

На правах рукописи



**Рогожина
Татьяна Васильевна**

**Исследование активного центра и
механизма действия пероксидазы с помощью
функционально активных веществ**

03.00.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Саратов 2005

Работа выполнена в лаборатории исследования биологически активных веществ
Якутской государственной сельскохозяйственной академии

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Рогожин Василий Васильевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, с.н.с
Антонюк Людмила Петровна

кандидат химических наук, с.н.с
Попов Архип Алексеевич

Ведущая организация: Российский государственный аграрный
университет – МСХА имени К.А. Тимирязева

Защита состоится 15 февраля 2006 г. в 13⁰⁰ часов на заседании
диссертационного совета Д 002.146.01 при Институте биохимии и физиологии
растений и микроорганизмов РАН по адресу: 410049, г. Саратов, просп.
Энтузиастов, 13, ИБФРМ РАН.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биохимии и
физиологии растений и микроорганизмов РАН.

Автореферат разослан « 4 » февраля 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, д.б.н



В.Е. Никитина

2006-4
30775

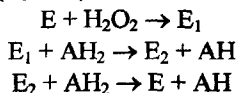
2270698

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Для активной жизнедеятельности растениям и животным необходим кислород. Основное количество кислорода расходуется на выработку энергии и участие в окислительном метаболизме. Однако, небольшая его часть около 2% может переходить в активные формы кислорода (АФК): O_2^- , H_2O_2 , $HO\cdot$, $HOCl$ и др. (Ursini et al., 1989). Для защиты от их разрушительного действия используются компоненты антиоксидантной системы, среди которых высокомолекулярные (СОД, каталаза, пероксидаза) и низкомолекулярные (аскорбиновая кислота, гидрохинон, стероиды, флавоноиды и др.) антиоксиданты.

Интенсивность аэробных процессов может быть оценена по активности пероксидазы, которая катализирует реакции окислительного и пероксидазного окисления неорганических и органических соединений (Рогожин, Курилюк, 1998). Последними могут быть функционально активные вещества (ИУК, гидрохинон, аскорбиновая кислота, НАДН, фенотиазины), способные участвовать в окислительных и пероксидазных реакциях, катализируемых пероксидазой. Среди этих веществ следует выделить антиоксиданты, которые способны подавлять образование свободных радикалов, понижая таким образом уровень ПОЛ в клетках живых организмов.

Таким образом, между пероксидазой и антиоксидантами должна наблюдаться взаимная зависимость, которая недостаточно изучена. Механизм действия пероксидазы в реакциях пероксидазного окисления достаточно сложен. Реакция инициируется перекисью водорода, в результате которой образуются окисленные формы фермента (E_1 и E_2).



В восстановлении фермента участвуют соединения, являющиеся донорами водорода и донорами электронов.

Мнообразие субстратов позволяет предположить, что в реакциях пероксидазного окисления могут реализовываться различные механизмы действия фермента. Все субстраты пероксидазы условно можно разделить на быстро и медленно окисляемые. К быстро окисляемым относят о-дианизидин, гидрохинон, фенолы и амины, а к медленно окисляемым ферроцианид калия, аскорбиновая кислота, НАДН и др. Исследование механизмов пероксидазного окисления органических соединений позволили высказать предположение, что перенос электронов, сопровождаемый переносом протонов происходит с участием функциональных групп белковой глобулы фермента. Показано, что в каталитическом процессе участвует один из остатков гистидина (Гис42). Выявлена функциональная группа с pK 6,5, депротонирование которой приводит к понижению скорости окисления одного из органических субстратов – о-дианизидина. Тогда как модификация трех поверхностных $COOH$ -групп белка пероксидазы, не влияет на кинетические параметры окисления ферроцианида калия, но в 10 раз уменьшает константу скорости реакций E_1 с о-дианизидином, что свидетельствует об участии белковой глобулы пероксидазы в окислении

органических субстратов. Таким образом, при пероксидазном окислении органических субстратов реализуется периферийные механизмы переноса электронов (Лебедева и др., 1996) и активный центр фермента в этом случае включает функциональные группы белка. Причины широкой субстратной специфичности пероксидазы объясняются тем, что на поверхности белка реализуются несколько различных каналов электронного транспорта с субстратов, контактирующих с поверхностью белковой глобулы на железо гема (Угарова и др., 1984).

В реакциях совместного окисления субстратов наблюдается активация или ингибирование окисления одного субстрата другим, а в реакциях совместного окисления быстро и медленно окисляемых субстратов, наблюдается активация медленно окисляемого субстрата и частичное или полное ингибирование превращения быстро окисляемого субстрата (Угарова и др., 1981).

В литературе приводятся данные об активации оксидазного окисления некоторых субстратов пероксидазы (НАДН и ИУК) в присутствии ряда фенолов (Jen et al., 1971; Saikumar et al., 1994; Hori et al., 1994). Отмечается, что механизмы субстрат-субстратной активации различаются для разных субстратов. Так, для р-крезола и аскорбиновой кислоты и люминола и замещенных фенолов методами спектроскопии ЭПР показано, что активация происходит за счет неферментативных процессов. Тогда как в реакции совместного окисления ферроцианида калия и о-дианизидина предложено, что частицей, эффективно окисляющей ферроцианид, является не свободный радикал о-дианизидина, комплекс пероксидазы с полуокисленным субстратом.

Поэтому механизмы совместного окисления соединений в присутствии пероксидазы во многом зависят от структуры субстратов и способны активно реализовываться в биогенных системах. Знание этих механизмов позволит расширить наши представления о функционировании сложных систем и позволит объяснить многие эффекты действия функционально активных веществ. Поэтому актуальность и значимость изучения строения активного центра пероксидазы и протекание механизмов пероксидазного окисления субстратов, реализуемых в реакциях индивидуального и совместного окисления позволили нам сформулировать цель и задачи данной работы.

Цель и задачи исследования. Цель настоящего исследования – изучить строение активного центра, механизмы действия пероксидазы в реакциях совместного окисления субстратов и предложить возможности использования выявленных механизмов в биогенных системах.

В этой связи необходимо было решить следующие задачи:

1. Исследовать влияние индолил-3 – уксусной кислоты на реакции пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты и выявить механизмы регуляторного действия.

2. Изучить механизмы действия индолил-3 – уксусной кислоты на пероксидазные реакции быстро окисляемых субстратов (о-дианизидин и гидрохинон) и проявить места связывания этих субстратов в области активного центра пероксидазы.

3. Исследовать реакции пероксидазного окисления фенотиазинов и предложить механизмы их участия в этих реакциях.

4. Изучить реакции совместного окисления фенотиазинов с о-дианизидином и выявить проявления их индивидуальных свойств в этих реакциях.

5. Установить роль стропантана в реакциях пероксидазного окисления фенотиазинов и о-дианизидина.

6. Выявить влияние аскорбиновой кислоты и сердечных гликозидов в прорастании семян и установить регуляторную роль пероксидазы в этом процессе.

Научная новизна. Исследования влияния ИУК на реакции пероксидазного окисления АК позволили установить, что ауксин ингибирует фермент по конкурентному типу при связывании в активном центре фермента одной молекулы аскорбиновой кислоты. Тогда как в реакциях пероксидазного окисления АК с участием двух и более молекул субстрата ИУК проявляла неконкурентный характер ингибирования. Предложено, что местом связывания АК в активном центре фермента является дистальная область. Изучение реакций совместного пероксидазного окисления о-дианизидина, гидрохинона и ферроцианида калия в присутствии индолил-3-уксусной кислоты позволило высказать предположение, что преимущественным местом связывания ИУК и о-дианизидина в активном центре пероксидазы является гидрофобная область. Тогда как для гидрохинона местом связывания является область на поверхности фермента, содержащая большее число полярных или заряженных аминокислотных остатков.

Впервые изучены пероксидазные реакции окисления фенотиазинов (хлорпромазина, трифтазина и тиопроперазина). Показано, что они являются медленно окисляемыми субстратами пероксидазы. Предложено, что при совместном окислении о-дианизидина и различных фенотиазинов, фермент реализует различные пути переноса электрона с окисляемого субстрата, выбор которых определяется доступностью функциональных групп субстрата каналам переноса электронов на поверхности белковой глобулы. Установлено, что в реакциях индивидуального и совместного окисления в действии пероксидазы реализуются сложные регуляторные механизмы, обеспечивающие протекание каталитического процесса. При этом фермент, не проявляющий избирательность по отношению природы окисляемого субстрата в реакциях индивидуального окисления, приобретает избирательность в реакциях совместного окисления.

Практическая значимость работы. В результате исследований разработана научно-обоснованная программа по изучению механизмов пероксидазного окисления биологически активных веществ.

Предложено, что выявленные эффекты влияния ИУК на пероксидазное окисление аскорбиновой кислоты, катализируемое пероксидазой, имеют важное биологическое значение. ИУК может регулировать пероксидазное окисление медленно окисляемого субстрата, имея специфичный участок связывания в составе дистального домена активного центра пероксидазы. По-видимому, избирательность типов ингибирования пероксидазы ИУК обусловлена специализированностью ауксина, служить оксидным субстратом фермента. При этом ИУК может изменять направленность реакций пероксидазы с одного типа на

другой, меняя специфичность фермента с пероксидазного на оксидазный, превращая пероксидазу в высокоспецифичную оксигеназу, генерирующую свободные радикалы.

Исследования механизмов пероксидазного окисления фенотиазинов позволило высказать предположения о возможных сроках нахождения фенотиазинов в организме человека, а также дать предположительную оценку эффективности их действия. Среди изученных фенотиазинов выраженное седативное действие трифтазина можно объяснить за счет того, что поскольку он в присутствии быстро окисляемого субстрата не окисляется пероксидазой, то он должен дольше сохранять свое функциональное действие. Быстрее всех в организме может окисляться хлорпромазин и его действие должно быть за счет этого непродолжительным. Кроме этого обосновано действие фенотиазинов в присутствии строфантина G при их совместном использовании. Поскольку строфантин G ускоряет окисление тиопроперазина, то при их совместном введении пероксидазное окисление тиопроперазина будет возрастать, что приведет к образованию различных продуктов его окисления и к быстрой потере фармакологического действия. Тогда как пероксидазное окисление трифтазина и хлорпромазина в присутствии строфантина G будет замедляться, обеспечивая, таким образом, пролонгированность действия вводимых препаратов.

Защищаемые положения. 1. В области активного центра фермента имеется обширная субстратсвязывающая площадка, в составе двух специализированных участков связывания субстратов, в действии которых принимают участие две функциональные группы с $pK_1 \sim 5,0$ и $pK_2 \sim 6,5$. 2. В действии пероксидазы заложены сложные регуляторные механизмы, позволяющие ферменту инициировать процесс пероксидазного окисления широкого спектра субстратов, а в механизмах совместного окисления использовать способы регулирования, ускоряя каталитический процесс за счет улучшения связывания окисляемого субстрата или с участием в окислении комплекса фермента с полуокисленным субстратом. 3. Пероксидаза и антиоксиданты (аскорбиновая кислота и стероидные гликозиды) принимают непосредственное участие в механизмах формирования гипобиотических состояний и ответственны за поддержание высокой жизнеспособности семян.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы докладывались и обсуждались на международных, всероссийских конференциях: На научно-практической конференции Международной научно-практической конференции, посвященной 80-летию МГАВМиБ им. К.И.Скрябина (Москва, 1999), IX Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам "Ломоносов-2002" (Москва, 2002), 6-ой, 7-ой, 8-ой и 9-ой Пущинских школах-конференциях молодых ученых "Биология – Наука 21-го века" (Пущино, 2002, 2003, 2004, 2005), Всероссийской конференции "Проблемы медицинской энзимологии" (Москва, 2002), 1-ой Международной школе-конференции молодых ученых по катализу "Каталитический дизайн – от исследований на молекулярном уровне к практической реализации" (Новосибирск, 2002), 3-ей и 4-ой Международных конференциях "Актуальные проблемы современной науки (Самара, 2002, 2003), VIII Международной научной

экологической конференции «Актуальные проблемы сохранения устойчивости живых систем». (Белгород, 2004), III Всероссийской научной молодежной конференции «Под знаком Σ ». (Омск, 2005), Международной научно-практической конференции «Молодежь и медицинская наука в XXI веке». (Киров, 2005), Международной научной конференции студентов, аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2005». (Москва, 2005).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 28 печатных работ, в том числе 2 монографии (в соавторстве), 6 статей, 20 тезисов.

Объем и структура работы. Диссертационная работа представляет собой рукопись, изложенную на 174 страницах машинописного текста, включает 12 таблиц, 30 рисунков. а также список цитируемой литературы из 259 наименований. Диссертация состоит из введения, разделов, заключения, выводов

Список используемых сокращений. АО-антиоксиданты, АК - аскорбиновая кислота, ИУК - индолил-3-уксусная кислота, ОДН - о-дианизидин, ГХ - гидрохинон, ФК - ферроцианид калия, АОС - антиоксидантная система, ПО - пероксидаза, СГ - сердечные (стероидные) гликозиды. СФ - строфантин, ХП - хлорпромазин, ТП - тиопроперазин, ТФ - трифтазин.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основными объектами исследований служили различные по происхождению семена пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и другие, выращенные в разные годы в условиях Республики Саха (Якутия) (опытные поля ИБПК СО РАН и Якутского НИИСХ).

Влажность, всхожесть, жизнеспособность семян определяли по методам Гостстандартов СССР: всхожесть - ГОСТ 12038 - 66; жизнеспособность - ГОСТ 12039-66; сила роста - ГОСТ 12040-66; влажность - ГОСТ 12041-66. Жизнеспособность семян исследовали тетразольно - топографическим методом.

Семена пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и ячменя (*Hordeum* L.) предварительно замачивали в растворах БАВ в течение 24 ч, а затем проращивали на фильтровальной бумаге в чашках Петри. Число семян в одной чашке - 100, число повторностей в каждом варианте - 4, число опытов - 4.

Концентрацию пероксидазы определяли спектрофотометрически по поглощению при 403 нм ($\epsilon=102 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (Ogawa et al., 1979) или с использованием пиридингемохромогена (Falk, 1964).

Активность пероксидазы определяли при 22°C по начальной скорости окисления в их присутствии о-дианизидина перекисью водорода (Лебедева и др., 1977). К 2,1 мл 0,01 М Na-фосфатного буфера, содержащего 0,1 М KNO_3 (рН 7,0), добавляли 0,2 мл 5 нМ раствора пероксидазы и 0,1 мл 0,43 мМ о-дианизидина в 96%-ном этаноле. Реакцию инициировали введением 0,1 мл 16 мМ H_2O_2 . Окисление о-дианизидина регистрировали по увеличению поглощения раствора при 460 нм ($\epsilon=30 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$). За единицу активности фермента принимали его количество, окисляющее 1 мкмоль о-дианизидина за 1 мин.

Реакцию окисления АК (2,2-352,0 мкМ) и гидрохинона (1,0-1,6 мМ) перекисью водорода (0,64 мМ) проводили при 25°C в среде 0,1 М натрий-ацетатного, рН 4,0-6,0, или натрий-фосфатного, рН 6,0-8,0, буферов, в

присутствии пероксидазы хрена. Окисление АК регистрировали по уменьшению поглощения при 265 нм, $\epsilon=7,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Досон и др., 1991), а гидрохинона при 290 нм, $\epsilon=2,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. За единицу активности фермента принимали его количество, окисляющее 1 мкмоль субстрата (аскорбиновой кислоты или гидрохинона) за 1 мин.

Спектральные измерения выполняли на двухлучевом спектрофотометре DMS 100 S фирмы "Varian" (США). Кажущиеся константы скорости реакций окисления субстратов пероксидазы определяли из данных по стационарной кинетике (Березин, Клесов, 1976). При расчете каталитических констант использовали пакет прикладных программ по анализу и обработке кинетических данных ферментативных реакций. Все полученные количественные результаты подвергнуты статистической обработке с учетом критерия Стьюдента при $p<0,05-0,01$. Статистическую ошибку средней определяли по методике (Лакин, 1990), используя ППП Снедекор V2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Регулирование реакций пероксидазного окисления

аскорбиновой кислоты с помощью индолил-3-уксусной кислоты

Известно, что окисление ИУК пероксидазой протекает через образование тройного комплекса фермент-ИУК-кислород. Исследования механизма окисления ИУК пероксидазой показали, что на поверхности белковой глобулы должен располагаться участок связывания ауксина [Metodiewa et al., 1992; Park, Park, 1987; Pieres et al, 1992], который может находиться в составе дистального домена фермента [Савицкий и др., 1998]. При этом считается, что активную роль в катализе пероксидазы принимает остаток Trp-117, удаленный на 8-9 Å от атомов азота порфиринового цикла, т.е. находящегося в зоне туннелирования электронов. При этом субдомен, включающий структурно сходные участки в дистальном домене пероксидазы, формируется в направлении от активного центра к поверхности дистального домена, противоположной входу в активный центр.

Исследование влияния ИУК на реакции пероксидазного окисления АК позволило установить, что ауксин ингибирует фермент по конкурентному типу при связывании в активном центре фермента одной молекулы аскорбиновой кислоты (рис. 1,а). Тогда как в реакциях пероксидазного окисления АК с участием двух и более молекул субстрата ИУК проявляла неконкурентный характер ингибирования (рис. 1,б). Связывание ИУК с пероксидазой в реакциях конкурентного ингибирования достаточно прочное и составляет 5,4-20,5 мкМ, что соизмеримо с величинами констант связывания аскорбиновой кислоты и о-дианизидина. В реакциях неконкурентного ингибирования ИУК связывается с пероксидазой в 3,2-10,2 раза лучше, чем связывание второй молекулы АК. При этом величины констант ингибирования в реакциях неконкурентного ингибирования при pH 4,5-7,0 для ИУК равны 27,3-34,6 мкМ.

Таким образом, используя ИУК можно предположить место локализации участка связывания молекул аскорбиновой кислоты в активном центре

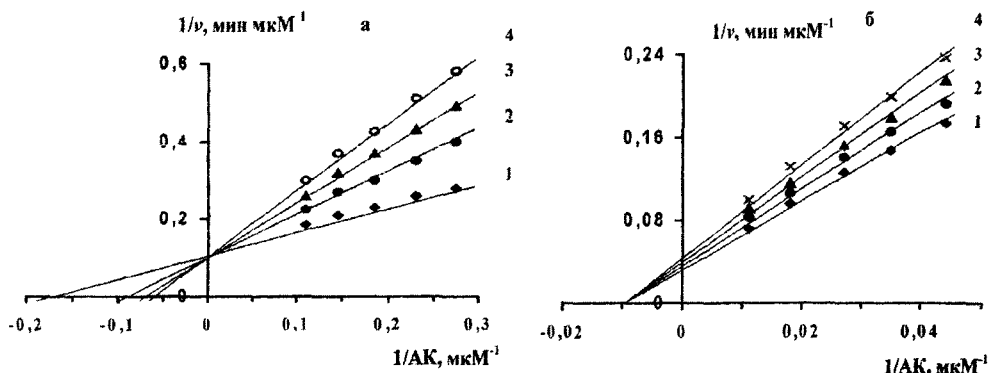


Рис 1. Зависимости обратных начальных скоростей пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты при pH 5,0 (а) и 7,0 (б) от ее концентрации при различных концентрациях индолил-3-уксусной кислоты, мкМ: 1-0, 2-5, 3-10, 4-15. Концентрации: а) пероксидаза-99 нМ, аскорбиновая кислота - 3,65-9,12 мкМ; б) пероксидаза - 142 нМ, аскорбиновая кислота - 22,8-91,2 мкМ

пероксидазы. По-видимому, таким участком является дистальная область активного центра фермента. Связывание ИУК в этой области при низких концентрациях субстрата создает конкуренцию за участок связывания, проявляемую в реакциях пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты, когда в активном центре фермента связывается, по крайней мере, одна молекула субстрата. При связывании двух и более молекул аскорбиновой кислоты с пероксидазой наблюдается ускорение реакции окисления аскорбиновой кислоты, что, возможно, вызвано кооперативными взаимодействиями между участками связывания этих двух молекул субстрата.

Влияние индолил-3-уксусной кислоты на реакции пероксидазного окисления быстро окисляемых субстратов

Ранее проведенные исследования показали, что центр связывания ИУК может располагаться вдали от активного центра пероксидазы [Савицкий и др., 1998]. Причем окислительное окисление ИУК может возрастать в присутствии гидрофобных аминокислот, тогда как полярные аминокислоты почти не оказывают влияние на каталитический процесс окислительного окисления ауксина. Установлена прямая корреляция между гидрофобностью аминокислот и степенью их влияния на скорость окисления ИУК [Park, Park, 1987].

Проведенное нами изучение реакций совместного пероксидазного окисления *o*-дианизидина, гидрохинона и ферроцианида калия в присутствии индолил-3-уксусной кислоты позволило установить следующие закономерности. Ауксин ингибирует пероксидазу в реакции окисления *o*-дианизидина по конкурентному типу (рис. 2), тогда как в реакциях окисления гидрохинона при кислых значениях pH проявляется неконкурентный характер ингибирования (рис. 3), переходящий при pH > 6,5 в смешанный тип. Присутствие ауксина не влияло на пероксидазное окисление ферроцианида калия.

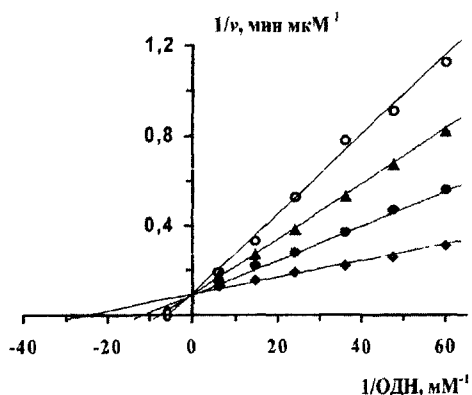


Рис. 2. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления *o*-дианизидина от его концентрации, в двойных обратных координатах, при различных концентрациях индолил-3-уксусной кислоты, мкМ : 1-0, 2-10, 3-20, 4-30; пероксидаза - 0,56 нМ, перекись водорода - 0,64 мМ; 0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7.

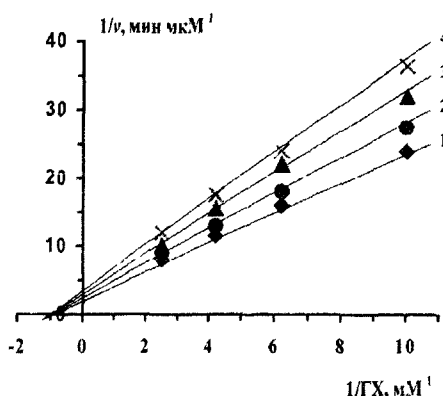


Рис. 3. Зависимость начальной скорости пероксидазного окисления гидрохинона от его концентрации, в координатах Лайнуивера-Берка, при различных концентрациях индолил-3-уксусной кислоты, мкМ : 1-0, 2-20, 3-40, 4-60; пероксидаза - 4,0 нМ; перекись водорода - 0,64 мМ; 0,1 М натрий-ацетатный буфер, pH 5.

Конкурентный тип ингибирования реакции пероксидазного окисления *o*-дианизидина ИУК позволяет предположить, что *o*-дианизидин и индолил-3-уксусная кислота связываются в одном и том же месте активного центра фермента. При этом связывание ИУК препятствует как связыванию, так и превращению *o*-дианизидина. Тогда как по отношению к гидрохинону тип ингибирования несколько другой. ИУК и гидрохинон связываются в различных местах активного центра, однако, если индолил-3-уксусная кислота связывалась на поверхности фермента, то дальнейшее превращение гидрохинона становится невозможным. Это наблюдается вследствие удаленности мест связывания эффектора и субстрата или в результате конформационных изменений глобулы фермента при связывании ингибитора. Причем при pH 4,5-6,5 тип ингибирования неконкурентный, однако при увеличении pH он меняется и становится смешанным. При этом величина α увеличивалась ($\alpha > 1$), а β уменьшалась ($\beta < 1$). Изменение этих постоянных характеризует ухудшение связывания субстрата в 2,8-4,2 раза, т.е. при наличии ИУК происходило понижение сродства гидрохинона к активному центру фермента. Однако, если все-таки гидрохинон связался в активном центре, то дальнейшее его превращение ухудшалось в 1,7-5,3 раза. Связывание ИУК с пероксидазой зависело от pH среды. Так в реакциях пероксидазного окисления *o*-дианизидина величина K_i при pH 4,5-7,0 изменялась в диапазоне от 9,6 до 0,72 мкМ , т.е. с возрастанием pH сродство ингибитора к ферменту повышалось в 13,3 раза. Тогда как в реакциях окисления гидрохинона величина K_i в этом же диапазоне pH изменялась от 113 до 17 мкМ , т.е. константа ингибирования понижалась в 6,6 раза. При этом эффективность связывания ИУК с пероксидазой, например, при pH 4,5 и 7,0 лучше связывания *o*-дианизидина в 4,2

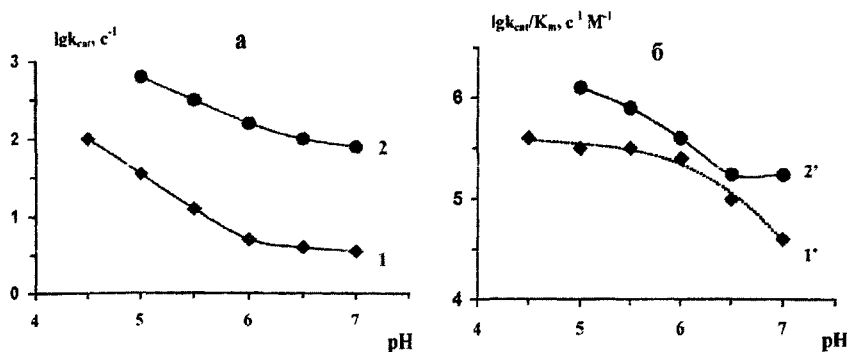


Рис. 4. pH-Зависимости $\lg k_{cat}$ (а) и $\lg(k_{cat}/K_m)$ (б) для реакций пероксидазного окисления аминазина (1, 1') и ферроцианида калия (2, 2'). Пунктирная кривая рассчитана с использованием значений $pK_a=6,0$, $(k_{cat}/K_m)_{lim}=4,75 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{сек}^{-1}$

и 20,8 раз, а гидрохинона - 5,8 и 8,8 раз соответственно. В реакциях пероксидазного окисления о-дианизида связывание ИУК с ферментом при pH 4,5 и 7,0 было в 11,8 и 23,6 раза соответственно эффективнее, чем в реакциях окисления гидрохинона. По-видимому, на сродство ингибитора к ферменту оказывает влияние природа субстрата. Поэтому, преимущественным местом связывания ИУК и о-дианизида в активном центре пероксидазы, по-видимому, должна быть гидрофобная область. Тогда как для гидрохинона местом связывания является область на поверхности фермента, содержащая большее число полярных или заряженных аминокислотных остатков [Лебедева, Угарова, 1996]. Подтверждением различных мест связывания о-дианизида и гидрохинона в активном центре пероксидазы служат данные по совместному пероксидазному окислению этих субстратов. На основании полученных данных можно предположить, что ИУК являясь оксидазным субстратом пероксидазы, способна связываться в составе дистального домена активного центра фермента, ингибируя протекание пероксидазных реакций. При этом пероксидаза будет выполнять роль высокоспецифичной оксигеназы аукурина.

Пероксидазные реакции индивидуального и совместного окисления фенотиазинов

Исследование индивидуальных реакций окисления хлорпромазина позволило отнести его к группе медленно окисляемых субстратов пероксидазы (k_{cat} измеренная в диапазоне pH 4,5-7,0 понижалась от 114 до 3,5 с⁻¹). При этом связывание хлорпромазина с пероксидазой зависело от pH и составляло 85-270 мкМ. На кривой pH-зависимости $\lg k_{cat}$ и $\lg(k_{cat}/K_m)$ определялась ионогенная группа с pK_a 6,0 (рис. 4, а и б, кривые 1, 1'). В щелочной области pH связывание хлорпромазина с ферментом в 2,5-3,0 раза лучше, чем в кислой среде. Предложено, что окисление хлорпромазина протекает по одноэлектронному механизму, характерному для пероксидазного окисления неорганических ионов.

Реакции индивидуального пероксидазного окисления трифтазина и тиопроперазина характеризовались низкими значениями каталитических

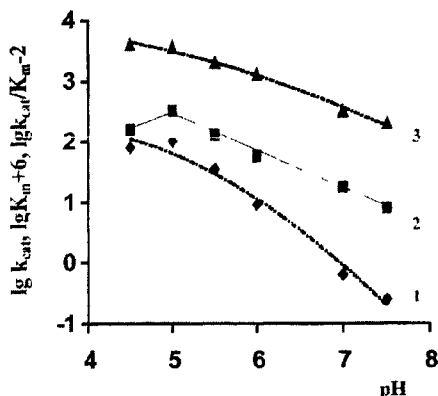


Рис. 5. pH-Зависимости $\lg k_{\text{cat}}$ (1), $\lg K_m$ (2) и $\lg k_{\text{cat}}/K_m$ (3) для реакций пероксидазного окисления трифтазина. Пунктирные кривые рассчитаны с использованием значений $pK_a=4,89$, $k_{\text{cat(lim)}}=129 \text{ c}^{-1}$; $pK_a=5,64$, $(k_{\text{cat}}/K_m)_{\text{lim}}=51,8 \cdot 10^4 \text{ c}^{-1}\text{M}^{-1}$.

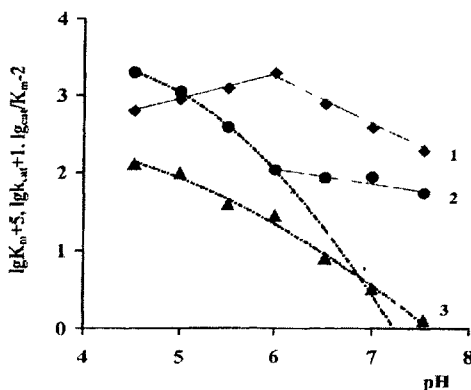


Рис. 6. pH-Зависимости $\lg K_m$ (1), $\lg k_{\text{cat}}/K_m$ (2) и $\lg k_{\text{cat}}$ (3) для реакций пероксидазного окисления тиопроперазина. Пунктирные кривые являются теоретическими для $pK_a=5,43$, $k_{\text{cat(lim)}}=12,9 \text{ c}^{-1}$; $pK_a=4,71$, $(k_{\text{cat}}/K_m)_{\text{lim}}=30,5 \cdot 10^4 \text{ c}^{-1}\text{M}^{-1}$.

констант 0,3-124 и 0,12-9,8 c^{-1} соответственно, что позволяет отнести их к группе медленно окисляемых субстратов пероксидазы. Величины K_m для трифтазина и тиопроперазина мало различаются и составляют соответственно 10-330 и 22-196 μM в зависимости от pH. Значения K_m трифтазина и тиопроперазина при $\text{pH}>6,0$ примерно такие же, как у о-дианизидина.

На кривых pH-зависимостей $\lg k_{\text{cat}}$ и $\lg k_{\text{cat}}/K_m$ реакций пероксидазного окисления трифтазина (рис. 5) и тиопроперазина (рис. 6), определялись ионогенные группы с pK 4,9, 5,6 и 5,4, 4,7 соответственно, депротонирование которых ухудшает каталитический процесс пероксидазного окисления соответственно трифтазина в 413 раз, а тиопроперазина в 82 раза.

При значениях $\text{pH}>6,0$ имело место отклонение опытных кривых pH-зависимостей для $\lg k_{\text{cat}}/K_m$ от теоретической для реакций пероксидазного окисления трифтазина и тиопроперазина, что, возможно, вызвано проявлением действия еще одной ионогенной группы свободного фермента, принимающей участие в связывании субстрата.

В отличие от хлорпромазина, у трифтазина и тиопроперазина, с увеличением pH значения K_m понижались. В кислых pH (4,5-5,5) трифтазин окислялся быстрее хлорпромазина в 1,5-3 раза и в 9-12 раз эффективнее тиопроперазина. Константа Михаэлиса трифтазина в 2-2,5 раза больше, чем у хлорпромазина и в 1,5-3,5 раза - тиопроперазина. Однако при $\text{pH}>6,0$ величины K_m трифтазина и тиопроперазина

понижались и становились соизмеримы с K_m для быстро окисляемого субстрата пероксидазы - о-дианизидина.

Низкие значения константы скорости окисления фенотиазинов, возможно, как в случае с НАДН и аскорбиновой кислотой, в первую очередь обусловлены тем, что их окисление пероксидом водорода, протекает по одноэлектронному механизму, аналогично окислению неорганических субстратов пероксидазы. Поэтому при совместном окислении о-дианизидина и различных фенотиазинов, фермент реализует различные пути переноса электрона с окисляемого субстрата, выбор которых определяется доступностью функциональных групп субстрата каналам переноса электронов на поверхности белковой глобулы. Среди изученных фенотиазинов расположение функциональных групп хлорпромазина, обеспечивает его преимущественное пероксидазное окисление по сравнению с о-дианизидином. При этом вначале полностью окислялся хлорпромазин, а затем наблюдалось окисление о-дианизидина.

При pH 4,0-5,5 тиопроперазин и о-дианизидин могли связываться в активном центре пероксидазы. Причем связывание тиопроперазина улучшало последующее связывание о-дианизидина, но замедляло скорость его пероксидазного окисления, что проявляется в антиконкурентном типе ингибирования. Т.е. тиопроперазин способен связываться только с фермент-субстратным комплексом, и не связывается со свободным ферментом. С возрастанием pH ($pH > 5,5$) происходило депротонирование одной из функциональных групп активного центра фермента и это способствовало переключению механизма переноса электронов с донора водорода о-дианизидина, на преимущественное окисление донора электронов - тиопроперазин. Противоположный эффект наблюдался при совместном окислении о-дианизидина и трифтазина. Последний возможно и связывался в активном центре фермента, однако его окисление не происходило, поскольку реализовывался механизм окисления донора водорода - о-дианизидина.

Влияние строфантина G на кинетику пероксидазного окисления медленно и быстро окисляемых субстратов

Ряд соединений, относящиеся к стероидным гликозидам (дигоксин, строфантин и др.), не являются субстратами пероксидазы, так как не способны реагировать с промежуточными окисленными формами фермента (E_1 и E_2). Однако эти соединения обладают антиоксидантным действием. Участие строфантина G в реакциях пероксидазного окисления медленно и быстро окисляемых субстратов пероксидазы не изучено. Поэтому мы изучили влияние строфантина G на пероксидазное окисление медленно (хлорпромазин, тиопроперазин, трифтазин) и быстро (о-дианизидин) окисляемых субстратов пероксидазы хрена в широком диапазоне pH; предложив возможные механизмы активирования и ингибирования строфантином G пероксидазы в реакциях пероксидазного окисления медленно окисляемых субстратов.

Показано, что строфантин G может связываться в активном центре фермента, влияя на процесс пероксидазного окисления медленно и быстро окисляемых субстратов пероксидазы. Причем проявлялась двойственность его действия в реакциях пероксидазного окисления медленно окисляемых субстратов

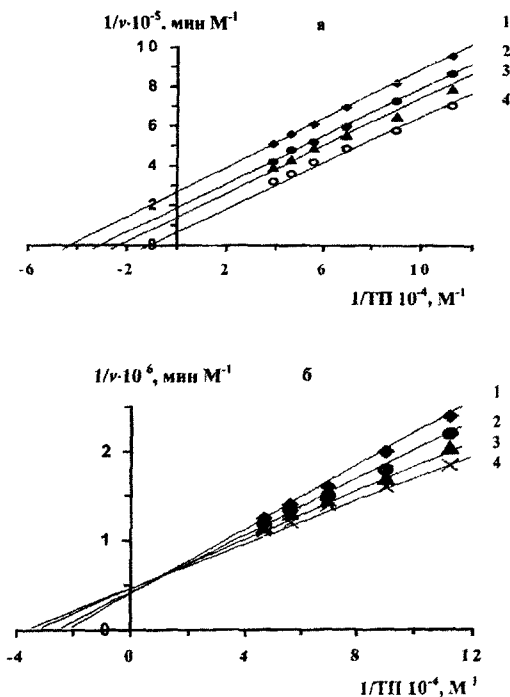


Рис 7. Зависимости обратных начальных скоростей окисления тиопроперазина при различных концентрациях строфантина G: 0(1), 8,6(2), 17,2(3), 25,8 мкМ(4); концентрация H_2O_2 0,64 мМ; а - 0,1 М натрий-ацетатный буфер, рН 5, 19 нМ пероксидаза; б - 0,1 М трис-НСl буфер, рН 7, 280 нМ пероксидаза.

Несколько иное действие проявлял строфантин G в реакциях пероксидазного окисления хлорпромазина, трифтазина и о-дианизидина.

Строфантин G ингибировал пероксидазное окисление хлорпромазина при рН 5,0-6,0, влияя как на связывание субстрата, так и на его превращение. Тогда как депротонирование функциональной группы активного центра фермента с $pK \sim 6,0$ приводило к изменению характера ингибирования со смешанного типа на конкурентный (рис. 8,а,б). При этом можно отметить, что связывание строфантина G в активном центре пероксидазы замедляло реакции пероксидазного окисления хлорпромазина, а депротонирование одной из функциональных групп активного центра фермента приводило к тому, что связывание ингибитора затрудняло последующее связывание субстрата.

Таким образом, строфантин G и хлорпромазин при $pH > 6,0$ могут конкурировать за место связывания в активном центре фермента, при этом связывание ингибитора препятствует последующему связыванию субстрата, что и

пероксидазы. Например, в реакциях окисления тиопроперазина строфантин G активировал окисление. При этом тип активирования зависел от рН, проявляясь при рН 5,0-6,0 в бесконкурентном характере (рис. 7,а), тогда как возрастание рН приводило к смене типа активирования с бесконкурентного типа на смешанный (рис. 7,б), что, возможно, связано с участием в этом процессе одной из функциональных групп активного центра фермента или белка с $pK \sim 6,0$. При рН 5,0-6,0 отмечалось наиболее эффективное связывание строфантина G в активном центре пероксидазы, что приводило к ускорению пероксидазного окисления тиопроперазина, проявляемое в бесконкурентной активации. При $pH > 6,0$ связывание активатора ухудшалось, однако его присутствие в активном центре улучшало последующее связывание тиопроперазина повышая эффективность каталитического превращения.

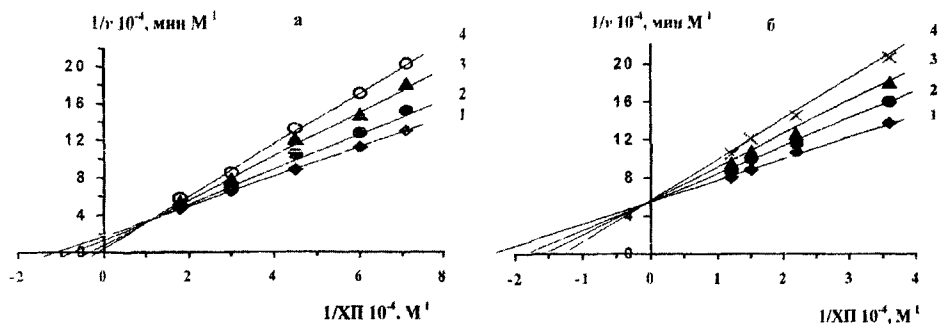


Рис. 8. Зависимости обратных начальных скоростей пероксидазного окисления аминазина при различных концентрациях строфантина G: 0(1), 8,6(2), 17,2(3), 25,8 мкМ(4); концентрация H_2O_2 0,64 мМ; а - 0,1 М натрий-ацетатный буфер, pH 5, 24 нМ пероксидаза; б - 0,1 М Tris-HCl буфер, pH 7, 47 нМ пероксидаза.

приводит к понижению скорости ферментативной реакции. Несколько иной тип ингибирования проявлял строфантин G в реакциях пероксидазного окисления трифтазина. При кислых значениях pH строфантин G связывался вблизи активного центра фермента, не влияя на связывание субстрата, что проявлялось в неконкурентном характере ингибирования (рис. 9,а). Депротонирование одной из функциональных групп активного центра пероксидазы с $\text{pK} \sim 6,0$ резко ухудшало каталитическое превращение трифтазина, понижая k_{cat} в 10-23 раза. Хотя при этом K_m улучшалось в 2,7-6,0 раз. По-видимому, заряд этой ионогенной группы может оказывать влияние на расположение строфантина G в активном центре фермента, что приводит к смене характера ингибирования с неконкурентного на смешанный (рис. 9,б). Показано, что строфантин G ингибирует пероксидазу в реакциях окисления о-дианизидина по антиконкурентному типу (рис. 10). При этом ингибитор связывался с фермент-субстратным комплексом, а не со свободным ферментом. Связывание строфантина G в активном центре фермента в реакциях окисления фенотиазинов и о-дианизидина несколько различалось. При кислых значениях pH строфантин G эффективнее связывался с пероксидазой в реакциях пероксидазного окисления тиопроперазина, тогда как при окислении

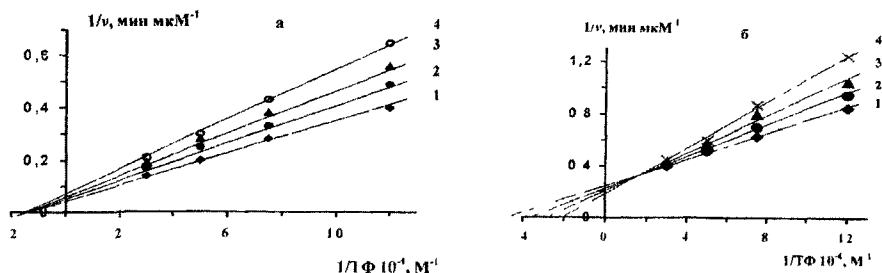


Рис 9. Зависимости обратных начальных скоростей окисления трифтазина при различных концентрациях строфантина G: 0(1), 8,6(2), 17,2(3), 25,8 мкМ(4); концентрация H_2O_2 0,64 мМ; а - 0,1 М натрий-ацетатный буфер, pH 6, 40 нМ пероксидаза; б - 0,1 М трис-HCl буфер, pH 7, 95 нМ пероксидаза.

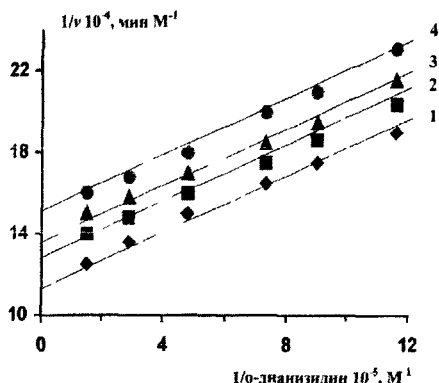


Рис. 10. Зависимости обратных начальных скоростей окисления о-дианизида в присутствии различных концентраций строфантина G: 0(1), 8,6(2), 17,2(3), 25,8 мкМ(4); концентрация пероксидазы 0,14 нМ; H_2O_2 - 0,64 мМ; 0,1 М натрий-ацетатный буфер, рН 5,5

нов и о-дианизида.

Роль пероксидазы и антиоксидантов в прорастании семян

Если подойти к вопросам сохранения и повышения жизнеспособности семян растений с позиций биоэнергетики, то можно предположить, что жизнеспособность семян базируется на сохранении на оптимальном уровне активности катаболических ферментов, участвующих в работе аэробных систем. Поэтому мы изучили изменения активность пероксидазы на ранних этапах прорастания семян и при длительном хранении. Показано, что при прорастании семян с появлением корней и побегов активность пероксидазы повышается в надземной части в 1,8-2,0, в корнях в 12-14, а в зерне в 4-5 раз (рис. 11).

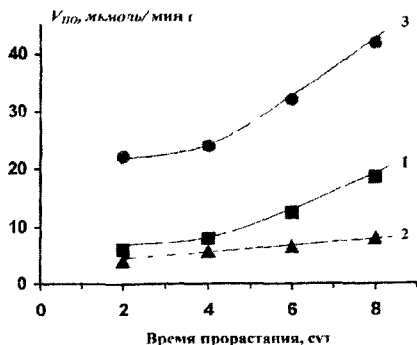


Рис. 11 Активность пероксидазы в зерновке (1), побеге (2) и корнях (3) проростков пшеницы сорта Якутянка 224 в зависимости от времени прорастания.

трифазина, хлорпромазина и о-дианизида его связывание с ферментом хуже в 2,4, 3,1 и 5,9 раз соответственно. При $\text{pH} > 6,0$ резко понижалась скорость каталитического процесса, при этом отмечалось улучшение в связывании эффектора в реакциях окисления хлорпромазина в 3, трифазина - в 1,4, о-дианизида - в 1,5 раза с ухудшением связывания строфантина G при окислении тиопроперазина в 2,8 раза. В реакциях ингибирования пероксидазного окисления о-дианизида строфантином G ни одна из групп активного центра фермента себя не проявила, что, возможно, объясняется различным расположением строфантина G в активном центре фермента при осуществлении реакций пероксидазного окисления фенотиази-

Результаты исследования активности пероксидазы в покоящихся семенах пшеницы сорта Скороспелка улучшенная урожая разных лет приведены в табл. 1. Как видно из этих данных, что снижение активности пероксидазы коррелирует с понижением всхожести семян. Полученные данные позволили сделать вывод, что при прорастании семян происходит интенсификация аэробных биоэнергетических процессов, активация оксидаз, включая пероксидазу. При этом резкое возрастание активности пероксидазы может свидетельствовать о том, что

Таблица 1. Активность пероксидазы (мкмоль/мин г сухой массы) в жизнеспособных прорастающих и находящихся в состоянии покоя семенах пшеницы сорта Скороспелка улучшенная.

Семена	Время прорастания семян, сут	Пероксидаза
Контроль (сухие)	-	3,0±0,3
Проросшие	1	7,2±0,7
	3	8,5±0,8
Непроросшие, Жизнеспособные	1	2,4±0,2
	3	3,5±0,2

фермент участвует в активизации пусковых механизмов прорастания семян, инициируя реакции свободнорадикального окисления, которые через активизацию ПОЛ могут способствовать возрастанию дыхательной активности митохондрий.

Для проверки высказанного предположения был проведен следующий эксперимент. Семена пшеницы сорта Скороспелка улучшенная (всхожесть- 44, жизнеспособность - 70%) проращивались в течение трех дней и дифференцировались на проросшие и непроросшие семена. У семян этих двух групп определялась активность пероксидазы. Из таблицы 2 видно, что у непроросших семян активность пероксидазы почти не изменяется, в то время как в прорастающих семенах наблюдается увеличение активности пероксидазы в 2,0 раза. Эти результаты являются доказательством того, что для прорастания семян необходима не просто активация всех биоэнергетических процессов, а переключение дегидрогеназных реакций на аэробные.

Для подтверждения избирательности действия антиоксидантов по отношению пероксидазы зерен пшеницы нами было изучено содержание СГ и АК в зародыше и эндосперме семян ячменя и пшеницы сорта Якутянка 224 (табл. 3). Показано, что в эндосперме семян ячменя со всхожестью 76% СГ и АК содержится больше на 30 и 37% соответственно, чем в зародыше. Тогда как в эндосперме семян пшеницы с лабораторной всхожестью 28%, но высокой жизнеспособностью (86%) стероидов содержится на 20, а АК на 30% меньше, чем в зародыше.

Таблица 2. Активность пероксидазы (мкмоль/мин г сухой массы) семян пшеницы сорта Скороспелка улучшенная в зависимости от сроков сбора урожая.

Срок хранения семян, год	Жизнеспособность, %	Всхожесть, %	Активность пероксидазы, мкмоль/мин г (%)
1	99±1	96±2	3,15 (100)
3	88±2	79±5	1,59 (50,5)
5	56±2	24±2	0,75 (23,8)

Таблица 3. Содержание СГ и АК (мг/100 г) в эндосперме и зародыше семян ячменя и пшеницы. Условия: семена замачивали 17 часов в воде.

Семена растений	Всхожесть, %	Жизнеспособность, %	СГ		АК	
			эндосперм	зародыш	эндосперм	зародыш
Ячмень	76±3	92±5	0,93±0,05	0,65±0,03	12,6±0,9	8,0±0,5
Пшеница сорт Якутянка 224	28±1	86±4	0,37±0,02	0,46±0,2	3,3±0,1	5,6±0,2

Эти изменения служат подтверждением того, что содержание и состав функционально активных соединений эндосперма может оказывать влияния на интенсивность метаболических процессов в зародыше. Понижение концентрации СГ и АК в эндосперме приводит к замедлению процессов деления и роста клеток зародыша. Это условие реализуется на начальных этапах развития, когда автономность зародыша, отражающее его независимость развития от окружающих тканей, и проявляющееся в способности нормально развиваться вне материнского организма, еще очень слабо выражена и эндогенные функционально активные вещества эндосперма лимитируют дифференциацию и рост клеток (Батыгина, 1987).

Строфантин и АК по своему действию относятся к группе антиоксидантов. Являясь органическими веществами они участвуют, как было показано выше, в пероксидазных реакциях, поэтому строфантин и АК могут оказывать влияние на активность фермента, что, по-видимому, проявляется при малых концентрациях в виде повышения всхожести семян, тогда как высокое содержание антиоксидантов понижает всхожесть семян, углубляя их покой.

Основные выводы

1. Используя ИУК было показано, что местом локализации участка связывания молекул аскорбиновой кислоты является дистальная область активного центра фермента, при связывании в которой двух и более молекул аскорбиновой кислоты наблюдается ускорение реакции пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты, обусловленное кооперативными взаимодействиями между участками связывания этих двух молекул субстрата.

2. Изучение влияния ИУК на реакции окисления быстро окисляемых субстратов пероксидазы позволило выявить тип ингибирования, при котором связывание ИУК препятствует как связыванию, так и превращению о-дианизидина. Тогда как по отношению к гидрохинону ИУК и субстрат связываются в различных местах активного центра, что наблюдается вследствие удаленности мест связывания эффектора и субстрата.

3. Изучение реакций пероксидазного окисления фенотиазин (хлорпромазина, тиопроперазина и трифтазина) позволило установить, что они являются медленно окисляемыми субстратами пероксидазы и их окисление перекисью, осуществляется по одноэлектронному механизму, аналогично окислению неорганических субстратов пероксидазы.

4. Исследование реакций совместного окисления о-дианизидина с различными фенотиазинами позволило установить, что фермент реализует

различные пути переноса электрона с окисляемого субстрата, при этом среди изученных фенотиозинов, расположение функциональных групп хлорпромазина, обеспечивают его преимущественное пероксидазное окисление по сравнению с *о*-дианизидином.

5. В реакциях совместного окисления тиопроперазина и *о*-дианизидина установлен сложный регуляторный механизм, который обусловлен тем, что при pH 4,5-5,0 проявлялся антиконкурентный тип ингибирования, тогда как с возрастанием pH ($\text{pH} > 5,5$), за счет депротонирования одной из функциональных групп активного центра фермента, происходило переключение механизма переноса электронов с донора водорода *о*-дианизидина, на преимущественное окисление донора электронов - тиопроперазин.

6. Исследование реакций пероксидазного окисления тиопроперазина, трифтазина, хлорпромазина и *о*-дианизидина в присутствии строфантина G позволило установить, что при кислых значениях pH строфантин G активирует пероксидазу в реакциях окисления тиопроперазина по бесконкурентному типу, а при окислении трифтазина, хлорпромазина и *о*-дианизидина проявлялись соответственно неконкурентный, конкурентный и антиконкурентный типы ингибирования.

7. Установлено, что пероксидаза необходима для сохранения жизнеспособности семян и при запуске процессов, связанных с их прорастанием, сопровождаемое интенсификацией аэробных биоэнергетических процессов, активацией оксидаз, включая пероксидазу, активность которой у непроросших семян, остающихся в покое, не изменяется, в то время как в прорастающих семенах наблюдается возрастание активности фермента.

8. Показано, что в непроросших семенах концентрация стероидных гликозидов всегда понижается, возрастая при активации ростовых процессов. Тогда как концентрация АК в покоящихся семенах всегда выше, чем у активно метаболизирующих. Это позволяет предположить о том, что АК необходима семенам для участия в метаболических процессах, а стероидные гликозиды являются их регуляторами.

Список опубликованных работ, отражающих содержание диссертации:

1. Рогожин В.В., Рогожина Т.В. Возможные механизмы проявления фармакологического действия производных фенотиозинов в живых организмах // Современные вопросы интенсификации кормления, содержания животных и улучшения качества продуктов животноводства: Тез. докл. Междунар. научно-практич. конф. специалистов, 1-2 июля 1999 г. - Москва, 1999. -С. 56.
2. Рогожин В.В., Рогожина Т.В. Возможное влияние строфантина G на реакции пероксидазного окисления фенотиозинов в живых организмах // Там же. - С. 62-63.
3. Рогожин В.В., Рогожина Т.В. Влияние строфантина G на кинетику пероксидазного окисления медленно окисляемых субстратов пероксидазы// Биохимия. -2000. -Т. 65, № 2. -С. 254-262.

4. Рогожина Т.В., Рогожин В.В. Стационарная кинетика индивидуального и совместного окисления фенотиозинов в присутствии пероксидазы хрена // Электронный журнал "Исследовано в России", 70, стр. 768-780, 2002 г. <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2002/070.pdf>
5. Рогожина Т.В. Стационарная кинетика пероксидазного окисления фенотиозинов // Ломоносов-2002: Тезисы докл. IX Междунар. конф. студентов и аспирантов по фундаментальным наукам, 9-12 апреля 2002 г. - Москва, 2002. - С.105-106.
6. Рогожина Т.В. Особенности протекания реакций пероксидазного окисления фенотиозинов в присутствии строфантина G // Биология – Наука 21-го века: Тезисы докл. 6-ой Пущинской школы-конф. молодых ученых, 20-24 мая 2002 г. - Пущино, 2002. -С.132.
7. Рогожина Т.В., Рогожин В.В. Фенотиозины являются медленно окисляемыми субстратами пероксидазы // Проблемы медицинской энзимологии: Тезисы докл. Всерос. конф., 5-8 июня 2002 г. - Москва, 2002. -С.84-85.
8. Рогожин В.В., Рогожина Т.В. Изучение пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты в присутствии индолил-3-уксусной кислоты // Электронный журнал "Исследовано в России". 111, стр. 1212-1225, 2002 г. <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2002/111.pdf>
9. Рогожина Т.В., Рогожин В.В. Стационарная кинетика пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты в присутствии ИУК // Каталитический дизайн – от исследований на молекулярном уровне к практической реализации: Тезисы докл. 1-ой Междунар. школы-конф. молодых ученых по катализу, 2-6 декабря 2002 г. - Новосибирск, 2002. -С.141-142.
10. Рогожина Т.В., Рогожин В.В. Пероксидаза в реакциях окисления быстро и медленно окисляемых субстратов // Там же. -С. 252-253.
11. Рогожина Т.В., Рогожин В.В. Пероксидаза в реакциях индивидуального и совместного окисления субстратов // Актуальные проблемы современной науки: Тезисы докл. 3-ей Междунар. конф., 23-28 сентября 2002 г. - Самара, 2002. -С. 73-74.
12. Рогожина Т.В., Рогожин В.В. Модель активного центра пероксидазы // Там же. С. 75-76.
13. Рогожина Т.В., Рогожин В.В. Влияние индолил-3-уксусной кислоты и триптофана на пероксидазное окисление о-дианизидина и гидрохинона // Биология – Наука 21-го века: Тезисы докл. 7-ой Пущинской школы-конф. молодых ученых, 14-18 апреля 2003 г. - Пущино, 2003. -С. 156.
14. Рогожина Т.В., Рогожин В.В. Влияние индолил-3-уксусной кислоты на окисление о-дианизидина и гидрохинона в присутствии пероксидазы // Электронный журнал "Исследовано в России", 81, стр. 919-933, 2003 г. <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2003/081.pdf>
15. Рогожина Т.В., Рогожин В.В. Динамическая модель активного центра пероксидазы // Актуальные проблемы современной науки: Тезисы докл. 4-ой Междунар. конф., 10-12 сентября 2003 г. - Самара, 2003.-С. 54-55.
16. Рогожин В.В., Верхотуров В.В., Рогожина Т.В. Пероксидазный катализ многокомпонентных систем.-Якутск: Сахаполиграфиздат, 2003. -165 с.

17. Рогожина Т.В., Рогожин В.В. Содержание сердечных гликозидов и аскорбиновой кислоты в семенах растений // Биология – наука XXI века: Тезисы докл. 8-ой Пушкинской школы-конф., 17-21 мая 2004 г. - Пушкино, 2004. -С. 187-188.
18. Рогожин В.В., Рогожина Т.В. Роль индолил-3-уксусной кислоты в реакциях пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты, катализируемого пероксидазой хрена // Известия АН. Сер. биол.-2004, № 4. -С.416-420.
19. Рогожина Т.В., Рогожин В.В. Влияние строфантина на прорастание семян // Пищевые ресурсы дикой природы и экологическая безопасность населения: Тезисы докл. Междунар. научно-практич. конф., 17-18 ноября 2004 г. - Киров, 2004. -С. 124-125.
20. Рогожин В.В., Рогожина Т.В. Влияние УФ-облучения на механизмы устойчивости семян пшеницы // Актуальные проблемы сохранения устойчивости живых систем: Тезисы докл. VIII Междунар. науч. экологической конф., 27-29 сентября 2004 г. - Белгород, 2004. -С.87.
21. Рогожин В.В., Рогожина Т.В. Влияние различных факторов среды на прорастание семян пшеницы // Там же. С.122.
22. Рогожин В.В., Рогожина Т.В. Роль индолил-3-уксусной кислоты в реакциях окисления быстро и медленно окисляемых субстратов пероксидазы // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. -2004. -Т.45, №6. -С. 423-428.
23. Рогожин В.В., Верхотуров В.В., Рогожина Т.В. Пероксидаза: строение и механизм действия.-Иркутск: Из-во ИГТУ, 2004. -200 с.
24. Рогожина Т.В., Рогожин В.В. Использование пероксидазы в качестве модели исследования реакций пероксидазного окисления функционально активных веществ // Биология – наука XXI века: Тезисы докл. 9-ой Пушкинской школы-конф., 18-22 апреля 2005 г. - Пушкино, 2005. -С. 234-235.
25. Рогожина Т.В., Рогожин В.В. Модельные системы пероксидазы и их применение для оценки механизмов пероксидазного окисления лекарственных препаратов // Под знаком Σ: Тезисы докл. III Всерос. науч. молодежной конф., 4-6 июля 2005 г. - Омск, 2005. -С. 231-232.
26. Рогожина Т.В. Фенотиазины (хлорпромазин, трифтазин и тиопроперазин) являются медленно окисляемыми субстратами пероксидазы // Молодежь и медицинская наука в XXI веке: Тезисы докл. Междунар. научно-практич. конф., 1-2 апреля 2005 г. - Киров, 2005. -С.68-69.
27. Рогожина Т.В., Рогожин В.В. Использование пероксидазы в качестве модели исследования реакций пероксидазного окисления функционально активных веществ // Биология – наука XXI века: Тезисы 9-ой Пушкинской школы-конф., 18-22 апреля 2005 г. - Пушкино, 2005. -С. 124-125.
28. Рогожина Т.В. Пероксидаза как модель исследования реакций окисления фенотиозинов // Ломоносов-2005: Тезисы докл. Междунар. науч. конф. студентов, аспирантов по фундаментальным наукам, 12-16 апреля 2005 г., секция «Химия», Т.2. - Москва, 2005. -С.30.

Подписано в печать 29.12.05. Формат 60×84/16.
Бумага тип. №2. Гарнитура «Таймс». Печать офсетная.
Печ. л. 1,5. Уч.-изд. л. 1,87. Тираж 100 экз. Заказ № 372.
Издательство ЯГУ. 677891, г. Якутск, ул. Белинского, 58.

Отпечатано в типографии издательства ЯГУ

РНБ Русский фонд

2006-4

30775

