

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АПОПЛАСТНЫХ ПЕРОКСИДАЗ ИЗ КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ С НИТРИТОМ И НИТРАТОМ: ИНТЕРМЕДИАТЫ И ПРОДУКТЫ

© 2022 г. Е. И. Галеева<sup>а, \*</sup>, Л. В. Викторова<sup>а</sup>, О. П. Гурьянов<sup>а</sup>,  
А. А. Суханов<sup>б</sup>, А. В. Часов<sup>а, с</sup>, Ф. В. Минибаева<sup>а, с, \*\*</sup>

<sup>а</sup>Казанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение  
Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

<sup>б</sup>Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского — обособленное структурное подразделение  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр  
“Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

<sup>с</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

\*e-mail: e.galeeva@kibb.knc.ru

\*\*e-mail: minibayeva@kibb.knc.ru

Поступила в редакцию 15.04.2021 г.

После доработки 04.05.2021 г.

Принята к публикации 04.05.2021 г.

Пероксидазы широко распространены в животных и растительных тканях, где они выполняют разнообразные функции. Пероксидазы обладают широкой специфичностью к разнообразным по химическому строению субстратам. Наряду с перекисью водорода, фенольными соединениями и токсичными соединениями ароматической природы, субстратами пероксидаз являются азотсодержащие соединения. Настоящая работа посвящена изучению роли экстраклеточных пероксидаз пшеницы в метаболизме азотсодержащих соединений. Было показано, что частично очищенные изоферменты, различающиеся по пероксидазной активности, принимают участие в метаболизме азотсодержащих соединений. Продемонстрировано образование первичных и вторичных феноксильных радикалов при совместном окислении хлорогеновой кислоты, нитрита и  $H_2O_2$ . При совместном окислении очищенными изоферментами *p*-кумаровой кислоты и нитрита выявлено образование 4-гидрокси-3-нитрокоричной кислоты. Мы предполагаем, что одни и те же изоформы могут участвовать как в окислении нитрита с образованием нитрофенола, так и в восстановлении нитрата. Участие растительных пероксидаз в метаболизме азота можно представить в виде совокупности реакций по восстановлению и/или окислению азота разной степени окисленности с образованием активных интермедиатов.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum*, апопластная пероксидаза, нитрит, нитрат, феноксильные радикалы

**DOI:** 10.31857/S0015330322010043

### ВВЕДЕНИЕ

Пероксидаза (ПО) является ключевым ферментом окислительно-восстановительного метаболизма, вовлеченным как в генерацию, так и в утилизацию активных форм кислорода (АФК) [1, 2]. Известно, что ПО обладает широкой субстратной специфичностью к разнообразным по химическому строению субстратам. Наряду с перекисью водорода, фенольными соединениями и токсичными соединениями ароматической природы, субстратами ПО являются соединения азота различной степени окисленности — нитраты и нитриты [3–5].

**Сокращения:** АФК — активные формы кислорода, АФА — активные формы азота, ПО — пероксидаза, ЭКР — экстраклеточный раствор.

В растениях одним из ключевых процессов азотного метаболизма является восстановление нитратов, происходящее как в листьях, так и в корнях с участием ферментов нитратредуктазы и нитритредуктазы [6]. Наряду с этим, в метаболизм азотных соединений могут быть также вовлечены и оксидоредуктазы, в частности, пероксидазы [7]. Взаимодействие ПО с азотными соединениями может сопровождаться образованием заряженных побочных продуктов, обладающих неспаренным электроном, а поэтому являющихся реакционно-активными. Потенциально это взаимодействие может сопровождаться образованием активных форм азота (АФА), таких как радикал диоксида азота  $NO_2$ , три- и тетроксиды диазота  $N_2O_3$ ,  $N_2O_4$ , монооксид азота  $NO$ , пероксинитрит  $ONOO^-$ ,

S-нитрозоглутатион GSNO, S-нитрозотиол SNO [7, 8]. Известно, что АФА играют важную роль в передаче сигнала в растениях и регулируют широкий спектр физиологических и биохимических реакций [9, 10]. В частности, NO принимает участие в регуляции клеточного цикла растительной клетки, процессов дифференциации и морфогенеза растений. Он вовлечен в трансдукцию сигналов, стимулирующих синтез фитогормонов [11]. К настоящему времени накоплены данные об участии NO в ответных реакциях растений на действие стрессоров [11, 12]. Кроме того, АФА окисляют и нитрируют нуклеиновые кислоты, белки и липиды [9].

До настоящего времени роль ПО в метаболизме азотных соединений слабо изучена. В клетках животных показано, что некоторые ПО участвуют в образовании АФА [8], кроме того, некоторые ПО животного и растительного происхождения могут использовать NO в качестве субстрата [13, 14]. Вовлечение отдельных изоформ ПО, изолированных из сельскохозяйственных растений, в том числе злаковых, в метаболизм азотных соединений не было показано. Именно сельскохозяйственные растения подвергаются значительному стрессу при внесении высоких доз азотных удобрений, что ведет к накоплению азотистых соединений и продуктов их метаболизма в растениях и, в конечном итоге, в организме животных и человека, потребляющих эти растения с пищей. В работе Huang с соавт. [15] показано, что коммерческий препарат ПО хрена катализирует образование NO из гидроксимочевины в присутствии  $H_2O_2$ . Кроме того, трансгенные растения табака со сверхэкспрессией гена пероксидазы *swpa4* обладали повышенным уровнем NO [16]. В работе Sakihama с соавт. [5] продемонстрировано нитрование растительных фенолов с использованием коммерческого препарата ПО хрена. Реакция нитрования фенолов ПО хрена была подробно изучена в работе Kong с соавт. [17], проанализированы кинетические характеристики и предложен пинг-понг механизм двухсубстратной ферментативной реакции (механизм двойного замещения). Эти данные свидетельствуют о сложном характере взаимодействия растительных ПО, азотсодержащих соединений и фенольных субстратов ПО с образованием биологически-активных интермедиатов. В связи с этим, целью настоящего исследования была идентификация продуктов взаимодействия экстраклеточных ПО корней пшеницы с фенолами в присутствии азотных соединений. Для достижения этой цели в задачи исследования входили: 1) определение промежуточного продукта радикальной природы, образующегося в результате совместного ПО-опосредованного окисления фенолов и нитритов; 2) идентификация конечного продукта этой реакции.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объект.** Объектом исследования служили проростки яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Казанская юбилейная, выращенные на растворе 0.25 мМ  $CaCl_2$  при 23°C, 12-часовом светопериоде и плотности потока энергии 100 Вт/м<sup>2</sup>. Корни 5-дневных проростков немедленно после отсечения от проростков инфильтровали Трис-НСl буфером (50 мМ рН 7.4) под давлением 80 кПа в течение 30 с. Буфер после инфильтрации (экстраклеточный раствор, ЭКР) использовали для выделения белков. Цитоплазматическое загрязнение ЭКР определяли по активности маркерного цитоплазматического белка глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49) [18]. Содержание белка измеряли методом Брэдфорд [19].

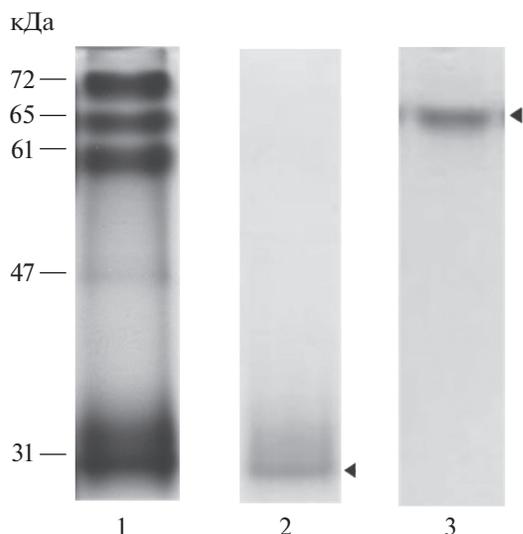
**Очистка белков.** Экстраклеточные белки осаждали  $(NH_4)_2SO_4$  (30–80%) и центрифугировали при 23500 g в течение 20 мин. Образовавшийся осадок ресуспендировали в Трис-НСl буфере (50 мМ рН 7.4) и диализовали против Трис-НСl буфера (25 мМ рН 9.0) в течение ночи при 4°C.

Ионообменную хроматографию проводили на колонке (1.5 × 13 см) с ДЭАЭ-сефадексом А-50, уравновешенную Трис-НСl буфером (25 мМ рН 9.0). Связавшиеся белки элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl (0–0.6 М) в том же буфере со скоростью 0.4 мл/мин. Объем фракций составлял 1 мл. Анализ гомогенности изоформ пероксидаз в каждой хроматографической фракции проводили методом электрофореза в неденатурирующих условиях, без добавления Na-ДДС и меркаптэтанола, в 12% ПААГ с последующим окрашиванием бензидином для визуализации пероксидазной активности (см. ниже). Молекулярную массу белков определяли с помощью маркеров молекулярной массы широкого диапазона (Bio-Rad, США) и окрашиванием гелей Кумаси G250. Для дальнейшего анализа образцы концентрировали методом ультрафильтрации на мембране Ultracel-10K (Merck Millipore, США).

Изоэлектрофокусирование белков проводили в ПААГ с использованием амфолинов рН 3.5–10 (LKB, Швеция). Для определения изоэлектрической точки белков использовали набор стандартов IEF-M1A (3.6–9.3) (Sigma, США).

Активность изоферментов пероксидазы в геле выявляли с помощью окрашивания 0.05 М раствором бензидина с 30 мМ  $H_2O_2$  в ацетатном буфере (0.2 мМ, рН 5.2).

**Определение активности ферментов.** Активность ПО (КФ 1.11.1.7.) измеряли спектрофотометрически (Perkin Elmer, США) с использованием бензидина в качестве субстрата ( $\epsilon_{390} = 34 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ). Реакционная смесь общим объемом 3 мл состояла из ацетатного буфера (100 мМ, рН 5.3), 1 мМ  $H_2O_2$ , 1 мМ бензидина и 0.5 мл образца. Определение



**Рис. 1.** Изоферментный спектр экстраклеточных ПО пшеницы: 1 – неочищенный экстракт, 2 – частично очищенная ПО1, 3 – частично очищенная ПО2.

активности пероксидаз по окислению *p*-кумаровой кислоты ( $\epsilon_{285} = 17.787 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) проводили в следующих условиях: К-фосфатный буфер (35 mM, pH 7.4), 0.1 mM *p*-кумаровая кислота, 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  и 0.05 мл образца, общий объем реакционной смеси составлял 0.5 мл. Нитратредуктазную активность ферментативной реакции – нитрита [20]. Реакционная смесь общим объемом 0.5 мл состояла из 30 mM Na-фосфатного буфера pH 8.0, 100 mM  $\text{KNO}_3$ , 0.64 mM  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , 0.64 mM диэтилдитиокарбамата натрия и 0.05 мл образца. Смесь инкубировали 20 мин при комнатной температуре, реакцию останавливали добавлением 0.05 мл ледяной уксусной кислоты, затем приливали 0.55 мл реактива Грисса и выдерживали в течение 20 мин. Количество образовавшегося продукта измеряли спектрофотометрически при 527 нм (Perkin Elmer, США).

В экспериментах по анализу ингибирования ферментативных реакций ингибиторы добавляли в инкубационную смесь перед добавлением фермента.

**Определение феноксильного радикала.** Детектирование феноксильного радикала осуществляли методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [21]. Реакционная смесь состояла из Трис-HCl буфера (20 mM, pH 7.4), 1 mM хлорогеновой кислоты, 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  и 0.05 мл очищенного фермента. Эксперименты проводили в присутствии или в отсутствие 5 mM  $\text{KNO}_2$ . Для улавливания короткоживущих первичных радикалов добавляли 0.1 мл 1 M  $\text{ZnSO}_4$  [22]. Спектры ЭПР приготовленных образцов регистрировали на спектрометре X-диапазона EMX (Bruker, Германия) при комнатной температуре.

**Идентификация нитрофенола.** Анализ реакции нитрования *p*-кумаровой кислоты пероксидазами проводился по модифицированному протоколу Sakihama с сотр. [5]. Реакционная среда состояла из К-фосфатного буфера (25 mM, pH 7.4), 10 mM  $\text{KNO}_2$ , 0.2 mM *p*-кумаровой кислоты, 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  и 0.05 мл очищенного фермента. Контроль образования 4-гидрокси-3-нитрокоричной кислоты проводился спектрофотометрически (Perkin Elmer, США) по увеличению оптической плотности при 440 нм.

Идентификация продукта нитрования *p*-кумаровой кислоты пероксидазами проводилась с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ, Gilson, США). Реакционную смесь (К-фосфатный буфер (20 mM, pH 7.4), 100 mM  $\text{KNO}_2$ , 2 mM *p*-кумаровая кислота, 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) инкубировали с 0.1 мл очищенного фермента в течение 60 мин и центрифугировали при 5000 g в течение 5 мин. Полученный супернатант подвергали хроматографическому разделению с использованием колонки с обращенной фазой C-18 (Ultrasphere ODS,  $4.6 \times 250$  мм, Beckman, США). Связавшееся вещество элюировали К-фосфатным буфером (50 mM, pH 7.0). Скорость элюирования составляла 0.5 мл/мин, объем вводимой пробы – 100 мкл. Выход веществ контролировали по поглощению при 314 и 440 нм с помощью диодно-матричного детектора (Shimadzu SPD-M20A, Япония). Хроматографический профиль продукта сравнивали с профилем стандарта. Стандарт 4-гидрокси-3-нитрокоричная кислота был синтезирован в виде желтых игольчатых кристаллов из 4-гидрокси-3-нитробензальдегида и малоновой (пропандионовой) кислоты по протоколу Freund [23]. Подтверждение структуры стандарта осуществляли методом  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 МГц, Bruker, Германия).

Опыты проводили в трех-пяти биологических повторностях, каждый вариант имел 3-кратную аналитическую повторность. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Office Excel 2010. В таблицах приведены средние значения и их стандартные ошибки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В ЭКР корней пшеницы были обнаружены белки, обладающие пероксидазной (16.9 ммоль/мин на мг белка) и нитратвосстанавливающей (3.3 ммоль/мин на мг белка) активностями. Наличие лишь следовых количеств цитоплазматического загрязнения (<0.99%) говорит о присутствии в растворе лишь апопластных белков. Изоферментный спектр апопластных пероксидаз пшеницы был представлен пятью анионными и катионными изоформами с молекулярными массами от 31 до 72 кДа (рис. 1) и изоэлектрическими точками от 3.6 до 7.9 (данные не представлены). Частичная очистка с помощью осаждения  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (30–80%) и

**Таблица 1.** Peroксидазная и нитратвосстанавливающая активности ПО1 и ПО2

Изоформы	Молекулярная масса, кДа	Пероксидазная активность		Нитратвосстанавливающая активность, ммоль/(мг белка мин)
		окисление бензидина ммоль/(мг белка мин)	окисление <i>p</i> -кумаровой кислоты, ммоль/(мг белка мин)	
ПО1	31	2.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.8 ± 0.1
ПО2	65	43.5 ± 1.7	3.6 ± 0.1	5.5 ± 0.3

**Таблица 2.** Ингибирование пероксидазной и нитратвосстанавливающей активностей ПО1 и ПО2 пшеницы

Ингибитор	Концентрация, мМ	Пероксидазная активность, % от контроля		Нитратвосстанавливающая активность, % от контроля	
		ПО1	ПО2	ПО1	ПО2
NaN <sub>3</sub>	0.1	85 ± 3	98 ± 2	3 ± 1	6 ± 1
NaN <sub>3</sub>	1	52 ± 4	48 ± 2	0	0
KCN	0.1	16 ± 4	1 ± 0	15 ± 2	2 ± 0
KCN	1	13 ± 3	0	3 ± 1	1 ± 0

Примечание: пероксидазная и нитратвосстанавливающая активности в контроле (100%) приведены в таблице 1.

ионно-обменной хроматографии выявила наличие двух основных изоформ ПО – ПО1 с молекулярной массой 31 кДа и *r*I 3.6 и ПО2 с молекулярной массой 65 кДа и *r*I 6.9 (рис. 1). Было обнаружено, что нейтральная изоформа ПО2 проявляла более высокую пероксидазную активность по окислению бензидина (в 19 раз) и естественного субстрата – *p*-кумаровой кислоты (в 24 раза), а также нитратвосстанавливающую активность (в 7 раз) по сравнению с ПО1 (табл. 1). И пероксидазная, и нитратвосстанавливающая активности ПО1 и ПО2 ингибировались NaN<sub>3</sub> и KCN. Азид более эффективно подавлял нитратвосстанавливающую активность ПО1 и ПО2, чем пероксидазную активность (табл. 2). Цианид эффективно ингибировал обе ферментативные реакции, причем в большей степени у ПО2, чем у ПО1.

Окисление фенольных субстратов ПО сопровождается образованием ряда промежуточных продуктов, в том числе феноксильных радикалов. Образование первичных и вторичных феноксильных радикалов с характерными спектрами ЭПР было выявлено при окислении частично очищенной ПО2 пшеницы естественного фенольного субстрата – хлорогеновой кислоты (рис. 2а). Аналогичные результаты были показаны с ПО1 (данные не представлены). Через несколько минут после начала реакции спектр ЭПР менялся, первичные радикалы преобразовывались во вторичные (рис. 2б). Динамика накопления вторичных радикалов в присутствии ПО свидетельствует о постепенном их накоплении, в то время как при добавлении нитрита образование вторичных радикалов происходило мгновенно (рис. 2в). В отсутствие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

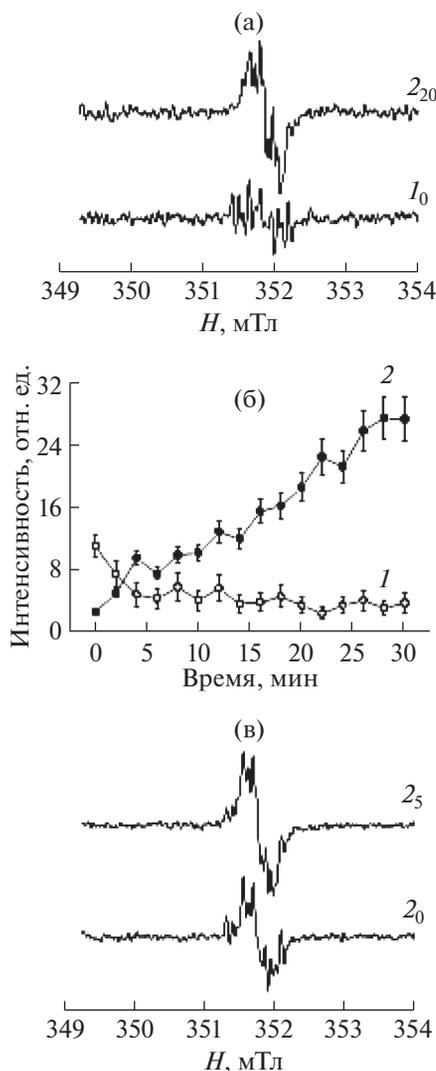
образования радикалов не происходило (данные не представлены).

Спектрофотометрический анализ продуктов реакции совместного окисления KNO<sub>2</sub> и *p*-кумаровой кислоты ПО2 корней пшеницы выявил образование нитропроизводного соединения. Повышение оптической плотности при 440 нм, по данным Sakihama с соавт. [5], свидетельствует об образовании 4-гидрокси-3-нитрокоричной кислоты (рис. 3). Аналогичные результаты получены для ПО1 (данные не показаны).

Хроматографический анализ продуктов реакции совместного окисления KNO<sub>2</sub> и *p*-кумаровой кислоты ПО2 корней пшеницы выявил образование нитропроизводного соединения (рис. 4). Без добавления KNO<sub>2</sub> (рис. 4) или в отсутствие ПО (данные не показаны) образования нитрофенола не происходило. Сравнение оптических спектров поглощения синтезированного стандарта 4-гидрокси-3-нитрокоричной кислоты и нитропроизводного продукта окисления ПО выявило идентичность формы спектров с характерными максимумами поглощения в области 314 и 440 нм при нейтральном pH (рис. 4а, б).

## ОБСУЖДЕНИЕ

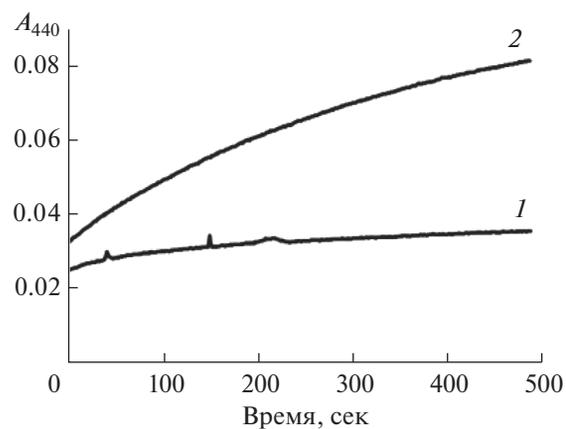
Накопление азотсодержащих соединений и продуктов их метаболизма очень токсично для растений и животных. Наряду с нитрат- и нитритредуктазами, метаболизирующими эти соединения, оксидоредуктазы ПО также могут утилизировать азотсодержащие соединения, что приводит к образованию



**Рис. 2.** Образование феноксильных радикалов при окислении хлорогеновой кислоты ПО2. (а) – при окислении хлорогеновой кислоты ПО2 без  $\text{KNO}_2$ , (б) – динамика накопления вторичных радикалов без  $\text{KNO}_2$ , (в) – при окислении хлорогеновой кислоты ПО2 при добавлении 5 мМ  $\text{KNO}_2$ . 1 – первичный радикал ( $g = 2.0044$ ),  $I_0$  – 0 мин; 2 – вторичный радикал ( $g = 2.00415$ ),  $2_0, 2_5, 2_{20}$  – 0, 5, 20 мин, соответственно.

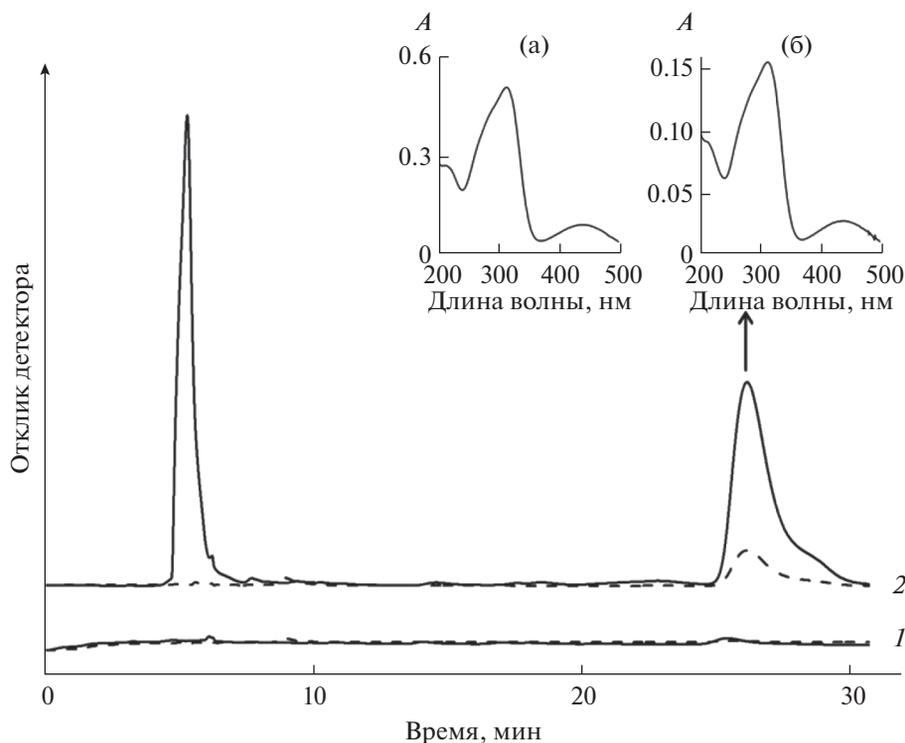
нитропроизводных фенольных соединений. В настоящей работе мы продемонстрировали, что апопластные ПО корней пшеницы могут участвовать в метаболизме азотсодержащих соединений, окисляя совместно нитриты и фенолы, в частности, с образованием 4-гидрокси-3-нитрокоричной кислоты, а также вероятно, путем восстановления нитратов до нитритов.

Как известно, окисление ПО фенольных субстратов сопровождается образованием ряда промежуточных продуктов, в том числе феноксильных радикалов, которые можно детектировать методом ЭПР [21, 24]. В настоящей работе обнаружено образование феноксильных радикалов апопластными



**Рис. 3.** Образование нитропроизводного соединения *p*-кумаровой кислоты ( $\lambda = 440$  нм) при добавлении  $\text{KNO}_2$ . 1 – без  $\text{KNO}_2$ , 2 – с добавлением  $\text{KNO}_2$ .

ПО пшеницы при использовании хлорогеновой кислоты в качестве фенольного субстрата (рис. 2). В ходе окисления хлорогеновой кислоты апопластной ПО первичные феноксильные радикалы постепенно преобразовывались в более стабильные вторичные радикалы. Ранее образование первичных и вторичных радикалов хлорогеновой кислоты было показано с использованием коммерческого препарата ПО хрена [21]. По данным Sakihama с сотр. [24], время полужизни первичных феноксильных радикалов составляет 45 с, время полужизни вторичных радикалов составляет уже 20 мин. Увеличение времени жизни феноксильных радикалов за счет взаимодействия с двухвалентными металлами приводит к проявлению проокислительных свойств радикалов, и, как следствие, перекисному окислению липидов и повреждению ДНК [24]. Наряду с этим, известно, что феноксильные радикалы могут проявлять антиоксидантные свойства, принимая участие в детоксикации  $\text{H}_2\text{O}_2$ , гидроксильного радикала, синглетного кислорода, поскольку являются промежуточными продуктами при окислении фенолов пероксидазами [24]. В дальнейшем феноксильные радикалы либо восстанавливаются до фенола с помощью аскорбата или монодегидроаскорбат редуктазы [21], либо, при наличии нитритов и пероксидазы, нитрируются с образованием нитропроизводного [5]. В наших экспериментах добавление в реакционную смесь нитрита индуцировало мгновенное образование вторичных феноксильных радикалов даже в отсутствие ПО (рис. 2). Возможно, генерация вторичных феноксильных радикалов происходит неферментативным путем. Учитывая, что в отсутствие нитрита конверсия первичных радикалов и накопление вторичных радикалов происходит постепенно, можно полагать, что нитрит резко повышает токсичность действия феноксильных радикалов.



**Рис. 4.** Хроматографический анализ продуктов реакции окисления KNO<sub>2</sub> и *p*-кумаровой кислоты ПО2 пшеницы. Сплошная линия – 314 нм, прерывистая – 440 нм. 1 – контроль, 2 – KNO<sub>2</sub>. Во вставках показаны оптические спектры поглощения стандарта 4-гидрокси-3-нитрокоричной кислоты (а) и продукта окисления *p*-кумаровой кислоты (б).

Для ПО различного происхождения характерно одновременное окисление нескольких субстратов [25]. Финальным продуктом совместного превращения фенольных соединений и нитритов, происходящее через образование промежуточных феноксильных радикалов, являются нитропроизводные фенолов [5]. В нашей работе при совместном окислении очищенными ПО1 и ПО2 кумаровой кислоты и нитрита обнаружено образование 4-гидрокси-3-нитрокоричной кислоты (рис. 3). В отсутствие ПО появления этого нитропроизводного не наблюдается. Содержание нитрокоричной кислоты среди остальных продуктов реакции невелико (рис. 4), однако эта кислота имеет важное защитное значение. Например, известно, что присоединение нитрогруппы к тирозину, и в меньшей степени к триптофану, может приводить к изменению физико-химических свойств белков и их функций. Так, добавление нитрогруппы вызывает заметный сдвиг рКа гидроксильной группы с 10.07 в тирозине до 7.50 в 3-нитротирозине и повышает гидрофобность тирозина, что сказывается на активности белка. Присутствие 3-нитротирозина связывают с широким спектром заболеваний человека и животных [26]. В растениях нитрование тирозина вовлечено в разнообразные метаболические процессы, а также в ответные реакции на действие абиотических и биотических стрессоров [27, 28]. Оксикоричные кислоты близ-

ки по строению к тирозину, и их нитрование предотвращает нитрование аминокрупп белков [5]. Таким образом, образование нитрофенолов в результате совместного окисления фенолов и нитритов ПО может способствовать уменьшению нитрования белков.

Ранее нами было показано, что в листьях пшеницы при помещении растений в темноту происходило активирование ПО. Интересно, что при добавлении избытка нитрата значительного активирования ПО не наблюдалось [29]. Возможно, что снижение ПО активности по окислению фенолов в присутствии нитрата в темноте связано с взаимодействием нитрата с активным центром ПО. Известно, что нитрат ингибирует образование соединения E1 (промежуточной полуокисленной формы фермента), связываясь внутри гемового “кармана” ПО [30]. Ранее было высказано предположение об участии ПО в восстановлении нитратов. Так, Пейве с соавт. [3] обнаружили нитратвосстанавливающую активность ПО во всех органах кормовых бобов, с более высоким уровнем в корнях. В наших экспериментах экстраклеточные ПО корней пшеницы также проявляли нитратвосстанавливающую активность с образованием нитрита. Интересно, что нитратвосстанавливающая активность ПО корней была более чувствительна к ингибитору гемсодержащих ферментов азиду, чем фенолоксидазная активность

ПО (табл. 2). Аналогичные результаты с использованием коммерческого препарата ПО хрена были получены Иванова с соавт. [20]. Чувствительность к цианиду обеих активностей ПО пшеницы в наших экспериментах была одинакова (табл. 2). Можно полагать, что, несмотря на то, что основным нитратвосстанавливающим ферментом в клетках растений является нитратредуктаза, в определенных условиях, например, при избыточном обеспечении растений нитратами или других стрессах, конкурентные взаимоотношения  $H_2O_2$  и нитрата приводят к “включению” нитратвосстанавливающей активности ПО.

Таким образом, участие ПО в метаболизме азота можно представить в виде совокупности реакций по восстановлению и окислению азота разной степени окисленности. Поступившие в корни нитраты в определенных условиях могут с помощью ПО корневой метаболизироваться в нитриты, которые впоследствии могут быстро восстанавливаться нитритредуктазой до аммиака или посредством ПО включаться в состав нитропроизводных фенольных соединений. Кроме того, как показано данными ЭПР, ПО корней участвует в образовании первичных и вторичных феноксильных радикалов, которые являются интермедиатами образования нитрофенолов. В настоящей работе нами впервые показано участие одних и тех же изоформ ПО корней пшеницы как в возможном восстановлении нитрата, так и в окислении нитрита с образованием нитрофенола. Имеющиеся в настоящий момент данные свидетельствуют о том, что ПО могут регулировать концентрацию АФА. В частности, не исключено, что ПО-опосредованный метаболизм азота в растениях сопровождается образованием АФА, обладающих большим регуляторным действием. Будущие исследования прольют свет на вовлечение и физиологические роли растительных ПО в образовании и метаболизме АФА, таких как  $NO_2$  и  $NO$ , как побочных продуктов совместного окисления азотсодержащих соединений и фенолов.

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук” (анализ активности ферментов) с использованием оборудования Коллективного спектро-аналитического Центра физико-химических исследований строения, состава и свойств веществ и материалов Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук” и частично в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (получение химического стандарта).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит ка-

ких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bolwell G.P., Bindschedler L.V., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner S.L., Gerrish C., Minibayeva F.* The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53. P. 1367.
2. *Francoz E., Ranocha P., Nguyen-Kim H., Jamet E., Burlat V., Dunand C.* Roles of cell wall peroxidases in plant development // *Phytochemistry*. 2015. V. 112. P. 15. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.07.020>
3. *Пейве Я.В., Иванова Н.Н., Овчаренко Г.А., Ширинская М.Г.* О возможном участии пероксидазы в восстановлении нитратов в растениях // *Физиология растений*. 1975. Т. 22. С. 527.
4. *Hewitt E.J.* Assimilatory nitrate-nitrite reduction // *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1975. V. 26. P. 73.
5. *Sakihama Y., Tamaki R., Shimoji H., Ichiba T., Fukushi Y., Tahara S., Yamasaki H.* Enzymatic nitration of phytophenolics: evidence for peroxyxynitrite-independent nitration of plant secondary metabolites // *FEBS Lett.* 2003. V. 553. P. 377. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)01059-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)01059-7)
6. *Campbell W.H.* Structure and function of eukaryotic NAD(P)H:nitrate reductase // *Cell Mol. Life Sci.* 2001. V. 58. P. 194. <https://doi.org/10.1007/PL00000847>
7. *Van Der Vliet A., Eiserich J.P., Halliwell B., Cross C.E.* Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite: a potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 7617. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.12.7617>
8. *Palmerini C.A., Marmottini F., Arienti G.* Production of nitric oxide by human salivary peroxidase and by bovine lactoperoxidase // *J. Biochem. Mol. Toxic.* 2012. V. 26. P. 87. <https://doi.org/10.1002/jbt.21407>
9. *Adams L., Franco M.C., Estevez A.G.* Reactive nitrogen species in cellular signaling // *Exp. Biol. Med.* 2015. V. 240. P. 711. <https://doi.org/10.1177/1535370215581314>
10. *Corpas F.J., del Río L.A., Palma J.M.* Impact of nitric oxide (NO) on the ROS metabolism of peroxisomes // *Plants*. 2019. V. 8. P. 37. <https://doi.org/10.3390/plants8020037>
11. *Domingos P., Prado A.M., Wong A., Gehring C., Feijo J.A.* Nitric oxide: a multitasked signaling gas in plants // *Mol. Plant*. 2015. V. 8. P. 506. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.010>
12. *Santisree P., Bhatnagar-Mathur P., Sharma K.K.* NO to drought-multifunctional role of nitric oxide in plant drought: do we have all the answers? // *Plant Sci.* 2015. V. 239. P. 44. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.07.012>
13. *Abu-Soud H.M., Hazen S.L.* Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 37524. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.48.37524>

14. *Pintusa F., Spanò D., Bellelli A., Angelucci F., Forteb E., Meddaa R., Florisa G.* Nitric oxide, substrate of *Euphorbia characias* peroxidase, switches off the CN- inhibitory effect // FEBS Open Bio. 2012. V. 2. P. 305. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2012.09.004>
15. *Huang J., Sommers E.M., Shapiro D.B.K., King S.B.* Horseradish peroxidase catalyzed nitric oxide formation from hydroxyurea // J. Am. Chem. Soc. 2002. V. 124. P. 3473. <https://doi.org/10.1021/ja012271v>
16. *Kim Y.-H., Park S.C., Yun B.-W., Kwak S.-S.* Overexpressing sweetpotato peroxidase gene *swpa4* affects nitric oxide production by activating the expression of reactive oxygen species- and nitric oxide-related genes in tobacco // Plant Physiol. Biochem. 2017. V. 120. P. 52. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.09.023>
17. *Kong M., Zhang Y., Li Q., Dong R., Gao H.J.* Peroxidase-catalyzed nitration of phenol in a biphasic system // Microbiol. Biotechnol. 2017. V. 27. P. 297. <https://doi.org/10.4014/jmb.1607.07039>
18. *Кочетов Г.А.* Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 1980. 272 с.
19. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248.
20. *Ivanova N.N., Peive Ya.V.* Nitrate reduction by higher plant peroxidase // FEBS Lett. 1973. V. 31. P. 229.
21. *Yamasaki H., Grace S.C.* EPR detection of phytophenoxyl radicals stabilized by zinc ions: evidence for the redox coupling of plant phenolics with ascorbate in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-peroxidase system // FEBS Lett. 1998. V. 422. P. 377.
22. *Kalyanaraman B., Felix C.C., Sealy R.C.S.* Electron spin resonance-spin stabilization of semiquinones produced during oxidation of epinephrine and its analogues // J. Biol. Chem. 1983. V. 259. P. 354.
23. *Freund W.* A new synthesis of arsonic acids. Part II. Coupling of  $\alpha\beta$ -unsaturated carbonyl compounds with diazotised arsanilic acid and 4-amino-2-nitrophenylarsonic acid // J. Chem. Soc. 1952. V. 588. P. 3072.
24. *Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C., Yamasaki H.* Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants // Toxicology. 2002. V. 177. P. 67. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00196-8](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00196-8)
25. *Хушнұльян Д.М., Фечина В.А., Казаков С.В., Сахаров И.Ю., Газарян И.Г.* Неферментативное взаимодействие продуктов реакции и субстратов в катализе пероксидазой // Биохимия. 2003. Т. 68. С. 1231.
26. *Abello N., Kerstjens, H.A.M., Postma D.S., Bischoff R.* Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated // J. Proteome Res. 2009. V. 8. P. 3222. <https://doi.org/10.1021/pr900039c>
27. *Saito S., Yamamoto-Katou A., Yoshioka H., Doke N., Kawakita K.* Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells // Plant Cell Physiol. 2006. V. 47. P. 689. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcj038>
28. *Minibayeva F., Beckett R.P.* The roles of plant peroxidases in the metabolism of reactive nitrogen species and other nitrogenous compounds // Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signaling and Communication in Plants, Signaling and Communication in Plants / Eds. Gupta K.J., Igamberdiev A.U. Switzerland: Springer International Publishing. 2015. P. 43.
29. *Галеева Е.И., Трифонова Т.В., Пономарева А.А., Викторова Л.В., Минабаева Ф.В.* Нитратредуктаза листьев *Triticum aestivum*: регуляция активности и возможная роль в образовании оксида азота // Биохимия. 2012. Т. 77. С. 512.
30. *Araiso T., Dunford H.B.* Horseradish peroxidase. XLI. Complex formation with nitrate and its effect upon compound I formation // Biochem. Biophys. Res. Co. 1980. V. 94. P. 1177.