

УДК 541.128.3:542.924:547.53539

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЛУТАТИОНА С РЕСВЕРАТРОЛОМ В ПРИСУТСТВИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА. КИНЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

© 2021 г. К. М. Зинатуллина<sup>а, \*</sup>, О. Т. Касаикина<sup>а</sup>,  
Н. П. Храмеева<sup>б</sup>, М. И. Индейкина<sup>б</sup>, А. С. Кононихин<sup>б</sup>

<sup>а</sup>ФГБУН Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,  
ул. Косыгина, 4, корп. 1, Москва, 119991 Россия

<sup>б</sup>ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: karinazinat11@gmail.com

Поступила в редакцию 13.10.2020 г.

После доработки 01.12.2020 г.

Принята к публикации 03.12.2020 г.

Исследованы кинетические закономерности взаимодействия глутатиона (GSH) с ненасыщенным фенолом ресвератролом (RVT) в деионизированной воде в присутствии пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). GSH, содержащий две карбоксильные группы, при физиологической концентрации (0.1–10 мМ) образует кислые растворы (pH 3–4); молекулы GSH ассоциируются в димеры. В этих условиях GSH относительно медленно окисляется кислородом воздуха, а реакция GSH с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> сопровождается выходом радикалов. Скорость генерирования тиольных радикалов ( $W_1$ ) составляет доли процента от скорости расщепления GSH, но ее достаточно для инициирования цепной тиол-ен реакции GSH с RVT. На основании полученных экспериментальных данных по кинетике процесса и составу продуктов, а также литературных сведений о реакциях GSH с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и тиольных радикалов, предложена кинетическая модель сложного процесса взаимодействия GSH с RVT в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в водной среде при 37°C. Модель включает 19 квазиэлементарных реакций с соответствующими константами скорости, в том числе, формирование промежуточных комплексов GSH–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и GSH–GSH, образование радикалов и их последующие превращения в реакциях с RVT и GSH в конечные продукты. Компьютерное моделирование на основе разработанной модели удовлетворительно описывает особенности кинетики процесса в широком диапазоне концентраций реагентов.

**Ключевые слова:** глутатион, пероксид водорода, тиольные радикалы, ресвератрол, тиол-ен реакции, кинетическая модель

DOI: 10.31857/S0453881121020131

### ВВЕДЕНИЕ

Глутатион (GSH) – природный эндогенный тиол, который содержится в биологических тканях и жидкостях в высоких концентрациях (0.1–10 мМ), на порядки превосходящих концентрации других компонентов антиоксидантной системы. Считается, что GSH регулирует функции белков и экспрессию генов, реагирует с гидроксильными и пероксильными радикалами, восстанавливает гидропероксиды, дисульфидные связи, предотвращает окисление протеинов [1–3]. В литературе отмечают существенные изменения в содержании глутатиона при развитии многих патологий, в том числе при болезнях Альцгеймера,

Паркинсона, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваниях [4–9].

Ранее мы детально исследовали механизм реакции GSH с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в среде бидистиллированной деионизированной воды [10–14]. Установлено, что взаимодействие GSH и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> сопровождается образованием радикалов [10, 11]. Методом ингибиторов с использованием оригинального акцептора радикалов [10, 15] было показано, что в деионизированной воде выход радикалов в реакции с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> наблюдается и в случае других тиолов: цистеина, гомоцистеина, ацетилцистеина. В [10] на основе своих и литературных данных была построена кинетическая модель взаимодействия GSH с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, включающая 13 квазиэлементарных реакций с соответствующими константами скорости, которая удовлетворительно описывала кинетические кривые расщепления GSH и иницирования радикалов (расщепления акцептора

**Сокращения и обозначения:** GSH – глутатион; RVT – ресвератрол;  $W_1$  – скорость генерирования тиольных радикалов; DTNB – 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота); PBS – фосфатно-солевой буфер;  $W_{RVT}$  – скорость расщепления RVT;  $W_{GSH}$  – скорость расщепления глутатиона.

радикалов). В [16] методом спиновых ловушек с использованием 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксида (DMPO) было показано, что при взаимодействии GSH с  $H_2O_2$  действительно образуются тиольные радикалы. Выход радикалов небольшой, но даже в таком количестве они могут инициировать цепные процессы. В [13, 14] установлено, что в присутствии  $H_2O_2$  в водных растворах инициируются цепные тиол-ен реакции GSH с ненасыщенными фенолами ресвератролом и кофейной кислотой. Реакции тиолов с олефинами (тиол-ен реакции, гидротиирование алкенов) с образованием тиоэфиров известны давно с 1905 г. [17]. Но в последние десятилетия им уделяется большое внимание в связи с возможностью селективного и стереоселективного синтеза разнообразных соединений в полимерной и медицинской химии [18–20]. Ресвератрол и кофейная кислота – растительные полифенолы, метаболиты биосин-

теза лигнина, содержат ненасыщенную связь в боковых заместителях ароматического каркаса. В последнее время эти фенолы, в особенности ресвератрол (RVT, 3,5,4'-тригидроксистильбен), привлекают внимание медиков и биохимиков в связи с так называемым “французским парадоксом” – необычно низким уровнем сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний при высококалорийном питании с обилием жиров, наблюдаемом в некоторых регионах Франции на фоне регулярного потребления красного вина [21, 22]. Благодаря наличию ненасыщенной связи, сопряженной с двумя фенольными фрагментами (схема 1), RVT может существовать в *транс*- и *цис*-форме, и активно реагировать с тиольными радикалами, которые с высокими константами скорости ( $\sim 10^5 M^{-1} s^{-1}$ ) обратимо присоединяются к двойным связям и катализируют *цис*–*транс*-изомеризацию олефинов [23, 24].

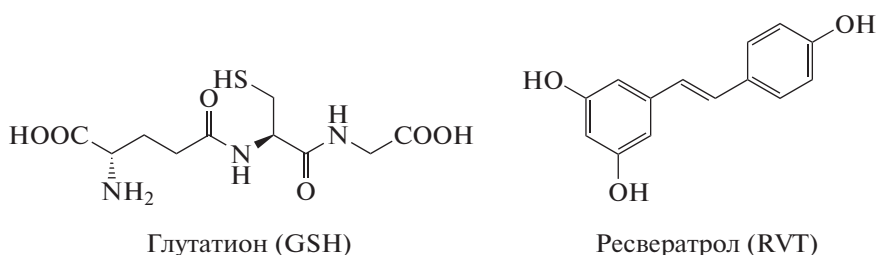


Схема 1. Структурные формулы глутатиона и ресвератрола.

В настоящей работе экспериментально исследованы кинетические закономерности взаимодействия GSH с ресвератролом в присутствии  $H_2O_2$ , методом масс-спектрометрии (MS-электроспрей положительных ионов) изучен состав продуктов, образующихся в реакциях GSH с  $H_2O_2$  и с RVT. С учетом полученных данных о тиол-ен реакции GSH с RVT, а также литературных сведений о реакциях GSH,  $H_2O_2$  и тиольных радикалов предложена уточненная кинетическая модель сложного процесса взаимодействия GSH и  $H_2O_2$  и тиол-ен реакции с RVT (в водной среде при 37°C), которая хорошо описывает особенности кинетики процесса в широком диапазоне концентраций реагентов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глутатион (GSH), реактив Эллмана (DTNB, 5,5'-дителиобис-(2-нитробензойная кислота)–“Sigma-Aldrich”, пероксид водорода,  $H_2O_2$ , “PanReac AppliChem”, *транс*-ресвератрол (RVT), “abcrGmbH”, использовали без очистки.

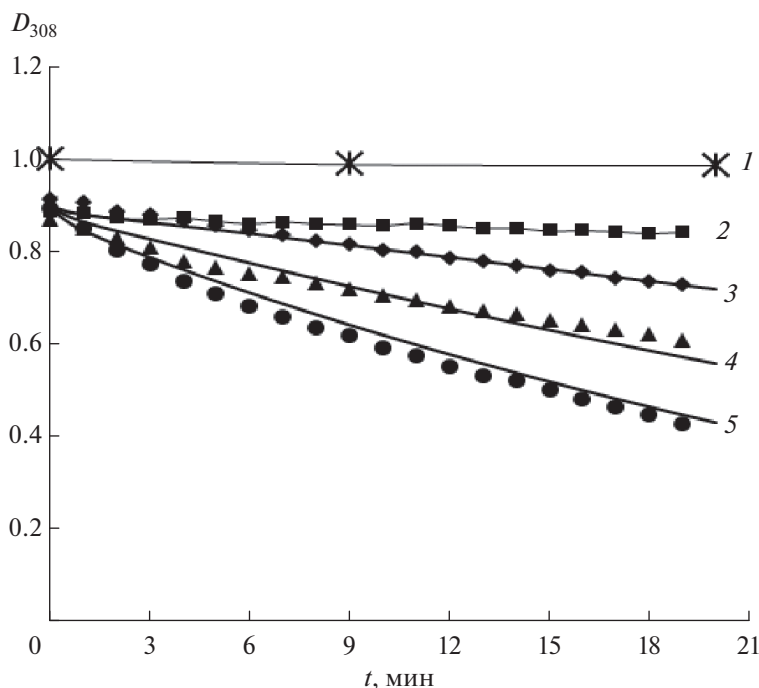
В качестве реакционной среды использовали деионизированную воду.

Базовый раствор RVT (13.3 мМ) готовили в этаноле (“Медхимпром”), который добавляли к

реакционной смеси. Концентрацию  $H_2O_2$  (в отсутствие GSH) контролировали методом йодометрии. Концентрацию GSH определяли с применением реактива Эллмана спектрофотометрически при  $\lambda_{max} = 412$  нм и  $\epsilon = 0.14 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$  [25, 26].

Тиол-ен реакцию GSH с RVT проводили при температуре 37°C непосредственно в термостатируемой кювете спектрофотометра СФ-2000 (ООО “ОКБ Спектр”, Россия), в которой регистрировали расходование RVT  $\epsilon = 0.3 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$  при  $\lambda_{max} = 304–308$  нм, а также в стеклянной термостатируемой ячейке, снабженной устройствами для отбора проб и барботажа воздухом. По ходу реакции из реакционного сосуда отбирали аликвоты по 90 мкл для анализа RVT и GSH. Аликвоты добавляли соответственно к 3 мл деионизированной воды и натрий-фосфатного буферного раствора (PBS, pH 7.4), содержащего 0.3 мМ DTNB, и записывали УФ-спектры.

GSH, содержащий две карбоксильных группы, при физиологической концентрации (0.1–10 мМ) образует кислые растворы (pH 3–4). В работе [27] нами были выявлены существенные различия в кинетике и механизме реакции GSH с  $H_2O_2$  в деионизированной воде и в фосфатных буферных системах с pH  $\geq 7$ , часто применяемых в биохимических исследованиях. Поэтому в каждом опыте



**Рис. 1.** Кинетические кривые расходования 0.03 мМ RVT в реакции с GSH в отсутствие (1) и в присутствии 4.55 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2–5); концентрация GSH (мМ): 1 – 25 (концентрация RVT – 0.033 мМ); 2 – 0; 3 – 2.5; 4 – 5; 5 – 10. Точки – экспериментальные данные, сплошные линии – расчетные данные по кинетической модели (табл. 2).

измеряли pH растворов pH-метром-милливольтметром pH-410 (“Аквилон”, Россия). Ошибка в измерении pH составляла  $\pm 0.02$ . Ошибка в измерении скоростей расходования GSH и RVT не превышала 15%.

Исследования молекулярных продуктов реакции проводили методом масс-спектрометрии в Центре коллективного пользования “Новые материалы и технологии” ИБХФ РАН на тандемном масс-спектрометре LTQ FT Ultra (“Thermo Finnigan”, Германия) методом электроспрейной ионизации в режиме измерения положительных ионов. Непосредственно перед вводом в масс-спектрометр образец разбавляли в 20 раз 50%-ным раствором ацетонитрила с добавлением 0.1% муравьиной кислоты.

Компьютерное моделирование кинетических кривых расходования реагентов в реакции GSH с RVT в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$  и оптимизацию констант скоростей 19-ти квази-элементарных реакций, составляющих кинетическую модель процесса осуществляли с использованием программы [28].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### *Кинетические особенности тиол-ен реакции глутатиона с ресвератролом в присутствии пероксида водорода в деионизированной воде*

Выше отмечалось, что концентрация GSH в биологических тканях и жидкостях на порядки

выше микромолярной концентрации других компонентов антиоксидантной системы. Поэтому в экспериментах, как правило, [GSH] варьировали в диапазоне 0.1–10 мМ, а [RVT] были порядка 1–100 мкМ. На рис. 1 представлены кинетические кривые расходования RVT в отсутствие (кривая 1) и в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$  при разных концентрациях GSH (кривые 2–5). Видно, что расходование RVT, который является эффективным акцептором радикалов, наблюдается только при совместном присутствии GSH и  $\text{H}_2\text{O}_2$  (кривые 3–5). Необходимо отметить, что введение GSH в реакционную среду приводит к снижению pH (табл. 1).

Из рис. 2 следует, что начальная скорость расходования RVT ( $W_{\text{RVT}}$ ) линейно возрастает с ростом его начальной концентрации. Ранее в [10] нами были получены эмпирические зависимости для скорости расходования глутатиона ( $W_{\text{GSH}}$ ) и скорости инициирования радикалов ( $W_i$ ) при взаимодействии GSH и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , измеренной методом ингибиторов:

$$W_{\text{GSH}} \cong \text{const} [\text{GSH}]_0^{0.3} [\text{H}_2\text{O}_2]_0^{1.2}, \quad (1)$$

$$\text{где const} = (1.7 \pm 0.2) \times 10^{-3} \text{ M}^{-0.5} \text{ c}^{-1}.$$

$$W_i \cong \text{const} [\text{GSH}]^{0.75} [\text{H}_2\text{O}_2]^{0.75}, \quad (2)$$

$$\text{где const} = (1.3 \pm 0.2) \times 10^{-5} \text{ M}^{-0.5} \text{ c}^{-1}.$$

**Таблица 1.** Кинетические характеристики расходования 0.03 мМ RVT при разных концентрациях GSH в присутствии 4.55 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в деионизированной воде при 37°C

[GSH], мМ	pH	$W_{GSH} \times 10^7$ , М/с	$W_{RVT} \times 10^9$ , М/с	$*W_i \times 10^9$ , М/с
0	6.70	0	0	0
2.0	3.28	1.62	4.3	2.1
2.5	3.23	1.72	5.5	2.5
5.0	3.10	2.14	8.2	4.2
7.0	3.03	2.37	11.6	5.4
10.0	3.00	2.63	17.5	7.1

Скорость расходования RVT ( $W_{RVT}$ ), как и  $W_{GSH}$  [10], нелинейно зависит от концентраций GSH и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В табл. 1 представлены значения  $W_{RVT}$ , экспериментально измеренные при разных концентрациях GSH в присутствии 4.55 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, и скорости инициирования радикалов ( $*W_i$ ), рассчитанные по уравнению (2). Примечательно, что значения скоростей, отсекаемые линейными зависимостями  $W_{RVT} - [RVT]$  (рис. 2) на оси ординат, практически (в пределах ошибки) совпадают с расчетными значениями  $*W_i$  для соответствующих концентраций GSH. Длина цепи в расходо-

вании ресвератрола ( $W_{RVT}/W_i$ ), как можно видеть из табл. 1, невелика, порядка 2-х звеньев, а выход радикалов меньше 1% ( $W_i/W_{GSH} < 0.01$ ).

Скорость расходования RVT удовлетворительно описывается уравнением (3) для цепных реакций окисления и полимеризации с квадратичным обрывом цепей на ведущих цепи радикалах [29]. В [13, 14] мы предположили, что в цепной реакции ненасыщенных фенолов с GSH в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> обрыв происходит на тиольных радикалах GS<sup>\*</sup>, а лимитирующей стадией является реакция радикала с RVT:

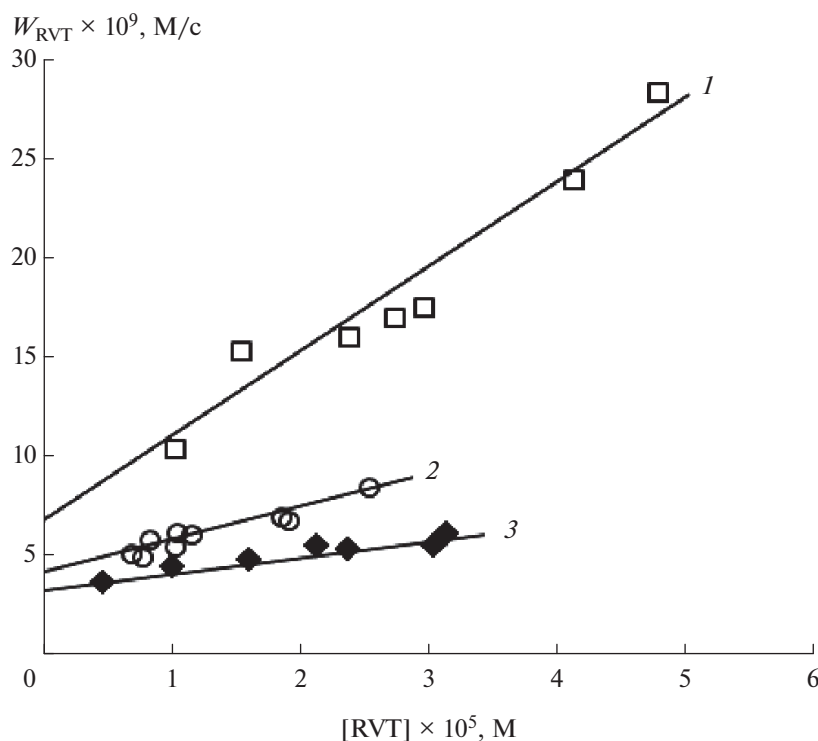
$$W_{RVT} = W_i + a[RVT]W_i^{0.5}. \quad (3)$$

Здесь параметр  $a \cong 3.5 \text{ M}^{-0.5} \text{ c}^{-0.5}$ . аналогичен отношению констант скорости реакций продолжения ( $k_p$ ) и обрыва цепей ( $k_t$ )

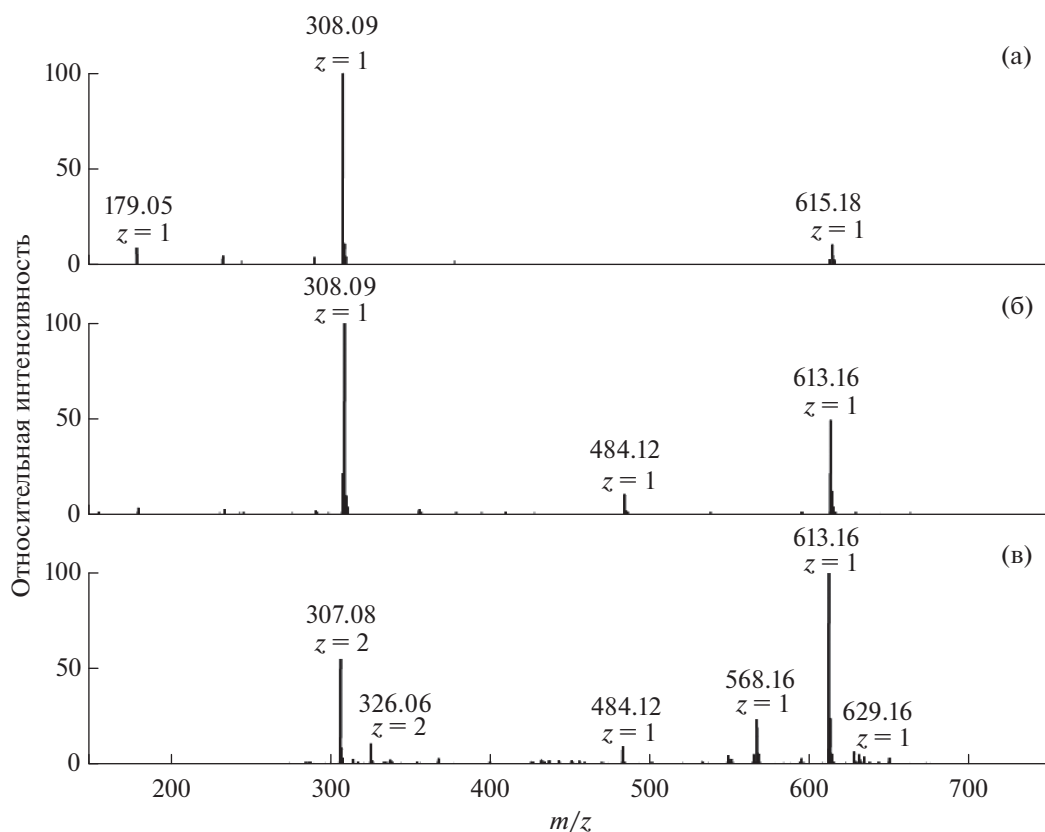
$$a = k_p / (2k_t)^{0.5}.$$

*Анализ продуктов*

Исследования молекулярных продуктов реакции проводили методом масс-спектрометрии с применением электроспрейной ионизации в режиме измерения положительных ионов. На рис. За приведен масс-спектр исходного образца GSH, в котором наряду с молекулярным ионом MH<sup>+</sup>



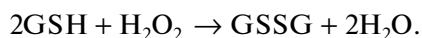
**Рис. 2.** Зависимости скоростей расходования RVT ( $W_{RVT}$ ) от концентрации RVT в реакционной смеси 4.55 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с разными концентрациями GSH (мМ): 1 – 10; 2 – 5; 3 – 2.5.



**Рис. 3.** Масс-спектры исходного глутатиона (а), продуктов реакции 10 мМ GSH с 2 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  (б) и продуктов, образующихся в смеси 2.3 мМ GSH, 1.3 мМ RVT и 3.2 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  (в) в деионизированной воде.

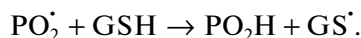
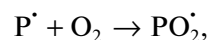
308.09 присутствуют ионы  $\text{M}^+\text{H}^+$  615.17, свидетельствующие о наличии в образце достаточно устойчивых димеров GSH–GSH. В работе [30] было отмечено, что при исследовании масс-спектров GSH методом электроспрея отрицательных ионов в водном растворе наряду с ионами GSH обнаруживаются ионы димера, тогда как в фосфатном буферном растворе (0.1 М, pH ~ 7) димер не регистрируется. Очевидно, одноименно отрицательно заряженные вследствие диссоциации карбоксильных групп ионы глутатиона не образуют димеров при pH  $\geq 7$ .

Основным продуктом окисления GSH в реакции с  $\text{H}_2\text{O}_2$  является соответствующий дисульфид GSSG ( $\text{M}^+\text{H}^+$  613.16) (рис. 3б). Реакция происходит в соответствии с известным и многократно подтвержденным [30–34] стехиометрическим уравнением:



На рис. 3в в масс-спектре продуктов, полученных в реакционной смеси 2.3 мМ GSH, 1.3 мМ RVT и 3.2 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  в исходно деионизированной воде видно, что основной продукт – дисульфид GSSG ( $\text{M}^+\text{H}^+$  613.16). Наряду с GSSG образуется продукт  $\text{M}^+\text{H}^+$  568.16 с массой, соответствующей

гидропероксиду ( $\text{PO}_2\text{H}$ ), который может получиться в результате последовательного присоединения тиольного радикала  $\text{GS}^\cdot$  и кислорода к RVT:



#### *Кинетическая модель взаимодействия глутатиона с ресвератролом*

Для анализа кинетики взаимодействия GSH с RVT в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$  использовано компьютерное моделирование с использованием программы [28]. Ранее в [10] мы представили кинетическую модель взаимодействия GSH с  $\text{H}_2\text{O}_2$ , которая включала 13 квазиэлементарных реакций. С учетом дополнительных экспериментальных и уточненных в литературе данных для описания взаимодействия GSH с  $\text{H}_2\text{O}_2$  оставлено 10 реакций (табл. 2, реакции (I)–(X)).

Поскольку в серии работ [35–38] приводятся достаточно убедительные результаты спектроскопических (УФ и ИК) исследований и теоретическо-

**Таблица 2.** Кинетическая модель взаимодействия GSH с RVT в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в водной среде при 37°C

№№	Реакции	Константы скорости	Значение $k_i$ , М <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>
I	GSH + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> → К	$k_1$	5
II	К → GSH + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$k_2$	$*4 \times 10^{-3}$
III	К + GSH → GSSG + 2H <sub>2</sub> O	$k_3$	$6 \times 10^{-2}$
IV	GSH + GSH → С	$k_4$	1.3
V	С → GSH + GSH	$k_5$	$*9 \times 10^{-4}$
VI	С + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> → GSSG + 2H <sub>2</sub> O	$k_6$	$1.5 \times 10^{-3}$
VII	С + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> → 2GS <sup>•</sup> + 2H <sub>2</sub> O	$k_7$	$2 \times 10^{-5}$
VIII	GSH + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> → <sup>•</sup> OH + GS <sup>•</sup> + H <sub>2</sub> O	$k_8$	$1 \times 10^{-3}$
IX	<sup>•</sup> OH + GSH → H <sub>2</sub> O + GS <sup>•</sup>	$k_9$	$1 \times 10^6$
X	GS <sup>•</sup> + GS <sup>•</sup> → GSSG	$k_{10}$	$1 \times 10^9$
XI	GS <sup>•</sup> + RVT → P <sup>•</sup>	$k_{11}$	$2.5 \times 10^5$
XII	P <sup>•</sup> → GS <sup>•</sup> + RVT	$k_{12}$	$*1 \times 10^4$
XIII	P <sup>•</sup> + GSH → GS <sup>•</sup> + PH	$k_{13}$	$5 \times 10^4$
XIV	P <sup>•</sup> + (O <sub>2</sub> ) → PO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	$k_{14}$	$**1 \times 10^6$
XV	PO <sub>2</sub> <sup>•</sup> + GSH → POOH + GS <sup>•</sup>	$k_{15}$	$5 \times 10^3$
XVI	GS <sup>•</sup> + PO <sub>2</sub> <sup>•</sup> → GSH + O <sub>2</sub>	$k_{16}$	$1 \times 10^9$
XVII	GSH + RVT → Y	$k_{17}$	5
XVIII	Y → GSH + RVT	$k_{18}$	$2 \times 10^{-4}$
XIX	Y + GS <sup>•</sup> → P <sup>•</sup> + GSH	$k_{19}$	$1 \times 10^6$

Примечание. К – комплекс GSH–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; С – комплекс GSH–GSH; Y – комплекс GSH с RVT; P<sup>•</sup> – алкильный радикал, образующийся в результате присоединения тиольного радикала GS<sup>•</sup> к двойной связи RVT; PO<sub>2</sub><sup>•</sup> и POOH – соответствующие пероксильный радикал и гидропероксид.

\* Константа скорости имеет размерность с<sup>-1</sup>.

\*\*  $k_{14} = k [O_2]$  имеет размерность с<sup>-1</sup>;  $[O_2] = 1 \times 10^{-4}$  М.

го анализа [36] появлению комплексов GSH–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> не только в буферных растворах с физиологическим рН, но и в чистой воде [37], которая при добавлении GSH имеет рН 2, мы сохранили в кинетической модели реакции (I)–(III) образования комплекса К (GSH–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и окисления его в дисульфид GSSG, хотя в масс-спектрах продуктов реакции (рис. 3б) не обнаруживается соответствующий комплексу ион МН<sup>+</sup> 342.

Примечательно, что измеренная в [37] методом время-разрешенной рамановской спектроскопии скорость расходования GSH при концентрациях реагентов 1 М, равная  $2 \times 10^{-3}$  М/с, практически совпадает с величиной скорости  $W_{GSH} = 1.8 \times 10^{-3}$  М/с, рассчитанной по уравнению (1).

В [27] мы показали, что в фосфатных буферных системах при рН ≥ 7 усиливается реакция окисления GSH кислородом воздуха и резко снижается скорость инициирования радикалов в ре-

акции GSH с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> по сравнению с  $W_i$  в деионизованной воде. При рН ≥ 7 не образуются димеры глутатиона. Поэтому при конструировании модели было принято, что выход радикалов происходит, в основном, в реакции (VII) при взаимодействии димера GSH–GSH (С, табл. 2) с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Реакции (VII) и (VIII), которые поставляют радикалы, практически не влияют на скорость расходования GSH ( $W_{GSH}$ ). Тиоловая группа –SH в комплексах К [35] и С определяется реактивом Элмана так же, как в свободном GSH. Величина  $k_{10} = 10^9$  М<sup>-1</sup> с<sup>-1</sup> известна для быстрой рекомбинации тиольных радикалов [34].

Реакции XI–XVI имеют место при добавках RVT и вместе с остальными реакциями описывают кинетические кривые расходования RVT. Известно, что тиольные радикалы с высокими константами скорости обратимо ( $\sim 10^5$  М<sup>-1</sup> с<sup>-1</sup>) присоединяются к двойным связям –C=C– [23, 40],

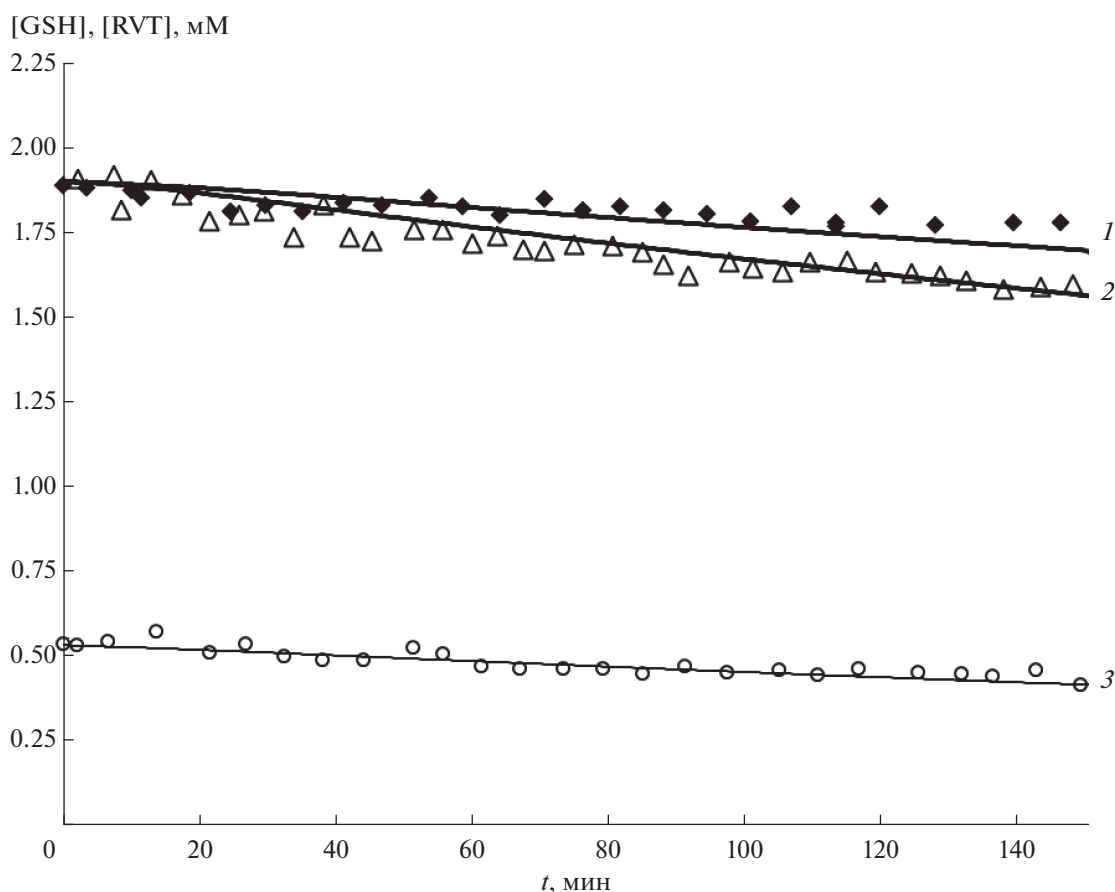
**Таблица 3.** Влияние кислорода на тиол-ен реакцию GSH с RVT в присутствии  $H_2O_2^*$ 

Условия	$[GS^*]$ , М	$[P^*]$ , М	$[PO_2^*]$ , М	$[PH]$ , М	$[POOH]$ , М	$\Delta GSH$ , М
Без RVT, Реакции (I)–(X)	$7.3 \times 10^{-10}$	–	–	–	–	$3.37 \times 10^{-4}$
С RVT без $O_2$ Реакции (I)–(XIII)	$7.3 \times 10^{-10}$	$8.6 \times 10^{-12}$	–	$1.9 \times 10^{-6}$	–	$3.39 \times 10^{-4}$
С RVT и $O_2$ Реакции (I)–(XVI)	$9.96 \times 10^{-11}$	$1.9 \times 10^{-14}$	$5.06 \times 10^{-9}$	$4.0 \times 10^{-9}$	$9.2 \times 10^{-5}$	$4.2 \times 10^{-4}$
С Y (GSH–RVT) Реакции (I)–(XIX)	$4.76 \times 10^{-11}$	$3.2 \times 10^{-14}$	$9.6 \times 10^{-9}$	$5.3 \times 10^{-9}$	$1.54 \times 10^{-4}$	$2.2 \times 10^{-4}$

\* Рассчитанные по модели для рис. 4 значения концентраций компонентов при  $t = 150$  мин. Прочерки означают, что в расчете (см. Условия) не учитывались реакции с участием этих частиц.

поэтому в модель введены реакции (XI) и (XII). Образующийся в результате присоединения  $GS^*$  к RVT алкильный радикал  $P^*$  может прореагировать с GSH ( $k_{13} \approx 10^5-10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  [23, 40]) или с кислородом, поскольку опыты проводили в аэробных условиях ( $k_{14} \approx 10^9-10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  [41]). В

табл. 3 приведены рассчитанные по модели значения квазистационарных концентраций радикалов, из которых видно, что в присутствии  $O_2$  доминируют пероксильные радикалы  $PO_2^*$  и увеличивается содержание молекулярных продуктов присоединения радикалов  $GS^*$  к RVT. Определя-



**Рис. 4.** Кинетические кривые расходования 1.9 мМ GSH (1, 2, 3) и 0.53 мМ RVT (3) в присутствии 2.1 мМ  $H_2O_2$ : 1 — GSH (◆) с RVT; 2 — GSH (△) без RVT; водная среда, 37°C. Точки — экспериментальные данные, сплошные линии — расчетные данные по кинетической модели (табл. 2).

ющая роль  $O_2$  в кинетике присоединения тиольных радикалов к олефинам при изучении ее методом флеш-фотолиза отмечена и проанализирована в работах [41, 42].

На рис. 4 представлены экспериментально многократно повторенные и воспроизводимые кинетические кривые расходования глутатиона и ресвератрола, взятых при сопоставимых по масштабу концентрациях. Вопреки нашим ожиданиям, в присутствии RVT скорость расходования GSH не увеличивается за счет дополнительного расходования в цепной реакции с RVT, а уменьшается. Чтобы получить такой эффект, модель дополнили обратимым связыванием RVT с GSH в комплекс Y (реакции (XVII)–(XIX)).

Представленная кинетическая модель с оптимизированными константами скоростей вполне удовлетворительно описывает экспериментальные концентрационные зависимости для  $W_{RVT}$  и  $W_{GSH}$  (рис. 2 и табл. 1), а также экспериментальные кинетические кривые расходования RVT и GSH в реакции GSH с RVT в присутствии  $H_2O_2$  (рис. 1 и 4).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Опираясь на экспериментально полученные кинетические кривые и концентрационные зависимости скорости расходования глутатиона и ресвератрола в присутствии  $H_2O_2$  от концентраций реагентов (в водной среде при  $37^\circ C$ ) и данные по составу продуктов, разработана кинетическая модель взаимодействия GSH с RVT, инициированного тиольными радикалами, образующимися в реакции GSH с  $H_2O_2$ . Скелетная модель включает 19 реакций с соответствующими оптимизированными для условий эксперимента значениями констант скоростей. Реакции образования комплексов GSH– $H_2O_2$  и GSH–GSH позволили описать нетривиальные концентрационные зависимости скорости расходования глутатиона и инициирования радикалов при взаимодействии GSH с  $H_2O_2$ , реакции (XIV) и (XV) отражают важную роль кислорода воздуха в радикально-цепном расходовании RVT. Дополнение модели обратимыми реакциями (XVII)–(XIX) образования комплексов RVT с компонентами процесса позволило описать нетривиальный эффект заметного уменьшения скорости расходования GSH при повышенных концентрациях RVT. Подавляющее большинство исследований по биохимии GSH проводят в условиях, близких к физиологическим в животных организмах, т.е. в буферных растворах, обеспечивающих pH 7.2–7.4. В таких условиях радикалы в реакции GSH с  $H_2O_2$  не образуются [27], и, следовательно, нет расходования RVT. Возможно,

обнаруженное нами образование радикалов при взаимодействии GSH с  $H_2O_2$  и другими пероксидами, а также реакции GSH с ненасыщенными фенолами имеют место и играют роль в физиологии растений, в которых внутри- и межклеточные жидкости характеризуются более низкими по сравнению с фауной значениями pH, при использовании тиолов в косметике, фармацевтике, приготовлении БАДов и в виноделии.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-03-00753 и в рамках государственного задания (проект № 0082-2018-0006, регистрационный № АААА-А18-118020890097-1).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mironczuk-Chodakowska I., Witkowska A.M.* // Adv. Med. Sci. 2018. V. 63. № 3. P. 68.  
<https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.005>
2. *Sporer A.J., Kahl L.J., Price-Whelan A., Dietrich L.E.P.* // Annu. Rev. Biochem. 2017. V. 86. P. 777.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044453>
3. *Hartl J., Kiefer P., Kaczmarczyk A., Mittelviefhaus M., Meyer F., Vonderach T., Hattendorf B., Jenal U., Vorholt J.A.* // Nat. Metab. 2020. V. 2. P. 153.  
<https://doi.org/10.1038/s42255-019-0166-0>
4. *Elgawish M.S., Kishikawab N., Kurodab N.* // Analyst. 2015. V. 140. P. 8148.  
<https://doi.org/10.1039/c5an01604e>
5. *Chen Y., Han M., Matsumoto A., Wang Y., Thompson D.C., Vasiliou V.* // Adv. Exp. Med. Biol. 2018. V. 1032. P. 37.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-98788-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-98788-0_3)
6. *Burtis A.C., Ashwood E.R., Saunders W.B., Tietz N.W.* Fundamentals of Clinical Chemistry, Philadelphia, 4th edn, 1996.
7. *Estrela J.M., Ortega A., Obrador E.* // Crit. Rev. Clin. Lab Sci. 2006. V. 43. № 2. P. 143.  
<https://doi.org/10.1080/10408360500523878>
8. *Toyokuni S.* // Front. Pharmacol. 2014. V. 5. № 200. P. 1.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00200>
9. *Guo R., Yang G., Feng Z., Zhu Y., Yang P., Song H., Wang W., Huang P., Zhang J.* // Biomater. Sci. 2018. V. 6. № 5. P. 1238.  
<https://doi.org/10.1039/c8bm00094h>
10. *Зинатуллина К.М., Касаикина О.Т., Кузьмин В.А., Храмеева Н.П.* // Кинетика и катализ. 2019. Т. 60. № 3. С. 281. [Zinatullina, K.M., Kasaikina, O.T., Kuzmin, V.A., Khrameeva, N.P. // Kinet. Catal. 2019. V. 60. № 3. P. 266.]  
<https://doi.org/10.1134/S0023158419030169>



11. *Зинатуллина К.М., Касаикина О.Т., Кузьмин В.А., Храмеева Н.П., Шапиро Б.И.* // Изв. АН. Сер. хим. 2017. № 7. С. 1300. [*Zinatullina K.M., Kasaikina O.T. Kuzmin V.A., Khrameeva N.P. Shapiro B.I.* // Russ. Chem. Bull. 2017. V. 66. № 7. P. 1300.] <https://doi.org/10.1134/S0023158417050093>
12. *Зинатуллина К.М., Храмеева Н.П., Касаикина О.Т., Кузьмин В.А.* // Изв. АН. Сер. хим. 2018. № 4. С. 726. [*Zinatullina K.M., Khrameeva N.P., Kasaikina O.T., Kuzmin V.A.* // Russ. Chem. Bull. 2018. V. 67. № 4. P. 726.] <https://doi.org/10.1007/s11172-018-2129-0>
13. *Зинатуллина К.М., Храмеева Н.П., Касаикина О.Т., Кузьмин В.А., Шапиро Б.И.* // Изв. АН. Сер. хим. 2017. № 11. С. 2145. [*Zinatullina K.M., Khrameeva N.P., Kasaikina O.T., Kuzmin V.A., Shapiro B.I.* // Russ. Chem. Bull. 2017. V. 66. № 11. P. 2145.] <https://doi.org/10.1007/s11172-017-1995-1>
14. *Zinatullina K.M., Khrameeva N.P., Kasaikina O.T.* // Bulg. Chem. Comm. 2018. V. 50. Special Issue С. P. 25.
15. *Зинатуллина К.М., Касаикина О.Т., Кузьмин В.А., Храмеева Н.П., Шапиро Б.И.* // Изв. АН. Сер. хим. 2016. № 12. С. 2825. [*Zinatullina K.M., Kasaikina O.T., Kuzmin V.A., Khrameeva N.P., Shapiro B.I.* // Russ. Chem. Bull. 2016. V. 65. № 12. P. 2825.] <https://doi.org/10.1007/s11172-016-1663-x>
16. *Зинатуллина К.М., Касаикина О.Т., Мотякин М.В., Ионова И.С., Дегтярев Е.Н., Храмеева Н.П.* // Изв. АН. Сер. хим. 2020. № 10. С. 1865. [*Zinatullina K.M., Kasaikina O.T., Motyakin M.V., Ionova I.S., Degtyarev E.N., Khrameeva N.P.* Russ. Chem. Bull. 2020. V. 69. № 10. P. 1865.] <https://doi.org/10.1007/s11172-020-2971-8>
17. *Posner T.* // Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1905. V. 38. № 1. P. 646. <https://doi.org/10.1002/cber.190503801106>
18. *Nilsson C., Simpson N., Malkoch M., Johansson M., Malmström E.* // J. Polym. Sci. A: Polym. Chem. 2008. V. 46. № 4. P. 1339. <https://doi.org/10.1002/pola.22474>
19. *Liu Y., Hou W., Sun H., Cui C., Zhang L., Jiang Y., Wu Y., Wang Y., Li J., Sumerlin B.S., Liu Q., Tan W.* // Chem. Sci. 2017. V. 8. P. 6182. <https://doi.org/10.1039/c7sc01447c>
20. *Biermann U., Metzger J.O.* // Eur. J. Org. Chem. 2018. № 6. P. 730. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201701692>
21. *Salehi B, Mishra A.P., Nigam M., Sener B., Kilic M., Sharifi-Rad M., Fokou P.V.T., Martins N., Sharifi-Rad J.* // Bio-medicines. 2018. V. 6. № 3. P. 91. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6030091>
22. *Yu W., Fu Y.C., Wang W.* // J. Cell. Biochem. 2012. V. 113. № 3. P. 752. <https://doi.org/10.1002/jcb.23431>
23. *Chatgililoglu C., Ferreri C.* // Acc. Chem. Res. 2005. V. 38. № 6. P. 441. <https://doi.org/10.1021/ar0400847>
24. *Samadi A., Andreu I., Ferreri C., Dellonte S., Chatgililoglu C.* // J. Am. Oil Chem. Soc. 2004. V. 81. № 8. P. 753. <https://doi.org/10.1007/s11746-004-0974-8>
25. *Ellman G.L.* // Arch. Biochem. Biophys. 1959. V. 82. P. 70.
26. *Pereira C.D., Minatino N., Takao T.* // Anal. Chem. 2015. V. 87. P. 10785. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03431>
27. *Зинатуллина К.М., Касаикина О.Т., Кузьмин В.А., Храмеева Н.П., Писаренко Л.М.* // Изв. АН. Сер. хим. 2019. № 7. С. 1441. <https://doi.org/10.1007/s11172-019-2574-4>
28. *Sirick A.V., Pliss R.E., Rusakov A.I., Pliss E.M.* // Oxid. Commun. 2014. V. 37. № 1. P. 37.
29. *Denisov E.T., Denisova T.G.* Handbook of antioxidants: bond dissociation energies, rate constants, activation energies and enthalpies of reactions. Boca Raton: CRC press. 2000. 289 p.
30. *Deutsch J.C., Santhosh-Kumar C.R., Kolhouse J.F.* // J. Chromatogr. A. 1999. № 862. P. 161. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00932-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00932-2)
31. *Winterbourn C.C., Metodiewa D.* // Free Radic Biol Med. 1999. V. 27. P. 322. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00051-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00051-9)
32. *Petzolda H., Sadler P.J.* // Chem. Commun. 2008. P. 4413. <https://doi.org/10.1039/b8053558h>
33. *Singh B., Das R.S., Banerjee R., Mukhopadhyay S.* // Inorg. Chim. Acta. 2014. № 418. P. 51. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2014.03.003>
34. *Chatgililoglu C., Bowry V.W.* // J. Org. Chem. 2018. V. 83. № 16. P. 9178. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b01216>
35. *Abedinzadeh Z., Gardes-Albert M., Ferradini C.* // Can. J. Chem. 1989. V. 67. P. 1247. <https://doi.org/10.1139/v89-190>
36. *Berges J., Caillet J., Langlet J., Abedinzadeh Z.* // Theor. Claim. Acta. 1993. V. 85. P. 87 99. <https://doi.org/10.1007/BF01374579>
37. *Picquart M., Grajcar L., Baron M.H., Abedinzadeh Z.* // Biospectroscopy. 1999. V. 5. P. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6343\(1999\)5:6<328::AID-BSPY2>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6343(1999)5:6<328::AID-BSPY2>3.0.CO;2-J)
38. *Abedinzadeh Z.* // Can. J. Physiol. Pharmacol. 2001. V. 79. P. 166. <https://doi.org/10.1139/cjpp-79-1-166>
39. *Hellwege K.-H., Madelung O., Martienssen W.* Landolt-Bornstein: Numerical Data and Functional Relationships in Science and Technology. Springer-Verlag. 1983. V. 13. 308 p.
40. *Chatgililoglu C., Studer A.* Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials. John Wiley & Sons, 2012. <https://doi.org/10.1002/9781119953678>
41. *Ito O., Matsudo M.* // J. Amer. Chem. Soc. 1979. V. 101. № 7. P. 1815. <https://doi.org/10.1021/ja00501a031>
42. *Ito O., Matsudo M.* // J. Amer. Chem. Soc. 1979. V. 101. № 19. P. 5732. <https://doi.org/10.1021/ja00513a045>

## Interaction of Glutathione with Resveratrol in the Presence of Hydrogen Peroxide. A Kinetic Model

K. M. Zinatullina<sup>1,\*</sup>, O. T. Kasaikina<sup>1</sup>, N. P. Khrameeva<sup>2</sup>, M. I. Indeykina<sup>2</sup>, and A. S. Kononikhin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Semenov Federal Center of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,  
4 ul. Kosygina, Moscow, 119991 Russia*

<sup>2</sup>*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 4 ul. Kosygina, Moscow, 119991 Russia*

\**e-mail: karinazinat11@gmail.com*

The kinetics of the interaction of glutathione (GSH) with unsaturated phenol resveratrol (RVT) in the presence of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) in deionized water was studied. GSH contains two carboxyl groups, which dissociate in aqueous media to form acidic solutions. At physiological concentration 0.1–10 mM, the GSH water solution is of pH 3–4 wherein molecules of GSH are associated into dimers. Under these conditions GSH is relatively slowly oxidized by the air oxygen, and the reaction of GSH with  $H_2O_2$  is accompanied by the formation of radicals. The rate of thiyl radical initiation ( $W_1$ ) is rather low and is a fraction of a percent of the rate of GSH consumption. However, it is enough to initiate a chain thiol-ene reaction between GSH and RVT. Based on the obtained experimental results of the kinetics of the reaction of GSH with  $H_2O_2$  and product composition as well as on literature data on the reactions of GSH with  $H_2O_2$  and thiyl radicals, a kinetic model of the complex interaction of GSH and RVT in presence of  $H_2O_2$  in an aqueous solution at 37°C was proposed. The model includes 19 quasi-elementary reactions with corresponding rate constants, including the formation of the intermediate complexes GSH– $H_2O_2$  and GSH–GSH, reactions of radical initiation with subsequent reactions resulted in the formation of final products. Computer simulation based on the model developed adequately describes the reaction kinetics in a wide range of reactant concentrations.

**Keywords:** glutathione, hydrogen peroxide, thiyl radicals, resveratrol, thiol-ene reactions, kinetic model