

## КИНЕТИКА ОКИСЛЕНИЯ 3-АМИНОПИРИДИН-2(1H)-ОНОВ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА В ПРИСУТСТВИИ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА

© 2024 г. В.С. Шубина\*.,# , Ю.В. Шаталин\* , А.Л. Шацаускас\*\*.,\*\*\* , А.С. Фисюк\*\*.,\*\*\*

\*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

\*\*Омский государственный технический университет, просп. Мира, 11, Омск, 644050, Россия

\*\*\*Омский государственный университет им. Ф.М. Достоевского, просп. Мира, 55а, Омск, 644077, Россия

#E-mail: shubinavictoria@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.03.2024 г.

После доработки 12.03.2024 г.

Принята к публикации 03.07.2024 г.

Целью данного исследования являлась оценка кинетических параметров окисления некоторых 3-аминопиридин-2(1H)-онов пероксидом водорода, катализируемого пероксидазой хрена, и сродства пероксидазы хрена к данным соединениям. Было показано, что окисление 3-аминопиридин-2(1H)-онов подчиняется кинетике псевдопервого порядка. Также было обнаружено гиперболическое снижение наблюдаемой константы скорости реакции ( $k_{\text{obs}}$ ) с увеличением исходной концентрации 3-аминопиридин-2(1H)-онов. Зависимость  $k_{\text{obs}}$  от концентрации фермента носила прямолинейный характер, свидетельствуя в пользу конкурентного ингибирования окисления продуктом реакции. Было обнаружено, что увеличение полярности заместителя в 4-м положении приводит к увеличению скорости окисления пиридинов. Значения  $V_{\text{max}}/K_m$  также были выше для соединений, несущих полярные заместители в 4-м положении. Данный кинетический параметр ( $V_{\text{max}}/K_m$ ) отражает субстратную специфичность фермента. Полученные данные проясняют механизмы взаимодействия пероксидазы хрена и 3-аминопиридинов и говорят о том, что 3-аминопиридины могут быть использованы для разработки чувствительных методов детекции пероксида водорода и модификации методик иммуно-ферментного анализа.

*Ключевые слова:* 3-аминопиридин-2(1H)-он, флуоресцентные красители, пероксидаза хрена, кинетика окисления, субстратная специфичность.

DOI: 10.31857/S0006302924040012, EDN: NIOTCS

Пероксидаза хрена (HRP) представляет собой гликопротеин, относящийся к суперсемейству растительных пероксидаз и получивший широкое распространение в медико-биологических исследованиях. Данный фермент катализирует одноэлектронное окисление субстратов в присутствии пероксида водорода. Образование/разрушение в результате реакции окрашенных, флуоресцентных или люминесцентных соединений позволяет использовать данный фермент при иммуноферментном детектировании белков, нуклеиновых кислот и ряда низкомолекулярных соединений [1]. Недавно нами был разработан способ синтеза новых флуорофоров, обладающих высоким квантовым выходом и изменяющих оптические свойства в процессе их окисления (рис. 1) [2]. Было установлено, что отдельные соединения являются субстратами HRP и окисляются в при-

сутствии пероксида водорода. Стехиометрия HRP-катализируемого окисления 3-аминопиридин-2(1H)-онов пероксидом водорода составляет 1 : 1. Пределы обнаружения пероксида водорода и HRP ( $\text{LOD}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  и  $\text{LOD}_{\text{HRP}}$ ) в системах, содержащих исследуемые флуорофоров, лежат в диапазоне наномолярных концентраций и сопоставимы с соответствующими пределами обнаружения в системах, содержащих красители, используемые в наборах для иммуноферментного анализа (табл. 1) [2].

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что 3-аминопиридины могут быть использованы для разработки чувствительных методов детекции пероксида водорода и модификации методик иммуноферментного анализа. Для выявления структурных особенностей, необходимых для наиболее эффективного взаимодействия фермента с 3-аминопиридин-2(1H)-онами, в рамках данной работы были изучены ки-

*Сокращение:* HRP – пероксидаза хрена.

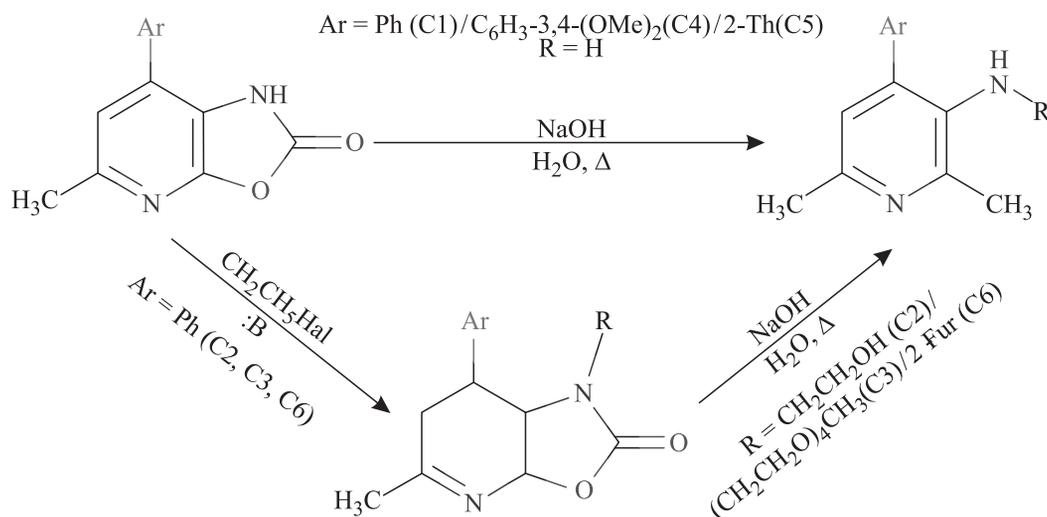


Рис. 1. Схема синтеза новых 3-аминопиридин-2(1H)-онов.

нетические параметры HRP-катализируемого окисления пиридинов пероксидом водорода и проведена оценка сродства HRP к данным соединениям.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все растворы были приготовлены на дистиллированной воде, дополнительно очищенной на установке Milli-Q (Millipore, США). HRP (P8375) приобретен в компании Sigma-Aldrich (США). HRP растворяли в 20 мМ фосфатно-солевом буфере, pH 7.4 ( $A_{403}/A_{275} = 2.8-3.0$ ), концентрацию фермента определяли спектрофотометрически ( $\epsilon_{403} = 100 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ ) [3]. Пероксид водорода (30%) приобретен в компании «Рехим» (Россия). Концентрацию пероксида водорода подтверждали спектрофотометрически ( $\epsilon_{240} = 39.4 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$  [4]). Синтез 3-аминопиридин-2(1H)-онов осуществляли как описано ранее [2]. Стоковые растворы флуорофоров (100 мМ) готовили в диме-

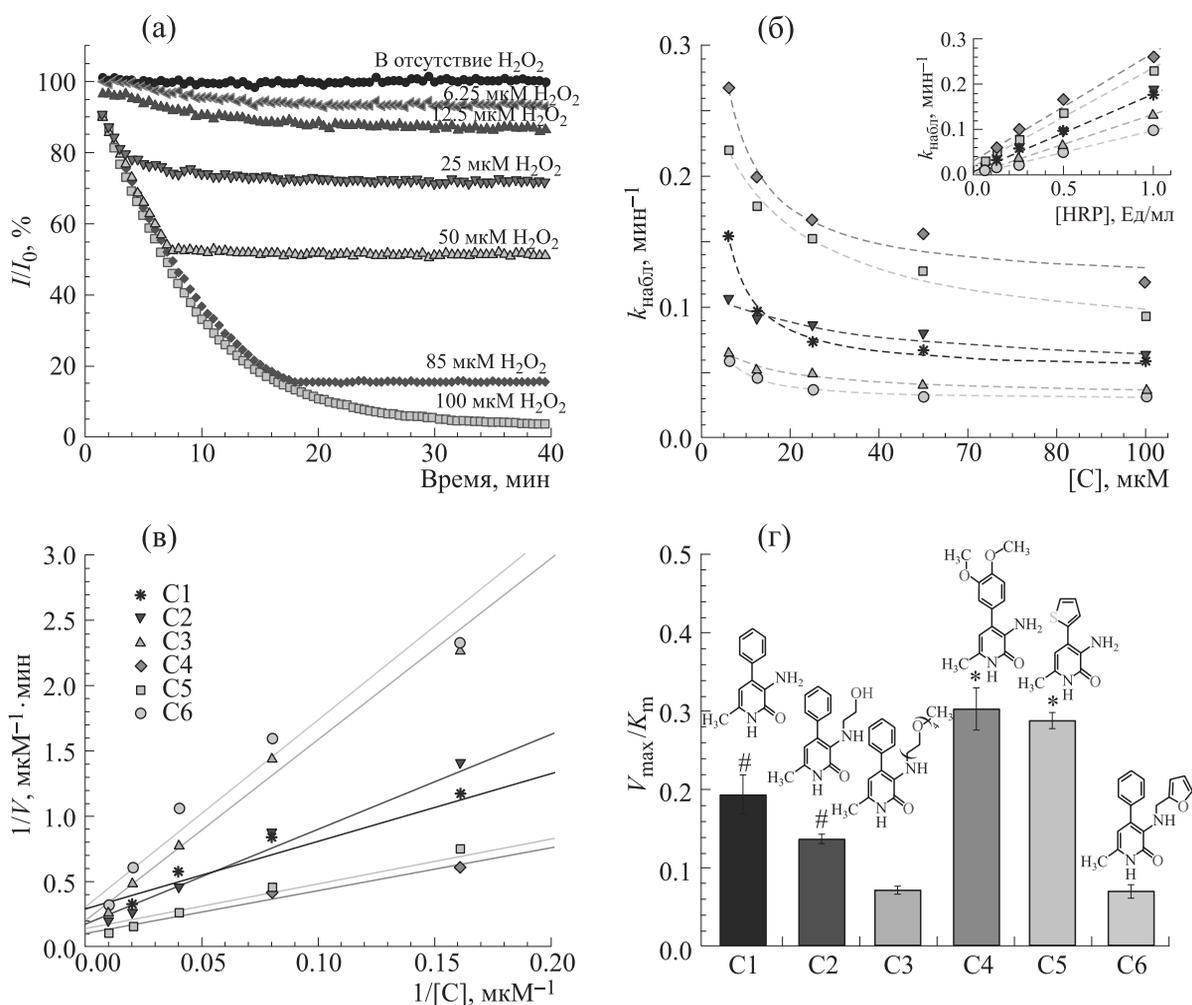
тилсульфоксиде, их концентрации определяли спектрофотометрически, используя следующие коэффициенты экстинкции [2]:  $8.9 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$  (C1),  $6.9 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$  (C2),  $9.7 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$  (C3),  $9.8 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$  (C4),  $8.3 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$  (C5) и  $8.8 \cdot 10^3 \text{ (C6) М}^{-1}\text{см}^{-1}$ . Свежие растворы красителей, HRP и  $\text{H}_2\text{O}_2$  готовили перед каждым экспериментом.

**HRP-катализируемое окисление 3-аминопиридин-2(1H)-онов пероксидом водорода.** Измерения проводили при 37°C на микропланшетном ридере Infinite F200 (Tecan, Австрия) в 96 луночных планшетах (Greiner 655076). Длина волны экстинкции –  $360 \pm 25 \text{ нм}$ , длина волны эмиссии –  $465 \pm 25 \text{ нм}$ . Реакционная смесь содержала  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (20 мМ, pH 7.4), HRP (36 нМ (0.25 Ед/мл)), исследуемые соединения (6.3, 12.5, 25.0, 50.0 и 100 мкМ), и пероксид водорода (6.3, 12.5, 25.0, 50.0, 85.0 и 100.0 мкМ). Измерения проводили до тех пор, пока интенсивность флуоресценции не достигала некоторого постоянного

Таблица 1. Пределы обнаружения пероксида водорода и HRP в системах, содержащих исследуемые флуорофоры [2]

Флуорофор	$LOD_{\text{H}_2\text{O}_2}$ , нМ	$LOD_{\text{HRP}}$ , нМ
C1	$8.97 \pm 1.01$	$2.45 \pm 0.45$
C2	$11.45 \pm 4.61$	$2.92 \pm 0.63$
C4	$7.78 \pm 3.75$	$3.40 \pm 1.06$
C5	$3.17 \pm 0.70$	$1.58 \pm 0.44$
C6	$6.84 \pm 2.79$	$7.45 \pm 2.19$

Примечание. В отличие от других соединений стехиометрия HRP-катализируемого окисления C3 пероксидом водорода не соответствовала стехиометрии 1 : 1. Поэтому пределы обнаружения пероксида водорода и HRP в системе, содержащей C3, не определены [2].



**Рис. 2.** Кинетика окисления 3-аминопиридин-2(1H)-онов в присутствии пероксида водорода и пероксидазы хрена. (а) – Характерные кривые изменения относительной интенсивности флуоресценции соединения 6 во времени в присутствии различных концентраций пероксида водорода. Концентрация соединения 6 составляла 100 мкМ. Концентрация пероксидазы хрена составляла 36 нМ (0.25 Ед/мл). (б) – Зависимость наблюдаемой константы скорости ( $k_{\text{набл}}$ ) от концентрации соединения. Константы скорости псевдопервого порядка определяли по изменению концентрации соединений во времени в присутствии 50 мкМ пероксида водорода. На врезке – зависимость наблюдаемой константы скорости ( $k_{\text{набл}}$ ) от концентрации фермента. Концентрация соединений составляла 100 мкМ, пероксида водорода – 50 мкМ. (в) – Зависимости Лайнуивера–Берка для исследуемых соединений. Концентрация пероксида водорода составляла 50 мкМ. (г) – Значения  $V_{\text{max}}/K_m$  для структурно близких 3-аминопиридин-2(1H)-онов. Концентрация пероксида водорода составляла 50 мкМ. Представлено среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение в пяти независимых экспериментах. \* – Достоверные различия по сравнению с C1–C3 и C6,  $p < 0.05$ ; # – достоверные различия по сравнению с C3 и C6,  $p < 0.05$ .

значения или выходила на базовый уровень. В первом случае  $H_2O_2$ , добавленный к смеси, полностью расходовался в реакции HRP с флуоресцентным соединением. Во втором случае соединение, присутствующее в смеси, практически полностью окислялось системой HRP/ $H_2O_2$ . Изменения интенсивности флуоресценции соединений были пересчитаны в изменения концентраций соединений. Проведено пять независимых экспериментов.

**Определение констант скоростей окисления 3-аминопиридин-2(1H)-онов.** Для оценки кон-

стант скоростей использовали данные по окислению зондов в присутствии 50 мкМ пероксида водорода. Нелинейная аппроксимация изменения концентрации флуорофора от времени проводилась по уравнению экспоненциально затухающей кривой:  $C = C_0 e^{-kt} + C_{\text{кон}}$ , где  $C_0$  – исходная концентрация флуорофора в растворе в мкМ,  $k$  – наблюдаемая константа псевдопервого порядка в  $\text{мин}^{-1}$ ,  $t$  – время в минутах,  $C_{\text{кон}}$  – остаточная концентрация флуорофора в системе после выхода реакции на стационарный уровень. Расчет параметров аппроксимации осуществляли с использова-

нием программного пакета QtiPlot 0.9.8.9. Далее строили график зависимости наблюдаемой константы скорости от концентрации исследуемых пиридинов. Так как обнаружено гиперболическое снижение наблюдаемой константы скорости реакции ( $k_{\text{obs}}$ ) с увеличением исходной концентрации 3-аминопиридин-2(1H)-онов, в дальнейшем для прояснения механизма взаимодействия пиридинов с HRP была проведена оценка зависимости наблюдаемой константы скорости реакции от концентрации HRP.

**Влияние концентрации HRP на наблюдаемые константы скорости окисления 3-аминопиридин-2(1H)-онов.** Для оценки использовались данные по окислению зондов в присутствии исследуемых соединений в концентрации 100 мкМ, пероксида водорода в концентрации 50 мкМ и HRP в различных концентрациях (144, 72, 36, 18 и 9 нМ, что соответствует 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 Ед/мл соответственно). Далее строили график зависимости наблюдаемой константы скорости от концентрации HRP. Проведено пять независимых экспериментов.

**Определение начальной скорости окисления 3-аминопиридин-2(1H)-онов.** Начальную скорость реакции определяли по углу наклона прямолинейного участка зависимости концентрации флуорофора от времени реакции.

**Оценка сродства HRP к 3-аминопиридин-2(1H)-онам.** Для сравнительной оценки сродства фермента к исследуемым флуорофорам использовали значения  $V_{\text{max}}/K_m$  (константа специфичности ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ), умноженная на концентрацию фермента) [5]. Для этого строили зависимость Лайнуивера–Берка и по углу наклона ( $K_m/V_{\text{max}}$ ) определяли соответствующую величину. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение пяти независимых экспериментов,  $p = 0.05$ .

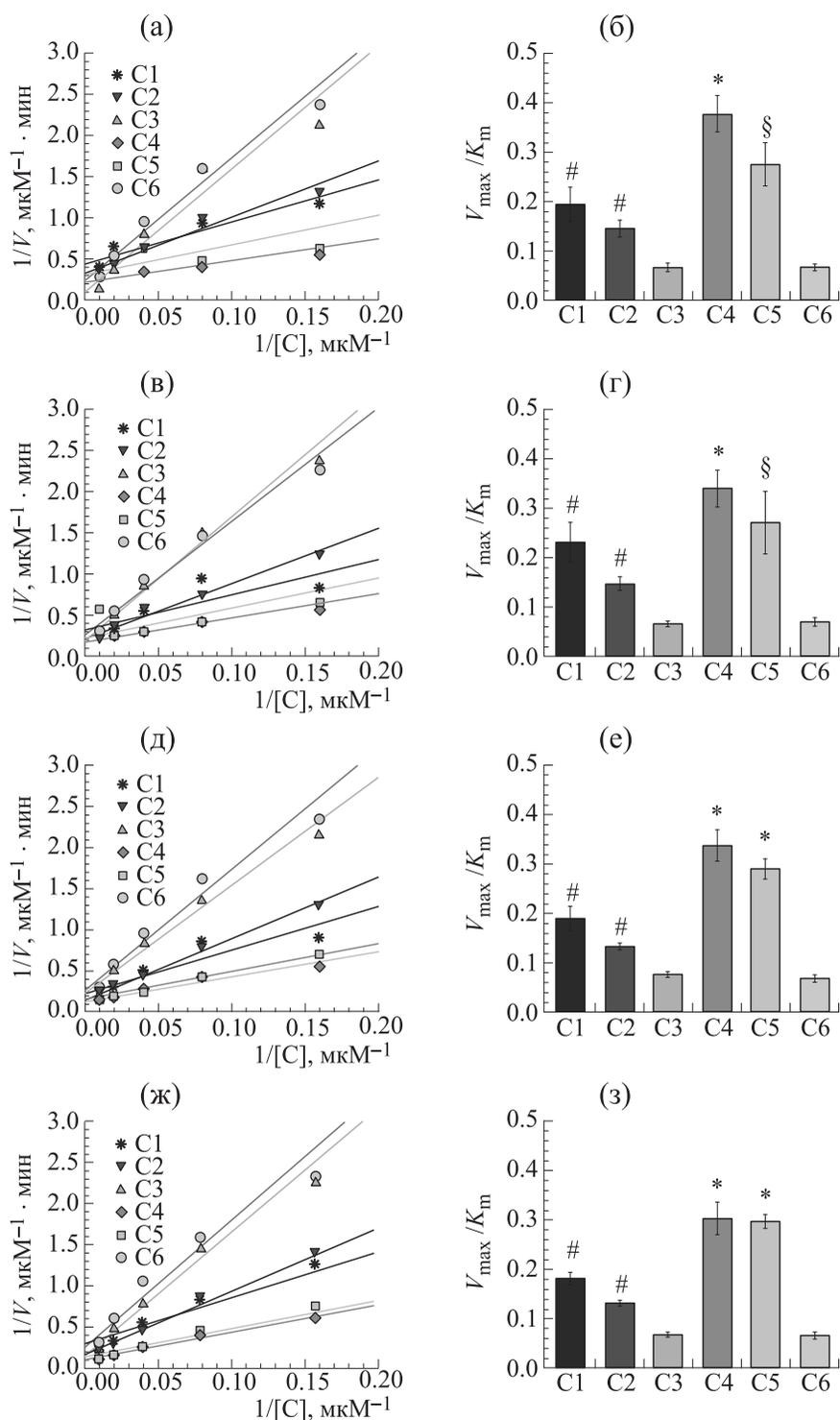
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2а приведены характерные кривые изменения относительной интенсивности флуоресценции соединения С5 во времени в присутствии различных концентраций пероксида водорода. Так как концентрация флуоресцентного соединения уменьшается со временем, уменьшается относительная интенсивность флуоресценции —  $I/I_0$ . Однако по истечении некоторого времени данное соотношение практически перестает изменяться, свидетельствуя о том, что один из компонентов системы полностью расходуется в реакции. Было показано, что окисление данных соединений подчиняется кинетике псевдопервого порядка. Было обнаружено гиперболическое снижение наблюдаемой константы скорости реакции ( $k_{\text{obs}}$ ) с увеличением исходной concentra-

ции 3-аминопиридин-2(1H)-онов (рис. 2б). Такая ситуация, в частности, может наблюдаться, когда скорость лимитирующей стадией является мономолекулярный процесс или в случае конкурентного ингибирования продуктом реакции [6]. В пользу последнего свидетельствует прямолинейная зависимость наблюдаемой константы скорости реакции от концентрации фермента (врезка на рис. 2б) [6, 7]. Для дальнейшего анализа полученных данных строили график зависимости начальной скорости реакции от концентрации флуоресцентного соединения в координатах Лайнуивера–Берка. Было показано для всех соединений, что данная зависимость является линейной при различных (но постоянных) концентрациях пероксида водорода. В качестве примера на рис. 2в приведены графики Лайнуивера–Берка для исследуемых соединений в присутствии 50 мкМ пероксида водорода. Как видно из рисунка, данные соединения можно ранжировать в соответствии с величиной  $V_{\text{max}}/K_m$ , которая определяется по тангенсу угла наклона прямой (равному  $K_m/V_{\text{max}}$ ) и отражает субстратную специфичность фермента. На рис. 3 также представлены графики Лайнуивера–Берка для исследуемых соединений в присутствии различных концентраций пероксида водорода (6.25, 12.5, 25 и 100 мкМ), а также полученные значения  $V_{\text{max}}/K_m$ .

Сравнение кинетики окисления 3-аминопиридин-2(1H)-онов пероксидом водорода свидетельствуют об увеличении скорости окисления при замене фенильного заместителя в 4-м положении (С1) на диметоксифенильный (С4) или тиофеновый (С5), в этом же ряду увеличивается специфичность фермента к субстрату ( $V_{\text{max}}/K_m$ ). Введение в структуру 3-аминопиридинона (С1) алкильного заместителя при аминогруппе либо не влияет на кинетику окисления и стехиометрию процесса (С2), либо приводит к снижению скорости окисления и увеличению количества окислителя, требуемого для полного окисления зонда (С3). Введение фурилметильного заместителя при аминогруппе (С6) также приводит к замедлению процесса окисления. Полученные кинетические данные также свидетельствуют в пользу того, что окисление исследуемых 3-аминопиридин-2(1H)-онов конкурентно ингибируется продуктом реакции.

Таким образом, увеличение полярности заместителя в 4-м положении приводит к увеличению скорости окисления и субстратной специфичности фермента, тогда как наличие заместителей при аминогруппе в 3-м положении, в целом, приводит к снижению данных параметров (скорости окисления и субстратной специфичности). В целом, полученные данные проясняют механизмы взаимодействия HRP и 3-аминопиридинов и говорят о том, что 3-аминопиридины могут быть



**Рис. 3.** Сравнение кинетических параметров окисления 3-аминопиридин-2(1H)-онов в присутствии пероксидазы хрена и пероксида водорода в различных концентрациях. Левый столбец: зависимости Лайнуивера–Берка для исследуемых соединений в присутствии различных концентраций пероксида водорода: 6.25 мкМ (а), 12.5 мкМ (в), 25 мкМ (д), 100 мкМ (ж). Правый столбец: значения  $V_{\max}/K_m$ , полученные для структурно близких пиридинов в присутствии различных концентраций пероксида водорода: 6.25 мкМ (б), 12.5 мкМ (г), 25 мкМ (е), 100 мкМ (з). Представлено среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение в пяти независимых экспериментах. \* – Достоверные различия по сравнению с C1–C3 и C6,  $p < 0.05$ ; § – достоверные различия по сравнению с C2, C3 и C6,  $p < 0.05$ ; # – достоверные различия по сравнению с C3 и C6,  $p < 0.05$ .

использованы для разработки чувствительных методов детекции пероксида водорода и модификации методик иммуноферментного анализа.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием приборной базы ЦКП ИТЭБ РАН.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Синтез исследуемых соединений и оценка основных кинетических параметров окисления пиридинов при постоянной концентрации фермента осуществлялись при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-13-00356). Эксперименты, направленные на изучение субстратной специфичности и прояснение механизмов взаимодействия соединений с ферментом, осуществлялись при финансовой поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-00224-24-03).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Krainer F. W. and Glieder A. An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99** (4), 1611–1625 (2015). DOI: 10.1007/s00253-014-6346-7
2. Shatsauskas A., Shatalin Yu., Shubina V., Zablodtskii Yu., Chernenko S., Samsonenko A., Kostyuchenko A., and Fisyuk A. Synthesis and application of new 3-amino-2-pyridone based luminescent dyes for ELISA. *Dyes and Pigments*, **187**, 109072 (2021). DOI: 10.1016/j.dyepig.2020.109072
3. Paul K.-G. and Stigbrand T. Four isoperoxidases from horse radish root. *Acta Chemica Scandinavica*, **24**, 3607–3617 (1970). DOI: 10.3891/acta.chem.scand.24-3607
4. Nelson D. P. and Kiesow L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). *Anal. Biochem.*, **49** (2), 474–478 (1972). DOI: 10.1016/0003-2697(72)90451-4
5. Michaelis L., Menten M. L., Johnson K. A., and Goody R. S. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis–Menten paper. *Biochemistry*, **50** (39), 8264–8269 (2011). DOI: 10.1021/bi201284u
6. Boskovic D. S. and Krishnaswamy S. Exosite binding tethers the macromolecular substrate to the prothrombinase complex and directs cleavage at two spatially distinct sites. *J. Biol. Chem.*, **275** (49), 38561–38570 (2000). DOI: 10.1074/jbc.M006637200
7. Wang Z. X. Kinetic study on the dimer-tetramer interconversion of glycogen phosphorylase A. *Eur. J. Biochem.*, **259** (3), 609–617 (1999). DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00058.x

## Kinetics of Oxidation of 3-Aminopyridin-2(1H)-ones by Hydrogen Peroxide in the Presence of Horseradish Peroxidase

V.S. Shubina\*, Yu.V. Shatalin\*, A.L. Shatsauskas\*\*, \*\*\*, and A.S. Fisyuk\*\*, \*\*\*

\*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

\*\*Omsk State Technical University, prosp. Mira 11, Omsk, 644050 Russia

\*\*\*F.M. Dostoevsky Omsk State University, prosp. Mira 55a, Omsk, 644077 Russia

The aim of the present work was to estimate the kinetic parameters of oxidation of some 3-aminopyridin-2(1H)-ones by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase and the affinity of horseradish peroxidase towards these compounds. It was shown that the oxidation of 3-aminopyridin-2(1H)-ones follows pseudo-first-order kinetics. It was also found that a hyperbolic decline in the observed rate constant ( $k_{\text{obs}}$ ) occurred with increasing initial concentrations of 3-aminopyridin-2(1H)-ones. The dependence of  $k_{\text{obs}}$  on enzyme concentration was linear, suggesting competitive inhibition of oxidation by the reaction product. It was found that the increased polarity of the substituent at the 4<sup>th</sup> position led to the rise in the rate of oxidation of the pyridinones. The  $V_{\text{max}}/K_{\text{m}}$  values were also greater for compounds bearing polar substituent at the 4<sup>th</sup> position. This kinetic parameter ( $V_{\text{max}}/K_{\text{m}}$ ) reflects the substrate specificity of enzyme. Data obtained help better understand the mechanisms of interactions between horseradish peroxidase and 3-aminopyridin-2(1H)-ones suggesting that 3-aminopyridinones can be used for the development of a rather sensitive method for detection of hydrogen peroxide and modification of ELISA.

**Keywords:** 3-aminopyridin-2(1H)-one, fluorescent dye, horseradish peroxidase, oxidation kinetics, substrate specificity