Б-ДНКЖ-GSH в 500 мл 19 мМ цитрат-фосфатного буфера при pH 7.4, содержавшего (в пересчете на один атом железа) 5 мМ синтезированного Б-ДНКЖ-GSH, были представлены 33 мМ GSH, 5 мМ дисульфида GSH, 5 мМ GS-NO и 12.5 г декстрана (мол. масса 40 кДа). Раствор, разлитый в ампулы по 3 мл, лиофильно высушивали, после чего вакуумированные ампулы с высушенным препаратом (препаратом «Оксаком»), плотно закрывали резиновой пробкой с алюминиевым ободком для последующего хранения на воздухе при комнатной температуре [1]. Результаты проверки гипотензивного действия этого препарата через несколько месяцев после изготовления приведены в работе [1].

Цель настоящего исследования состояла в оценке гипотензивной активности и физико-химических параметров полученных таким образом препаратов «Оксакома» через 13–15 лет их хранения при комнатной температуре в темноте. Предполагалось, что это исследование позволит понять, какие факторы могут влиять на сохранение этой активности у препаратов «Оксакома» при их длительном хранении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В экспериментах использовали синтезированные в 2008 и 2009 гг. и хранившиеся в РКНПК Минздрава РФ гипотензивные препараты «Оксакома», содержащие в качестве биологически активного компонента Б-ДНКЖ-GSH, – соответственно препараты 1 и 2 [1]. GSH, использованный в опытах на растворах «Оксакома», был приобретен на фирме Sigma (США).

Оптические измерения. Оптические измерения растворов «Оксакома» проводили при комнатной температуре на спектрофотометре UF-2501PC (Shimadzu, Europa GmBH, Германия) с использованем плоской кварцевой кюветы с длиной оптического пути 10 мм. Концентрацию Б-ДНКЖ-GSH в растворах препаратов «Оксакома» оценивали по интенсивности одной из полос поглощения комплекса (на 360 нм) с коэффициентом экстинкции (в пересчете на один атом железа в Б-ДНКЖ) $\varepsilon = 3700\ M^{-1}см^{-1}$ [5]. Оптические измерения проводили после десятикратного разбавления дистиллированной водой растворов препаратов 1 и 2, увлажненных перед этим 3 мл дистиллированной воды.

ЭПР-измерения. Спектры ЭПР замороженных растворов препаратов 1 регистрировали на радиоспектрометре X-диапазона Varian 109E (Varian, США) при 77 K. Оценку концентрации М-ДНКЖ-GSH, ответственных за их ЭПР-сигнал, проводили методом двойного интегрирования с использованием в качестве стандарта замороженного раствора моноядерных ДНКЖ с глутатионом с известной концентрацией комплексов.

Определение среднего артериального давления у крыс, характерного для крови, циркулирующей в большом круге кровообращения, проводили по методике, описанной в работе [8]. Были использованы крысы-самцы стока Wistar массой 300–350 г и возрастом пять-шесть месяцев. Животных содержали в биоклинике РКНПК в клетках по пять особей со свободным доступом к сухим кормам и воде. Световой режим контролировали (12 часов освещения, 12 часов затемнения) при достаточной смене объемов воздуха и температуре 19–23°C. Под золетиловым наркозом (5–7 мг/кг) выполняли катетеризацию левого желудочка при помощи стандартного Милларовского катетера, вводимого через правую сонную артерию, и усилителя SP200 (Transonic, Канада). Использовали программное обеспечение LabChart ADInstruments 8.1.2 (Австралия) для регистрации среднего давления в аорте.

Соблюдение этических норм при работе с животными. В ходе работы неукоснительно соблюдались положения Руководства по уходу и использованию лабораторных животных (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Washington D.C., 2011) и другие нормы международного права, регулирующие содержание и использование лабораторных животных с точки зрения гуманного обращения с животными и их рационального использования.

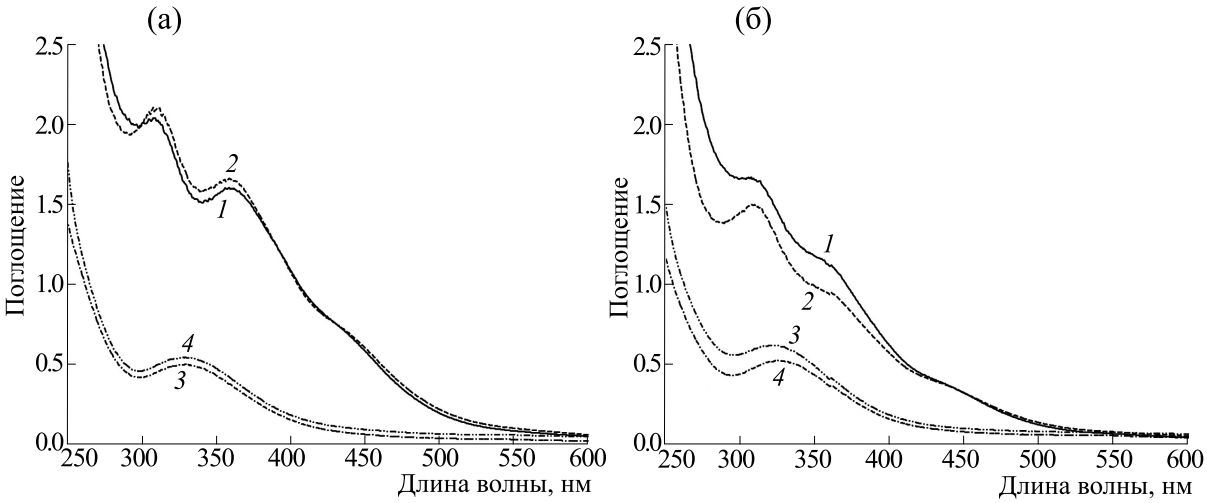

Рис. 1. Типичные спектры поглощения, характерные для представителей препаратов «Оксакома» из двух их наборов – препаратов 1 (а) и 2 (б), синтезированных в 2008–2009 гг.: спектры *1* – исходные препараты, растворенные в 3 мл дистиллированной воды и разбавленные ею в 10 раз; спектры *2* – те же препараты после снижения pH их растворов до 1–2; спектры *3* – подкисленные препараты 1 и 2 после 50 с прогрева на воздухе при 80°C; спектры *4* – предыдущие препараты после добавления к ним 30 мМ GSH.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физико-химические параметры препаратов 1 и 2. Регистрация оптических спектров препаратов «Оксакома» из двух их наборов, синтезированных в 2008–2009 гг., продемонстрировала существенное различие в концентрации Б-ДНКЖ-GSH в составе этих препаратов. Как следует из интенсивности полос этих спектров на 310 и 360 нм, для одного из этих наборов (препарат 1) обнаруживалось практически полное сохранение Б-ДНКЖ-GSH в препаратах (4.8 ± 0.3 мМ против исходного уровня – 5.0 ± 0.3 мМ), тогда как для другого набора (препарат 2) концентрация Б-ДНКЖ-GSH составляла лишь 3.0 ± 0.4 мМ (рис. 1, спектры *1*).

Подкисление препаратов 1 до pH 1–2 не сказывалось на содержании в них Б-ДНКЖ-GSH (рис. 1а, спектр *2*). Оно заметно снижалось при аналогичном воздействии на препараты 2 (рис. 1б, спектр *2*). Прогрев этих подкисленных препаратов при 80°C на воздухе в течение не более 1 мин приводил, судя по спектрам поглощения этих препаратов, к полному исчезновению из них Б-ДНКЖ-GSH и появлению спектра поглощения, напоминающего спектр поглощения GS-NO с максимумом соответственно на 328 и 320 нм (рис. 1, спектры *3*). Сдвиг этого максимума с 334 нм, характерного для GS-NO, в коротковолновую область был обусловлен наложением на спектр поглощения GS-NO полосы поглощения ионов Fe^{3+} на 302 нм, высвобождающегося из распадающихся Б-ДНКЖ-GSH [9]. Интенсивность этой полосы усиливалась в препаратах 2 после введения в раствор 30 мМ GSH, вызывавших дополнительное понижение pH.

Трансформация исходного спектра поглощения Б-ДНКЖ-GSH при прогреве препаратов 1 и 2 при 80°C в спектр, близкий по параметрам к спектру GS-NO, как было показано нами ранее, была обусловлена высвобождением из распадающихся Б-ДНКЖ-GSH катионов нитрозония, связывающихся с GSH с образованием GS-NO. В соответствии с работами [10, 11], этот процесс мог столь быстро (в течение менее минуты) происходить при прогреве препаратов 1 и 2 при 80°C только при концентрации свободного (не включенного в Б-ДНКЖ) GSH в растворе, превышающей содержание Б-ДНКЖ не более чем в 2–3 раза. Это означает, что при длительном хранении (пятнадцатигодовом хранении лиофилизованных препаратов 1 и 2 при комнатной температуре) содержание свободного GSH в них существенно снижалось: его соотношение с уровнем Б-ДНКЖ должно было составлять 2–3 против 6.6 в исходных, только что синтезированных препаратах, очевидно, в результате контакта препаратов с воздухом, постепенно проникавшим в закрытые, откачанные ампулы, содержавшие эти препараты. Очевидно, более эффективно воздух проникал в препара-ты 2, что и могло приводить к более выраженному снижению количества Б-ДНКЖ-GSH. Это предположение подтверждается результатами опытов по подщелачиванию растворов препаратов 1 и 2, показанных на рис. 2, до pH 10–11.

Эта процедура приводила к изменению формы спектра поглощения препарата 1 – его смещению в длинноволновую область (рис. 2а, спектр *2*), характерную для спектра оптического поглощения М-ДНКЖ-GSH. Этот спектр (без примеси спек-

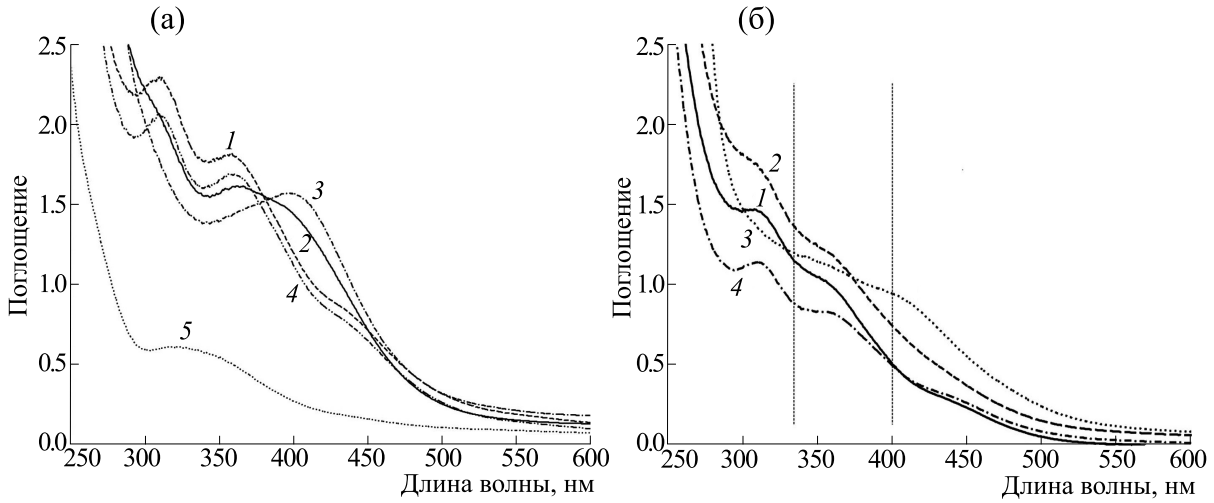

Рис. 2. Типичное изменение спектров поглощения препаратов 1 (а) и 2 (б) при их подщелачивании: спектры *1* – исходные препараты, растворенные в 3 мл дистиллированной воды и разбавленные затем дистиллированной водой в 10 раз; спектры *2* – те же препараты после их подщелачивания до pH 10–11; спектры *3* – препараты после подщелачивания до pH 10–11 в присутствии добавленного GSH (30 мМ); спектры *4* – предыдущие препараты после их подкисления до pH 1–2. Спектр *5* на рис. (а) – препарат, характеризующийся спектром 4, прогретый при 80°C. Этот спектр был зарегистрирован только через 10 мин прогрева.

тра Б-ДНКЖ) регистрировался при pH 10–11 после добавления к 0.5 мМ раствору препарата 1 в оптической кювете 30 мМ GSH (рис. 2а, спектр *3*). Подщелачивание такого же раствора препарата 2 не приводило к изменению формы спектра Б-ДНКЖ-GSH (рис. 2б, спектр *2*). Его оптическое поглощение начинало сдвигаться в длинноволновую область лишь после добавления в этот раствор в оптической кювете 30 мМ GSH (рис. 2б, спектр *3*).

Характерно, что после подкисления препарата 1, характеризующегося спектром поглощения М-ДНКЖ-GSH (рис. 2а, спектр *3*), последний трансформировался в спектр, характерный для Б-ДНКЖ-GSH (рис. 2а, спектр *4*). Последующий прогрев этих растворов на воздухе при 80°C приводил к трансформации спектра Б-ДНКЖ-GSH в спектр, близкий к спектру поглощения GS-NO (рис. 2б, спектр *5*). Однако в этом случае для появления последнего требовалось прогревать раствор Б-ДНКЖ-GSH более 10 мин – вместо 1 минуты прогрева, что было достаточно для появления GS-NO в препарате 1 без добавления к нему 30 мМ GSH (рис. 1а, спектр *3*). Это замедление было обусловлено, очевидно, стабилизирующим действием избытка GSH на Б-ДНКЖ-GSH. При снижении концентрации GSH, добавлямого к 0.5 мМ раствору препарата 1, в 10 раз (до 3.3 мМ), время его прогрева, необходимого для появления спектра GS-NO, снижалось до 5 мин (спектр не приводится).

Судя по изменениям спектров, приведенных на рис. 2, для обоих препаратов подщелачивание без добавления GSH не приводило к полному превращению Б-ДНКЖ в М-ДНКЖ. Такое превращение имело место, особенно для препарата 1, только после подщелачивания раствора в присутствии 30 мМ GSH. Этот результат, как и приведенные выше на рис. 1 данные, свидетельствует о резком снижении уровня свободного GSH в препаратах при их длительном хранении в лиофилизованном состоянии — его становилось недостаточно для превращения в соответствии со схемой 2 Б-ДНКЖ в моноядерную форму ДНКЖ.

Это превращение иллюстрируется регистрацией сигнала ЭПР при $g_{\perp} = 2.04$ и $g_{\parallel} = 2.014$, $g_{ср} = 2.03$ (рис. 3), характерного для М-ДНКЖ-GSH [5], в препарате 1 после его подщелачиваня как в отсутствие, так и в присутствии 30 мМ GSH. Как следует из рис. 3, добавление этого тиола к препарату 1 практически не сказывалось на интенсивности регистрируемого сигнала ЭПР, т. е. на концентрации М-ДНКЖ-GSH, ответственного за этот сигнал.

Как следует из сопоставления приведенных на рис. 2б спектров *2* и *3*, этот ЭПР-результат не согласуется с интенсивностью оптического поглощения препарата 1, обусловленного появлением М-ДНКЖ-GSH в этом препарате при его подщелачивании в отсутствие и в присутствии 30 мМ GSH (в спектр *2* значительный вклад вносит сохранившийся Б-ДНКЖ-GSH). Это несоответствие могло быть обусловлено «эффектом высаливания» (эффектом концентрирования) молекул GSH и М-ДНКЖ-GSH при замораживании раствора препарата 1 в жидком азоте. В результате даже небольшого количества GSH в препарате 1 было достаточно, чтобы значительная часть

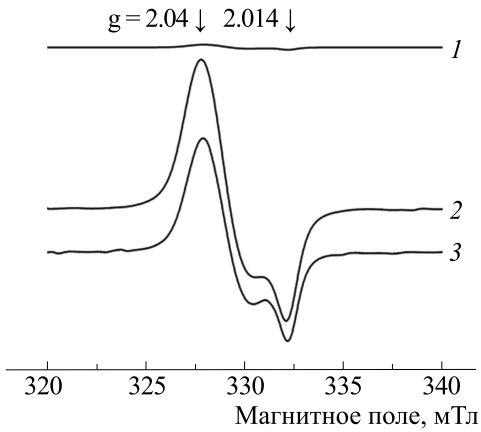

Рис. 3. Сигнал ЭПР препарата 1 до подщелачивания (сигнал *1*) и после подщелачивания до pH 10–11 в отсутствии и присутствии 30 мМ GSH (соответственно сигналы *2* и *3*). Сигнал *3* зарегистрирован при усилении радиоспектрометра, в 1.5 раза меньшем, чем сигналы *1* и *2*.

Б-ДНКЖ, реагируя с этим концентрированным реагентом, переходила бы в парамагнитную моноядерную форму ДНКЖ. После оттаивания растворов препаратов 1 и 2 М-ДНКЖ-GSH трансформировался в исходную биядерную форму, характеризующуюся спектром поглощения, приведенным на рис. 2а, спектр *4*.

Гипотензивная активность препарата 1. Проверка гипотензивной активности препарата 1 показала, что эта активность полностью сохранилась, и при дозе Б-ДНКЖ-GSH 0.6 микромолей/кг веса животного (крысы) она была практически идентична гипотензивной активности исходного препарата того же комплекса, при проверке этой активности в опытах на животных при введении им «Оксакома» в дозе Б-ДНКЖ-GSH 0.8 микромолей на кг в опытах, проведенных в 2011 г. (рис. 1 в работе [1]).

Как следует из рис. 4, при внутривенном введении препарата 1 вначале наблюдалось быстрое снижение среднего артериального давления (САД) на 60 мм рт. ст. с последующим его подъемом на 30 мм рт. ст. и последующей длительной стабилизацией САД на пониженном уровне, т. е. наблюдалась та же кинетика изменения САД, что и в аналогичных опытах, проведенных в 2011 г.

При понижении дозы препарата 1 в два раза наблюдалась аналогичная кинетика, но амплитуда снижения САД уменьшалась примерно в два раза.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основной результат работы состоит в том, что в исходно откачанных от воздуха и лиофильно высушенных в присутствии декстрана препаратах «Оксакома», содержащих в качестве биологически активного компонента Б-ДНКЖ-GSH, содержание этого компонента может сохраняться без изменения в течение более десятка лет (и даже не менее 15 лет). В результате за это время полностью сохраняется обусловленная Б-ДНКЖ-GSH гипотензивная активность «Оксакома». Единственное, что происходит с этими препаратами при их хранении при комнатной температуре – это снижение примерно в три раза содержания в них «свободного» GSH, не включенного в Б-ДНКЖ-GSH. При концентрации комплексов ~5 мМ концентрация свободного GSH снижается не более чем до 2 мМ, о чем свидетельствует быстрый распад препарата 1 при 0.5 мМ концентрации Б-ДНКЖ-GSH в ходе прогрева подкисленного

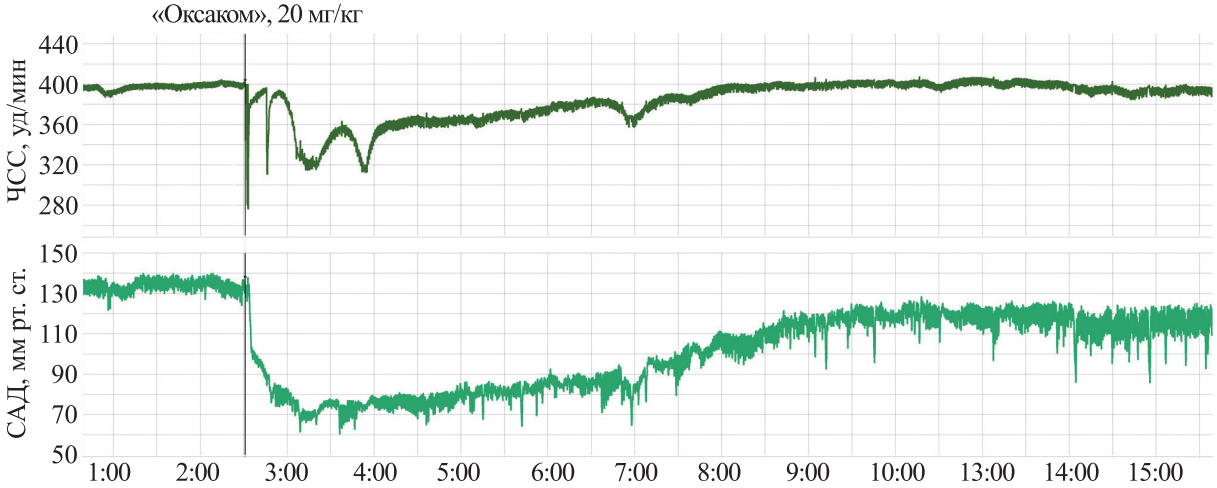

Рис. 4. Влияние водного раствора препарата 1, вводившегося внутривенно крысе и соответствующего дозе 0.6 микромолей/кг Б-ДНКЖ-GSH, на частоту сердечных сокращения (ЧСС, верхняя кривая) и среднее артериальное давление (САД, нижняя кривая).

раствора препарата при 80°C не более чем за 50 с. При повышении концентрации свободного GSH в этом растворе до 3.3 мМ время такого распада, сопровождавшегося появлением в растворе GS-NO, повышалось до 4.5 мин, а при повышении концентрации этого тиола в растворе препарата 1 до 30 мМ — до 12 мин.

По-видимому, снижение содержания свободного GSH в препарате 1, как и в препарате 2, было обусловлено постепенным, длительным проникновением влажного воздуха в исходно лиофилизованный, вакуумированный препарат через алюминиевую и резиновую крышки препарата, что приводило к постепенному окислению свободного GSH. В препарате 2 этот процесс мог идти быстрее, возможно, из-за более худшего, чем в препарате 1, изготовления системы изоляции препарата 2 (алюминиевой и резиновой крышек) от воздуха. Не исключено также, что в препарате 2 в ходе синтеза входящего в него Б-ДНКЖ-GSH было снижена общая исходная концентрация GSH – вместо 50 мМ было использовано не более 40–45 мМ этого тиола. В результате в препарате 2 уровень свободного GSH мог при его длительном хранении быстрее достигать низких значений, что приводило к последующему распаду Б-ДНКЖ-GSH до ~ 3 мМ. Результаты наших предыдущих исследований показали, что при снижении исходной концентрации GSH, как и других тиолов (RSH), при синтезе Б-ДНКЖ-RSH стабильность этих комплексов резко снижалась [10, 11].

Не исключено, что сохранение уровня Б-ДНКЖ-GSH в препарате 1 (и как следствие этого – сохранение гипотензивной активности этого препарата) было обусловлено высокой исходной концентрацией GSH, использованной при синтезе его биологически активного компонента – Б-ДНКЖ-GSH (50 мМ) [1]. За 15 лет хранения этого препарата содержание в нем свободного GSH в результате его постепенного окисления подошло к критическому нижнему уровню – ~2 мМ, после которого при более длительном хранении препарата 1 начался бы распад Б-ДНКЖ-GSH, а следовательно, и снижение его гипотензивной активности.

Итак, проведенные нами исследования продемонстрировали высокую стабильность препарата «Оксаком» как носителя Б-ДНКЖ-GSH, ответственного за гипотензивную активность этого препарата. Эта стабильность обеспечивалась лиофильным высушиванием водного раствора препарата с последующим его вакуумированием. Существенное значение могло иметь и повышенное содержание в препарате «Оксаком» свободного GSH, «защищавшего» от окисления поступающим в препарат воздухом молекулы этого тиола, включенного в лигандную сферу Б-ДНКЖ-GSH.

Очевидно, что обнаружение высокой (многолетней) стабильности Б-ДНКЖ-GSH в составе лиофильно высушенного препарата «Оксаком» имеет существенное значение для создания на основе ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, характеризующихся разнообразными проявлениями биологической активности, соответствующих лекарственных средств с различным терапевтическим действием [12].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-00009).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с крысами проводили в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации и положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 18, III.1986). Экспериментальный протокол исследования был одобрен комиссией по биоэтике ФГБУ «НМИЦ кардиологии им. академика Е.И. Чазова» МЗ РФ (регистрационный номер протокола заседания № ЛЭПС/18.07.23 от 18 июля 2023г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. I. Chazov, O. V. Rodnenkov, A. V. Zorin, V. L. Lakomkin, V. V. Gramovich, O. N. Vyborov, A. G. Dragnev, A. A. Timoshin, L. I. Buryachkovskaya, A. A. Abramov, V. P. Massenko, E. V. Arzamastsev, V. I. Kapelko, and A. F. Vanin, Hypotensive effect of Oxacom® containing a dinitrosyl iron complex with glutathione: Animal studies and clinical trials on healthy volunteers. *Nitric Oxide*, **26** (3), 148–156 (2012). DOI: 10.1016/j.niox.2012.01.008
2. Vanin A. F., Malenkova I. V., and Serezhenkov V. A. Iron catalyzes both decomposition and synthesis of S-nitrosothiols: optical and electron paramagnetic resonance studies. *Nitric Oxide*, **1**, 191–203 (1997).
3. Costanzo S., Ménage S., Purrello R., Bonomo R. P., and Fontecave M. Re-Examination of the formation of dinitrosyl–iron complexes during reaction of S-nitrosothiols with Fe (II). *Inorg. Chim. Acta*, **318** (1–2), 1–7 (2001). DOI: 10.1016/S0020-1693(01)00402-9
4. Lo Bello M., Nuccetelli M., Cacurri A. M., Stella L., Parker M. W., Rossjohn J., McKinstry W. J., Mozzi A. F., Federici G., Polizio F., Pedersen J. Z., and Ricci G. Human glutathione transferase P1-1 and nitric oxide

carriers. *J. Biol. Chem*. **276**, 42138–42145 (2001). DOI: 10.1074/jbc.M102344200

5. Vanin A. F., Poltorakov A. P., Mikoyan V. D., Kubrina L. N., Burbaev D. S. Polynuclear water-soluble dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione ligands: Electron paramagnetic resonance and optical studies. *Nitric Oxide*, **23** (2), 136–149 (2011). DOI: 10.1016/j.niox.2010.05.285
6. Borodulin R. R., Kubrina L. N., Mikoyan V. D., Poltorakov A. P., Shvydkiy V. O., Burbaev D. Sh., Serezhenkov V. A., Yakhontova E. R., and Vanin A. F. Dinitrosyl iron complexes with glutathione as NO and NO^+ donors. *Nitric Oxide*, **29**, 4–16 (2013). DOI: 10.1016/j.niox.2012.11.001
7. Vanin A. F. and Burbaev D. Sh. Electronic and spatial structures of water-soluble dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands underlying their ability to act as nitric oxide and nitrosonium ion donors. *J. Biophys.*, **2011**, 878236 (2011). DOI: 10.1155/2011/878236
8. Vanin A. F., Pekshev A. V., Vagapov A. B., Sharapov N. A., Lakomkin V. L., Abramov A. A., Timoshin A. A., and Kapelko V. I. Gaseous nitric oxide and dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as potential medicines that can relieve COVID-19. *Biophysics*, **66** (1), 155–163 (2021). DOI: 10.1134/S0006350921010218
9. Ванин А. Ф., Микоян В. Д. и Ткачев Н. А. Высвобождение катионов нитрозония из динитрозильных комплексов железа при их распаде под действием анионов супероксида или этилендиаминтетраацетата. *Биофизика*, **67** (6), 1045–1055 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922060011
10. Ванин А. Ф. Свободно-радикальная природа молекул монооксида азота как фактор, определяющий их превращение в живых организмах в ионы нитрозония. *Биофизика*, **65** (3), 421–438 (2020). DOI: 10.31857/S0006302920030011
11. Ванин А. Ф. и Ткачев Н. И. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами как источники универсальных цитотоксинов – катионов нитрозония. *Биофизика*, **68**, 421–434 (2023). DOI: 10.31857/S0006302923030018, EDN: FPGKAY
12. Vanin A. F., *Dinitrosyl iron complexes as a "working form" of nitric oxide in living organisms* (Cambridge Scholars Publishing, Cambridge, UK, 2019).

Stability of Hypotensive Activity in Freeze-Dried Preparations of Dinitrozyl Iron Complexes with Glutathione ("Oxacom") throughout the Period of Storage for 15 Years at Ambient Temperature

A.F. Vanin*, A.A. Abramov, A.A. Timoshin**, V.L. Lakomkin**, and N.A. Tkachev***

**N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

***E.I. Chazov National Medical Research Center of Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Akademika Chazova 15a, Moscow, 121552 Russia*

It has been demonstrated that "Oxacom", a freeze-dried preparation, retains, throughout its period of storage in the ampoule in the absence of oxygen for 15 years at ambient temperature, the same hypotensive activity due to the presence of a binuclear form of dinitrosyl iron complex with glutathione. It is suggested that an oxidation reaction where glutathione ligands as constituents of dinitrosyl iron complexes react with the oxygen, the content of which gradually increase in the preparation, could lead to the degradation of these complexes, but it was prevented due to the presence of a considerable amount of free, not included in dinitrosyl iron complexes glutathione molecules in this preparation.

Keywords: nitric oxide, dinitrosyl iron complexes, glutathione, hypotension