

УДК 54.04:543.94

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ И ИЗОФЕРМЕНТНОГО СПЕКТРА ПЕРОКСИДАЗ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Землянухина О.А., Калаев В.Н., Воронина В.С.

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж, e-mail: oz54@mail.ru

В обзоре проанализированы результаты собственных исследований авторов, проводимых на протяжении 15 лет, и данные литературы, касающиеся методов определения активности и изоферментного спектра пероксидаз различного происхождения. Эксперименты по определению активности и изоферментного спектра пероксидаз выполнены с использованием культурального фильтрата корневой губки различных штаммов (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.), почек дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), листьев вяза обыкновенного (*Ulmus laevis* L.), микроклонов карельской березы (*Betula pendula* Roth var *carelica* Merkl.) и березы повислой (*Betula pendula* Roth), а также вейгелы цветущей «вариегата» (*Weigela florida* «*Variegata*» Bunge A.D.C.), хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), трансгенных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.), сыворотки крови людей, больных артериальной гипертензией. Описаны буферные системы, субстратные смеси, применяемые для определения активности пероксидаз. Проанализированы кинетические параметры пероксидаз растительного и грибного происхождения в отношении бензидина, пирокатехина, 2,2-азинобис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой) кислоты. Установлена специфичность действия буфера Мак-Ильвейна на фермент корневой губки (*Heterobasidion annosum*): активность пероксидазы в буферной среде повышается в 9,7 раз по сравнению с культуральным фильтратом. Приведены сравнительные результаты исследований по выявлению изоферментного спектра пероксидаз в окрашивающих смесях бензидина, 1-нафтола, гваякола, о-дианисидина. На примере хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и листьев вяза (*Ulmus laevis* L.) показано влияние условий экстракции (длительность, компоненты экстрагирующего буфера) на активность пероксидазы. Показаны различия в изоферментном спектре пероксидаз трансгенных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) в условиях *in vitro*. Описана методика выявления типов гаптоглобина человека в сыворотке крови больных артериальной гипертензией с использованием усовершенствованного способа анализа. Предполагается, что 1-нафтол является субстратом для пероксидазы, а не цитохром-с-оксидазы. Изоферментные спектры пероксидаз могут быть использованы для выявления видовых различий, стадий регенерации растений, онтогенетического возраста растений, стрессового воздействия. Предложен модифицированный способ определения активности и выявления изоферментного спектра пероксидазы, заключающийся в использовании субстратных смесей с рН равным 7.0 вместо применяемых в настоящее время систем с рН равным 2,0.

Ключевые слова: пероксидаза, оптимум рН, субстраты, изоформы, окрашивающие смеси, модификации

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE METHODS USED TO DETERMINE THE ACTIVITY AND ISOZYME SPECTRUM OF DIFFERENT ORIGIN PEROXIDASES

Zemlyanukhina O.A., Kalaev V.N., Voronina V.S.

*Federal State Budgetary Educational Institution of High Vocational Training
«Voronezh State University», Voronezh, e-mail: oz54@mail.ru*

The results of research conducted over 15 years are analyzed in the review. Also literature data on methods of determining the activity and isozyme spectrum of peroxidases of different origins are presented. Experiments to determine the activity and isozyme spectrum of peroxidases were performed using the culture filtrate of different strains of *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., english oak elite tree buds (*Quercus robur* L.), an elm leaves (*Ulmus laevis* L.) as well as microclones of *Weigela florida* «*Variegata*» Bunge A.D.C., *Betula pendula* Roth and *Betula pendula* Roth var. *carelica* Merkl. The needles of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), transgenic sugar beet plants *in vitro* and serum of human blood of patients with arterial hypertension also were the objects of investigation. The influence of buffer system and buffer molarity, substrate mixtures (the Michaelis constants) used to determine the activity of peroxidase were described. Peroxidase kinetic parameters of plant and fungal origin with respect to benzidine, catechol, 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) were analyzed. The specificity of McIlwain buffer action on the *Heterobasidion annosum* enzyme was investigated. Activity of peroxidase was increased 9,7-fold with compared to the culture filtrate in the presence of the buffer. Dying of gels in benzidine, 1-naphthol, guaiacol, o-dianisidine made it possible to compare peroxidase isozyme spectrums. Extraction enzyme conditions (duration, extracting components of the buffer) were studied on the needles of Scots pine and leaves of the elm as a model objects. Differences in peroxidase spectrum of transgenic sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants *in vitro* were shown. With the use of an improved method for identifying peroxidase spectrum haptoglobin types in serum of human blood of patients with arterial hypertension were identified. It is assumed that 1-naphthol is a substrate for the detection of peroxidase but not cytochrome-c-oxidase activity. Isozyme peroxidase spectrums can be used to identify plant genus, stage of plant regeneration and ontogenetic age, the action of stress factors. The modified method to determinine the activity and isozyme spectrum of peroxidase was proposed. The essence of method modification tends to change the value of pH of bensidine reactive up to 7.0, instead of pH 2,0–3,0 used today.

Keywords: peroxidase, pH-optimum, substrates, isoforms, staining procedure, modifications

Пероксидаза (ПО; КФ 1.11.1.7) относится к классу оксидоредуктаз. Основная функция ПО – катализировать окисление хими-

ческих соединений за счет пероксидного кислорода с образованием промежуточных комплексов [1].

Пероксидазы подразделяются на два семейства – животные и растительные [2]. Семейство растительных пероксидаз состоит из трех классов, выделяемых на основании исследований аминокислотных последовательностей ферментов [3]. К первому классу растительных ПО относятся внутриклеточные ферменты: аскорбатпероксидаза, бактериальная каталаза-пероксидаза и дрожжевая цитохром-*c*-пероксидаза, второй класс включает секретируемые грибные ферменты, а к третьему классу относятся секретируемые пероксидазы растений [4].

Пероксидаза является одним из ферментов, участвующих в регуляции роста и развития растительных организмов, поскольку катализирует защитные реакции от повреждений различного типа, а также участвует в формировании клеточной стенки и дыхании растений [5–7]. Доказана ее роль в образовании ауксина, этилена, восстановлении нитратов и нитритов, то есть в азотном обмене, ростовых процессах [8]. В присутствии ПО регулируется созревание и старение тканей, синтез лигнина [8]. ПО – наиболее часто изучаемый фермент при анализе соматической изменчивости, возникающей в культуре ткани в условиях *in vitro* [9]. Кроме того, энзим является чувствительным к разного рода неблагоприятным воздействиям и широко используется исследователями для оценки чувствительности/устойчивости к стрессу [10–12]. ПО является индуцибельным ферментом, индуктором которого могут служить физические, химические и биологические факторы. Кислые и основные пероксидазы участвуют в ответных реакциях при стрессовом состоянии растительного организма. В самом начале активируются основные ПО, а изменения, связанные с метаболизмом ауксина и этилена, индуцируют усиление синтеза кислых ПО как более поздний шаг ответа или защиты.

Пероксидазную активность определяют не только для анализа метаболизма растений, но и в клинико-биохимических исследованиях патологических процессов животных тканей, для диагностики хронических и острых, а также аллергических заболеваний. Кроме того, лиофилизированные препараты ПО используются для диагностики бактериальных, аллергических, аутоиммунных и онкологических заболеваний, включая СПИД и лепру [13–18].

В настоящее время существует множество методов определения активности и выявления изоферментного спектра пероксидаз; некоторые методики весьма трудоемки, малочувствительны, дают противоречивые

результаты [19–22]. Разнообразие методик определяется широкой субстратной специфичностью пероксидазы, поскольку фермент проявляет активность в присутствии пероксида водорода по отношению ко многим фенолам и ароматическим аминам: двухатомному фенолу пирокатехину (*o*-диоксибензолу), монометилловому эфиру пирокатехина – гваяколу, оксипроизводному нафталина – 1-нафтолу, 4,4'-диаминодифенилу, известному как бензидин, а также производному бензидина – 3,3'-диметоксибензидину (*o*-дианизидину), 2,2-азинобис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой) кислоте (АБТС) и многим другим [1, 21]. Таким образом, фермент является строго специфичным по отношению к перексиду водорода и широко специфичным – к другим субстратам [1]. Активность изоформ фермента также зависит от природы субстратов, а физиологические функции отдельных форм значительно отличаются. Отмечена видовая, органная, тканевая, внутриклеточная специфичность ПО [1].

В связи со значительным многообразием методов определения активности и выявления изоферментного спектра пероксидазы с применением различных субстратов целью настоящей работы явился обзор собственных 15-летних исследований, а также работ других авторов для выявления наиболее быстрого, незатратного, чувствительного способа в оптимальных субстратных условиях.

Объекты исследования

Обсуждаемые в обзоре эксперименты по определению активности и изоферментного спектра пероксидазы выполнены с использованием культурального филтратта корневой губки различных штаммов (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.), почек дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), листьев вяза обыкновенного (*Ulmus laevis* L.), микрклонов карельской березы (*Betula pendula* Roth var *carelica* Merkl.) и березы повислой (*Betula pendula* Roth), а также вейгелы цветущей «вариегата» (*Weigela florida* «*Variiegata*» Bunge A.D.C.), хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), трансгенных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.), сыворотки крови людей, больных артериальной гипертензией.

Получение ферментных препаратов из растительных тканей

Для получения растительных ферментных экстрактов навеску растительного материала растирают с битым песком в экстрагирующем буфере (0,1 М трис-HCl

буфер, рН 7,5). Соотношение навески и буфера составляет в зависимости от образца от 1:4 до 1:10 (w/v). Гомогенат центрифугируют в эппендорфах в течение 10 минут при 20000 g, + 4 °С, на центрифуге CM50 ELM (Латвия). Надосадочные жидкости сохраняют при -3 °С в твердотельном термостате BIOSAN CH-100 (Латвия).

Буферы для определения активности пероксидазы

В зависимости от оптимума рН фермента используют 0,1 М ацетатный буфер в диапазоне рН 3,6–5,6; 0,1 М цитратный буфер (лимонная кислота / натрий лимоннокислый), рН 3,0–6,6; буфер Мак-Ильвейна (Na_2HPO_4 /лимонная кислота) рН 3,0–6,3; 0,1 М трис-НСl – рН 7,2–9,0.

Молярность буфера. При изучении влияния молярности буфера на активность фермента установлено, что максимальная активность ПО в реакции с бензидином наблюдалась в 100–200 мМ (0,1–0,2 М) трис-НСl буфере при рН 7,0.

Субстраты для определения активности пероксидазы

В проведенных нами экспериментах кинетика насыщения фермента субстратами имела вид равнобочной гиперболы, поэтому константы Михаэлиса определяли по методу двойных обратных величин (координаты Лайнуивера – Берка) [23]. Каталитическую активность устанавливают на основании детекции окрашенных продуктов реакции при 25 °С. Субстратная смесь состояла из 0,05 мл 0,1% водного раствора АБТС (конечная концентрация 30 мкМ), 2,9 мл буфера, измерение оптической плотности проводят при длине волны 436 нм.

В реакции с пирокатехином для определения активности ПО используют 5% водный раствор пирокатехина в 0,1 М буфере Мак-Ильвейна (конечная концентрация 41,3 мМ). Определение активности проводят при длине волны 365 нм.

Для определения активности ПО в реакции с бензидином используют метод А.Н. Бояркова, разработанный впервые при использовании ФЭКа в 1951 г. [24]. Бензидиновый реактив включает два компонента [25]. Первый состоит из 50% спиртового раствора 0,1% бензидина солянокислого, содержащего 6% ацетата натрия, 3% уксусной кислоты. Конечная концентрация бензидина в реакционной смеси – 5,8 мМ. Вторым компонентом является 0,5% раствор пероксида водорода (конечная концентра-

ция 0,3 мМ). Значение рН бензидинового реактива составляет менее 2,0 единиц рН, а предварительные исследования выявили рН-оптимум действия ПО, равный 7,0. Поэтому первый компонент бензидинового реактива доводят до нейтрального значения рН растертым в порошок (для неизменности объема смеси) кристаллическим NaOH. Приготовленная таким образом основа бензидинового реактива может храниться в холодильнике при 0–4 °С в течение года. Для упрощения процедуры измерения активности ПО в кварцевую кювету вносят 3 мл первого компонента бензидинового реактива, предварительно согретого до комнатной температуры, и добавляют 18 мкл H_2O_2 . Измерения проводят при 520 нм.

Выявление изоферментного спектра пероксидаз

Изоферментный спектр ПО выявляют с использованием бензидинового реактива, *o*-дианизидина, α -нафтола.

Состав и методика применения бензидинового реактива описаны выше.

Х.С. Рафиковым впервые был использован для выявления пероксидазной реакции гаптоглобина крови *o*-дианизидин [26]. В состав проявляющей смеси входят 50 мл воды, 1 г *o*-дианизидина, 2,5 мл CH_3COOH , 0,2 мл H_2O_2 . После появления оранжевых полос реакцию останавливают добавлением раствора 15% уксусной кислоты.

Для приготовления проявляющей смеси с α -нафтолом берут 1 мМ 1-нафтола в 0,1 М фосфатном буфере в присутствии 0,33 мМ перекиси водорода. Данный метод используется, в частности, в клинко-диагностических лабораториях при цитохимическом диагностировании лейкозов [27].

Вертикальный электрофорез (ЭФ) проводят по стандартному методу Дэвиса в пластинах полиакриламидного геля (7,5% по акриламидной смеси) при 4 °С. К 0,05–0,2 мл ферментного образца добавляют в качестве антиконвекционной смеси глицерин до конечной концентрации 20%, в карман геля вносят 20 мкл пробы, в качестве лидирующего красителя используют бромфеноловый синий.

Выявление зон активности проводят по Левитесу [28], Божко [29], Рафикову [30], Юренковой [31, 32]. Гели высушивают на стеклянных пластинах, в целлофане (Балаково), в растворе спирт: глицерин (1:1), а затем сканируют с разрешением 300dpi на сканере HP Scanjet 3770 в окне для прозрачных материалов. Гели хранят в темноте.

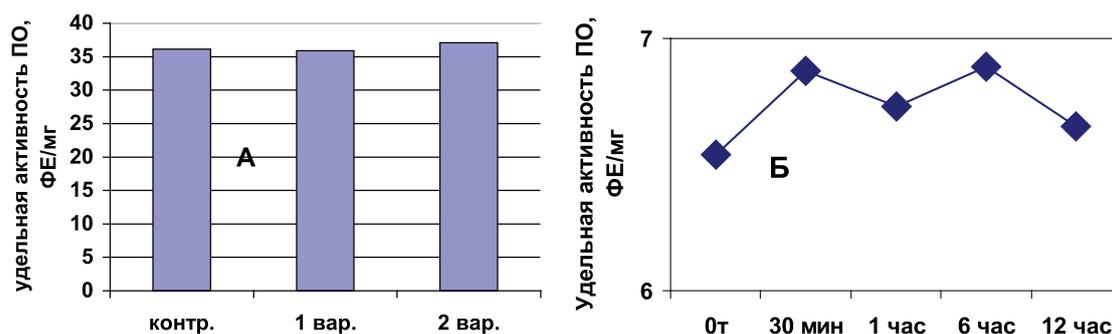


Рис. 1. Зависимость активности пероксидазы (А) от состава экстрагирующего буфера в хвое сосны обыкновенной и (Б) длительности экстракции ПО в листьях вяза обыкновенного (гладкого) *Ulmus laevis* L. Обозначения: А: контроль – экстракция в 0,1 М трис-НСl буфере, рН 7,0; 1 вар. – контроль + ЭДТА + меркаптоэтанол + КСl; 2 вар – 1 вар. + 5% поливинилпирролидон

Экстракция пероксидаз из различных тканей

Растительные пероксидазы высокостабильны, поэтому в состав экстрагирующего буфера входит только трис-НСl, рН 7,0. Добавление ЭДТА, меркаптоэтанола, хлорида калия, а также поливинилпирролидона не влияет на изменение активности фермента (рис. 1).

Кроме того, можно отметить нейтральное влияние длительности экстракции фермента (от 30 мин до 12 часов) из сосновой хвои, считающейся труднодоступной для извлечения ферментов, на активность ПО. Полученный после центрифугирования супернатант обнаруживал стабильную активность и неизменность изоформ ПО в течение по крайней мере недели, при этом хранение препарата осуществлялось при 0°C в присутствии 20% глицерина.

Нами было установлено, что оптимум рН для ПО из корневой губки в присутствии АБТС в цитратном, ацетатном и буфере Мак-Ильвейна сдвинут в кислую сторону (рН 4,5–5,5). В трис-НСl буфере в присутствии бензидина оптимум рН составляет 7,0–7,5, а в буфере Мак-Ильвейна в присутствии пирокатехина – 6,0–6,5. В буфере Мак-Ильвейна оптимум рН более широкий, и активность пероксидазы в этой системе в 1,3 раза выше по сравнению с цитратным буфером (рис. 2). Можно предположить, что такое увеличение активности фермента связано с присутствием ионов неорганического фосфора в составе буфера Мак-Ильвейна. Активность ПО в культуральном фильтрате (КФ) корневой губки ниже активности фермента в цитратном буфере в 9,7 раз.

В связи с этим было изучено влияние HPO_4^{2-} -ионов на активность ПО корневой

губки посредством добавления к цитратному буферу соли Na_2HPO_4 . Добавление 0,5 мМ соли приводит к падению активности фермента до ее уровня в КФ. Увеличение концентрации соли до 1,0 и 2,0 мМ повышало активность ПО до уровня ее показателей в цитратном буфере. Дальнейшее повышение концентрации ионов фосфора (3,0 мМ) приводит к падению активности фермента. Таким образом, действие буфера Мак-Ильвейна высокоспецифично и отличается от простого влияния ионов фосфора на активность энзима. Отмечено, что влияние фосфата натрия проявляется только в условиях буферной системы, а его добавление в концентрации 1 мМ непосредственно к культуральному фильтрату штаммов (контроль) приводило к полной потере активности ферментного препарата.

Наивысшая активность пероксидазы проявляется при молярности трис-НСl буфера (рН 7,0), составляющей 100 мМ и выше (рис. 3).

Методы определения активности пероксидаз

Принципы методов определения активности ПО основаны на появлении окрашенных продуктов при окислении субстратов под действием пероксидазы, регистрируемых по увеличению оптической плотности при соответствующей длине волны. Одной из важнейших характеристик любого фермента является специфичность его действия по отношению к субстрату. Анализ кинетических характеристик показал, что скорость окисления пирокатехина в КФ корневой губки (K_m 29 мМ) оказалась на порядок ниже скорости окисления АБТС (K_m 40–60 мкМ для разных штаммов), хотя

молекула пирокатехина (*o*-диоксибензол) является фенольным производным и по своему строению проще молекулы АБТС. Скорость окисления бензидина, измеренная в хвое сосны, почках дуба и микроклонах березы и сахарной свеклы, оказывается промежуточной: K_m в 0,1 М трис-НС1 буфере при pH 7,0 равна 0,3 мМ.

Чувствительность реакции очень высока, поэтому объем используемого ферментативного экстракта мал (1–10 мкл), а время измерения активности фермента составляет не более 3 мин. В случае обнаружения чрезмерно высокой ферментативной активности препаратов их разбавляют 0,1 М трис-НС1 буфером, pH 7,0 для сохранения нормальных кинетических кривых или используют удвоенное количество перекиси водорода (36 мкл). Бензидиновый метод определения активности ПО представляется оптималь-

ным в силу ряда причин: длительного хранения базового реактива (около года при 0°C), оптимальных условий pH, доступности компонентов и простоты измерения.

Анализ изоферментного спектра пероксидаз

а) Проявление с использованием *бензидина*

Для выявления изоформ пероксидазы растительного происхождения применяют бензидиновый реактив при pH 7,0. Перед окрашиванием геля компоненты бензидинового реактива смешивают в соотношении 1:1. После заливки геля бензидиновым реактивом окраска зон пероксидазной активности проявляется в зависимости от количества нанесенного фермента в течение 5–130 минут (рис. 4–6). Иногда гель оставляют в проявляющем растворе на ночь в темноте.

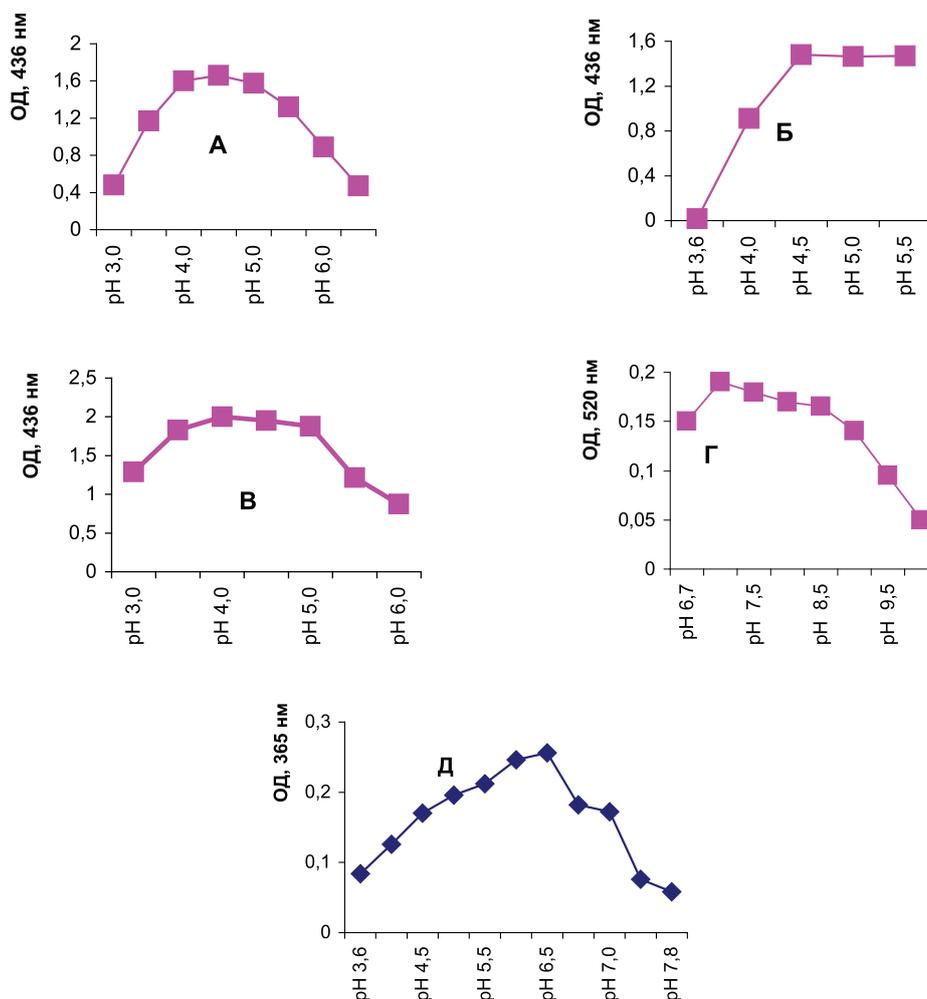


Рис. 2. pH-зависимость активности пероксидазы корневой губки в различных буферных системах. Обозначения: А – цитратный буфер; Б – ацетатный буфер; В, Д – буфер Мак-Ильвейна; Г – трис-НС1 буфер; А–В – субстрат АБТС, культуральный фильтрат корневой губки, Г – субстрат – бензидин, листья березы повислой *in vitro*, Д – субстрат пирокатехин; молярность всех буферов – 0,1 М

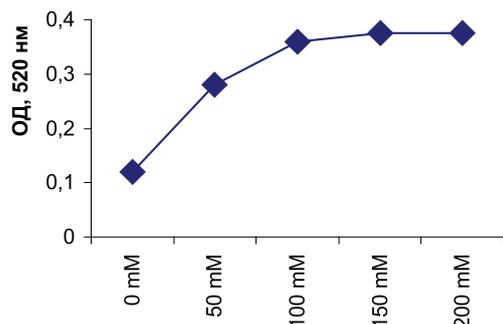


Рис. 3. Влияние молярности трис-НС1 буфера (рН 7,0) на активность пероксидазы из листьев березы повислой *in vitro*

Выявление изоформ пероксидазы бензидиновым методом позволяет получить достаточно широкий спектр зон фермента.

Этот метод, однако, не подходит для выявления зон гаптоглобина сыворотки крови, т.к. не выявляет всех изоформ фермента [33]. Поэтому для выявления фенотипов гаптоглобина использовали еще два метода.

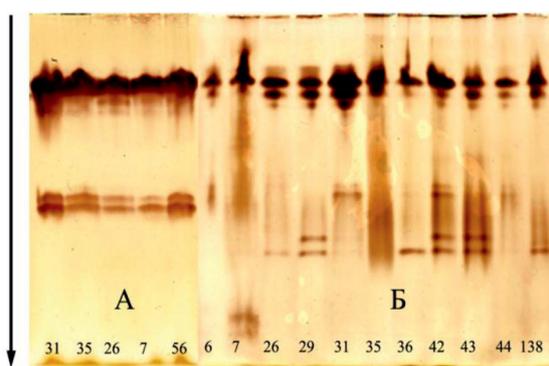


Рис. 4. Изоферментный спектр ПО в зимних почках (А; февраль) и распускающихся листьях (Б; март, образование на почках зеленого конуса) дуба черешчатого [34]. Плюсовые деревья Шиповой дубравы, Воронеж

По первому из них, предложенному Г.Х. Божко с соавт. [29], проявление геля проводят с использованием бензидинового реактива, исключающего присутствие спирта и уксуснокислого натрия: пластины геля выдерживают в течение 10 мин в 0,1 % бензидине в 10 % уксусной кислоте, после чего гели перемещают в кюветы с 0,03 % раствором перекиси водорода. Окраска ферментативных полос стремительно развивается, но после промывания в воде синяя окраска фермента переходит в коричневую, становится нестабильной, а гели – непригодными для сушки.

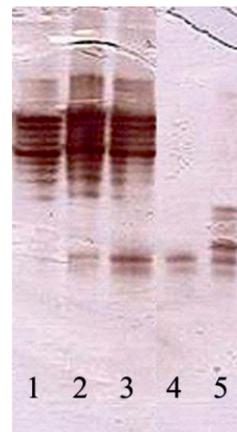


Рис. 5. Peroксидазный спектр растений-регенерантов березы различного происхождения в культуре *in vitro* [35]. Обозначения: 1–4 – карельская береза, узорчатая форма; 2 и 3 – карельская береза, триплоидная узорчатая форма; 4 – карельская береза, безузорчатая форма; 5 – береза повислая; 1 – каллус с регенерирующими побегами; 2 – регенерант; 3 – каллус; 4 – регенерант без корней; 5 – регенерант без корней

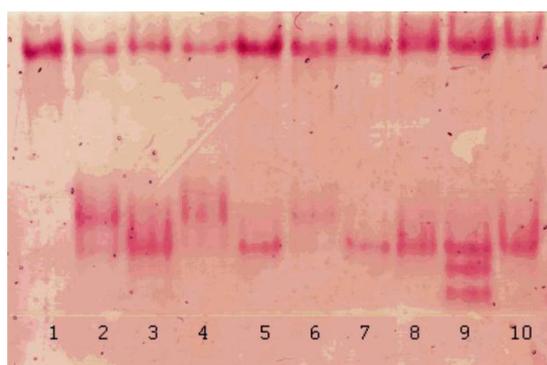


Рис. 6. Изоферментный спектр ПО в различных линиях трансгенной сахарной свеклы *in vitro* [36], выявленный с помощью бензидина. Обозначения: 1 – контроль; 2–10 – опыт

Другим способом выявления спектров гаптоглобина по пероксидазной активности является метод, предложенный Х.С. Рафиковым [30]. Он включает выдерживание гелей в растворе, содержащем 50 мг бензидина, 135 мг гваякола, 25 мл 10 % уксусной кислоты, перед применением раствор разводят водой в соотношении 1:5. К 10 мл бензидин-гваяколовому реактиву добавляют дополнительно 1 мл 0,2 М ацетата натрия, 0,1 мл 5 мМ сульфата марганца и 1 каплю 50 % перекиси водорода. Время проявления составляет 10–20 мин. Реакцию останавливают 15 % уксусной кислотой. Учитывая сложность приготовления проявляющей смеси, в даль-

нейшем стали применять *o*-дианизидин, который обычно используют для выявления активности фермента в культуральной жидкости дереворазрушающих и других грибов – представителей белой и коричневой плесеней [33]. Исходя из литературных данных, проявляющая смесь для выявления пероксидазной активности для сыворотки крови состоит из 1 г *o*-дианизидина, 2,5 мл уксусной кислоты, 0,2 мл перекиси водорода в 50 мл воды. Зоны фермента приобретали красный цвет на фоне темно-вишневого фона геля (рис. 7).

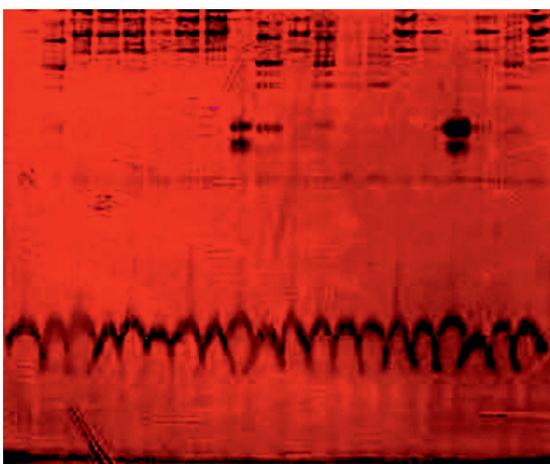


Рис. 7. Электрофореграммы гемоглобинов сыворотки крови у 20 человек, больных артериальной гипертензией [37]. Обозначения: Типы гемоглобинов: Нр 1–1 – дорожки (слева направо) 1, 3–8, 11, 15–16, 18, 20; Нр 1–2 – дорожки 2, 10, 12–14, 19; Нр 2–2 – дорожки 9, 17

Способ выявления изоформ ПО с помощью *o*-дианизидина применялся нами и для сравнения спектра фермента из спящих и пробуждающихся почек дуба черешчатого. Результаты приведены на рис. 8.

В руководстве Левитаса [28] описан метод выявления изоформ ПО с помощью 0,1 М гваякола (100 мл) в сочетании с 1–3 мл 3% перекиси водорода. Однако автор указывает, что окраска нестойкая. Этот же автор описывает и бензидиновый способ проявления гелей на ПО-активность при pH 5,0, при этом гель фиксируют в метаноле.

Кроме того, существует способ выявления активности пероксидазной активности в гелях, описанный в статье С.И. Юренковой с соавт. [31] для электрофоретического выявления изоформ цитохром-*c*-оксидазы. Реакционная смесь для выявления зон фермента включает 1 мл 2% спиртового раствора 1-нафтола, 25 мл водного раствора диметил-*n*-фенилендиамина солянокислого (20 мг), 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,4 до 50 мл. Однако при проявлении гелей на цитохром-*c*-оксидазу выявлялись полосы активности, совпадающие с таковыми при выявлении пероксидазной активности. Такие результаты были получены у почек дуба черешчатого, а также у микроклонально размноженных растений вейгелы цветущей «вариегата», адаптированных к медному и солевому стрессу в ходе длительной ступенчатой адаптации на протяжении 120 суток (рис. 9).

Полученные результаты позволяют нам предположить, что 1-нафтол в данном методе является субстратом для проявления активности ПО, а не цитохром-*c*-оксидазы.

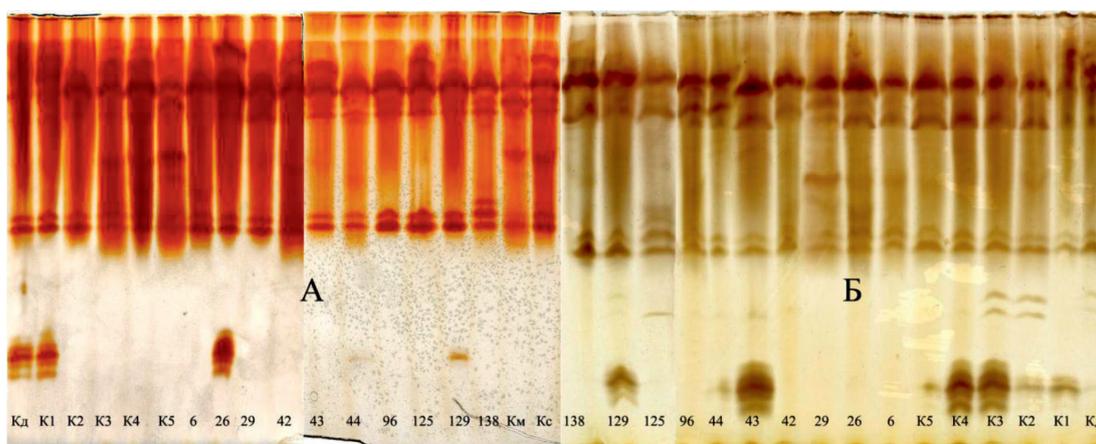


Рис. 8. Изоферментный спектр ювенильных листьев дуба черешчатого [36]. Обозначения: А – выявление изоформ ПО с помощью *o*-дианизидина; Б – выявление изоформ ПО с помощью бензидина; Кд – дерево колонновидной формы кроны из Семилукского питомника; К – контрольные деревья; № 6 – № 138 – плюсовые деревья дуба черешчатого позднораспускающейся фенотипа

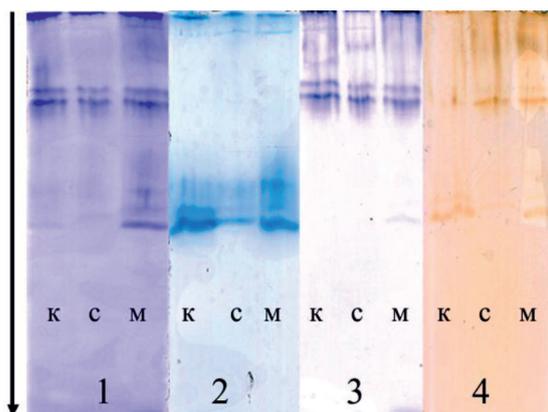


Рис. 9. Изоферментный спектр пероксидазы в микроклонах вейгелы цветущей «вариегата», адаптированных к солевому и медному стрессам. Обозначения: 1 и 2 – 40 и 120 суток адаптации, субстрат – 1-нафтол в фосфатном буфере; 3 и 4 – 40 и 120 суток адаптации, субстрат – бензидин; к – контроль, с – соль, м – медь. Стрелкой указано направление движения тока при электрофорезе

Изоформы пероксидазы могут быть выявлены различными способами, но при этом надо учитывать, что спектры фермента получаются различными, что связано со скоростью утилизации субстрата теми или иными формами фермента. Представляется, что метод выявления активности фермента в гелях с помощью бензидина при pH 7,0 является более универсальным. При проявлении изоформ ПО с помощью *o*-дианизидина появляющиеся зоны менее стабильны, некоторые из них пропадают уже через несколько минут. Через сутки они практически полностью исчезают, тогда как в предыдущем случае, при правильном хранении, гели сохраняют окраску многие годы.

Таким образом, с помощью выявления изоформ ПО можно выявить отличия одного вида растений от другого, стадию регенерации растения, влияние стрессовых воздействий, онтогенетический возраст растения, независимо от того, древесное или травянистое растение берется для анализа.

Гаптоглобин является стрессовым белком крови человека и животных, обладающим пероксидазной активностью [38]. По его количеству можно определить степень тяжести заболевания [39]. Имеют значения и типы гаптоглобина: они связаны с определенным заболеванием. Выявление фенотипов гаптоглобина используется как для выбраковки больных животных, так и для получения потомства от генетически здо-

ровых родителей [40, 41]. При выявлении типов гаптоглобина также используется *o*-дианизидин.

Заключение

Таким образом, из проанализированных способов определения активности и выявления изоферментного спектра пероксидазы оптимальным представляется метод, основанный на применении бензидинового реактива в нашей модификации, связанной с повышением pH реактива до нейтральных значений (7,0), тогда как в классических методиках pH сильно-кислый (2,0). Для электрофоретического выявления изоформ фермента растений бензидиновый способ является наиболее удобным, дешевым, позволяющим получить стабильную окраску гелей.

Список литературы

1. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений / В.А. Андреева. – М.: Наука, 1988. – С. 8–40.
2. Welinder K.G. Plant peroxidases. Their primary, secondary and tertiary structures, and relation to cytochrome c peroxidase // European Journal of Biochemistry. – 1985. – V. 151. № 3. – P. 497–504.
3. Zamocky M., Gasselhuber B., Furtmuller P.G., Obinger C. Turning points in the evolution of peroxidase-catalase superfamily: molecular phylogeny of hybrid heme peroxidases // Cell. Mol. Life Sci. – 2014. – V. 71. – P. 4681–4696.
4. Захарова Г.С. Пероксидаза из корней хрена. Модулирование свойств белковой глобулы и гема / Г.С. Захарова, И.В. Упоров, В.И. Тишков // Успехи биологической химии. – 2011. – Т. 51. – С. 37–64.
5. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода: учебное пособие / О.Г. Полесская; под ред. И.П. Ермакова. – М.: КДУ, 2007. – 140 с.
6. Fattahi Neisiani F., Modareh Sanavy S.A.M., Ghanati F., Dolatabadian A. Effect of foliar application of pyridoxine on antioxidant enzyme activity, proline accumulation and lipid peroxidation of Maize (*Zea mays* L.), under water deficit // Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj. – 2009. – V. 37. № 1. – P. 16–121.
7. Пролин и функционирование антиоксидантной системы растений и культивируемых клеток *Thellungiella salsuginea* при окислительном стрессе / Т.Н. Сошникова, Н.Л. Радюкина, Д.В. Королькова, А.В. Носов // Физиология растений. – 2013. – Т. 60, № 1. – С. 47–60.
8. Рубин Б.А. Физиология и биохимия дыхания растений: учеб. пособие для биол. специальностей ун-тов / Б.А. Рубин, М.Е. Ладыгина. – М.: Изд. Москов. ун-та, 1974. – 512 с.
9. Долгих Ю.И. Селекция на осмоустойчивость кукурузы *in vitro* и характеристика растений-регенерантов / Ю.И. Долгих, С.Н. Ларина, З.Б. Шамина // Физиология растений. – 1994. – Т. 41, № 1. – С. 114–117.
10. О возможности изменения кинетических характеристик Na^+ -АТФазы микроводоросли *Tetraselmis viridis* при адаптации ее к различным концентрациям NaCl / И.Г. Стриж, Л.Г. Попова, И.М. Андреев, Ю.В. Балнокин // Доклады Академии наук. – 2002. – Т. 383, № 1. – С. 120–123.
11. Yuan Huang, Zhilong Bie, Zhixiong Liu, Ai Zhen, Weijuan Wang. Protective role of proline against salt stress is partially related to the improvement of water status and peroxidase enzyme activity in cucumber // Soil Science and Plant Nutrition. – 2009. – V. 55. – P. 698–704.

12. Baysal Furtana G., Tipirdamaz R. Physiological and antioxidant response of three cultivars of cucumber (*Cucumis sativus* L.) to salinity // *Turk. J. Biol.* – 2010. – V. 34. – P. 287–296.
13. Львов С.Г. Энзимология новообразований: межвузовский научно-тематический сборник / С.Г. Львов; под ред. А.М. Голубева. – Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 1981. – С. 88–96.
14. Пигаревский В.Е. Гипотеза о резорбтивной клеточной резистентности как особой форме антимикробной защиты организма / В.Е. Пигаревский // *Архив патологии.* – 1992. – Т. 54, вып. 8. – С. 40–45.
15. Активность антиоксидантных ферментов крови при хронических поражениях печени / Б.Н. Матюшин, А.С. Логинов, Г.Н. Якимчук, В.Д. Ткачев // *Вопросы медицинской химии.* – 1995. – № 4. – С. 54–56.
16. Контбаева А.Е. Цитохимические показатели активности миелопероксидазы и содержания катехоламинов в крови родильниц, проживающих на территориях, прилегающих к Семипалатинскому ядерному полигону / А.Е. Контбаева, Л.Т. Базелюк // *Вопросы медицинской химии.* – 2002. – Т. 48, № 3. – С. 293–296.
17. Маслов А.К. Влияние корня хрена на функциональные способности фагоцитов, формулу крови и состояние печени мышей с экспериментальной лепрой / А.К. Маслов, С.А. Лужнова, О.В. Калянина // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2002. – Т. 134, № 8. – С. 181–183.
18. Маслов А.К. Роль пероксидазы в патогенезе заболеваний и реализация ее фармакологической активности на примере экспериментальной лепры / А.К. Маслов // *Вестник новых медицинских технологий.* – 2007. – Т. 14, № 4. – С. 161–164.
19. Ferrer M.A., Pedreno M.A., Munoz R., Ros Barcelo A. Soluble peroxidase gradients in lupin hypocotyls and the control of the level of polarly transported indole-3-yl-acetic acid // *Journal of Plant Growth Regulation.* – 1991. – V. 10. – P. 139–146.
20. Alpeeva I.S., Castillo Leon J., Chubar T.A., Galaev I.Yu., Csoregi E., Sakharov I.Yu. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers // *Proc. 6 Intern. Sym. Biotechnology – state of the art and prospects of development (Moscow, Russia, October 14–18, 2002).* – М., 2002. – P. 623.
21. Latger-Cannard V., Bardet V., Malet M., Lagrange M., Empereur F., Fenneteau O. Evaluation of peroxidase activity by alpha-naphthol/pyronine staining compared with benzidine staining in 101 acute leukemia cases // *Laboratory hematology: official publication of the international society for laboratory hematology.* – 2010. – V.16. № 4. – P. 76–82.
22. Симонова З.А. Активность пероксидазы *Betula pendula* как индикатор качества городской среды (на примере г. Саратова) / З.А. Симонова, Д.А. Чемаркин // *Фундаментальные исследования.* – 2013. – № 8–5. – С. 1097–1101.
23. Нельсон Д. Основы биохимии Ленинджера: в 3 т. Т. 2: Биоэнергетика и метаболизм / Д. Нельсон, М. Кох; пер. с англ. – М.: БИНОМ, 2014. – 636 с.
24. Рогожин В.В. Пероксидаза: строение и механизм действия / В.В. Рогожин, В.В. Верхотуров, Т.В. Рогожина. – Иркутск: Из-во ИГТУ, 2004. – 200 с.
25. Землянухин А.А. Практикум по биохимии: учебное пособие / А.А. Землянухин. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 1993. – 188 с.
26. Рафигов Х.С. Выявление наследственных вариантов церуллоплазмينا и гаптоглобина в сыворотке крови человека на одной фореграмме / Х.С. Рафигов // *Лабораторное дело.* – 1980. – № 4. – С. 253–254.
27. Latger-Cannard V., Bardet V., Malet M., Lagrange M., Empereur F., Fenneteau O. Evaluation of peroxidase activity by alpha-naphthol/pyronine staining compared with benzidine staining in 101 acute leukemia cases // *Lab. Hematol.* – 2010. – V. 16. № 4. – P. 76–82.
28. Левитес Е.В. Генетика изоферментов растений / Е.В. Левитес; отв. ред. С.И. Малецкий. – Новосибирск: Наука, 1986. – 145 с.
29. Применение диск-электрофореза в линейном градиенте концентрации полиакриламидного геля для одновременного фракционирования суммарных белков сыворотки крови, гаптоглобина и липопротеидов / Г.Х. Божко, П.В. Волошин, Л.С. Костиюковская, В.М. Кулабухов // *Украинский биохимический журнал.* – 1983. – Т. 55, № 3. – С. 318–324.
30. Юренкова С.И. Онтогенетический полиморфизм изоферментных систем у льна-долгунца / С.И. Юренкова, В.В. Титок, Л.В. Хотылева // *Доклады Национальной академии наук Беларуси.* – 2001. – Т. 45, № 1. – С. 79–82.
31. Полиморфизм видов льна по изоферментным и метаболическим маркерам / С.И. Юренкова, С.В. Кубрак, В.В. Титок, Л.В. Хотылева // *Генетика.* – 2005. – Т. 41, № 3. – С. 334–340.
32. Изучение метаболизма плюсовых деревьев дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) / К.А. Карпеченко, И.Ю. Карпеченко, О.А. Землянухина [и др.] // *Фундаментальные исследования.* – 2013. – № 1–2. – С. 287–291.
33. Leontievsky A.A., Myasoedova N.M., Maltseva O.V., Termkhitarova N.G. Mn-dependent peroxidase and oxidase I of *Panus tigrinus* 8/18: purification and properties // *Biochemistry.* – М., 1990. – V. 55. – P. 1375–1380.
34. Активность и изомимный спектр пероксидазы клонов карельской березы, размноженных *in vitro* / О.А. Землянухина, О.С. Машкина, И.В. Саблина [и др.] // *Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегион. сб. науч. раб.* – Воронеж: ВГУ, 2003. – С. 46–52.
35. Изучение биохимических особенностей трансгенных растений сахарной свеклы / О.А. Землянухина, Е.Н. Васильченко, Т.П. Жужжалова [и др.] // *Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегион. сб. науч. раб.* – Воронеж: ВГУ, 2007. – С. 60–68.
36. Никитин А.В. Сравнение различных методических подходов в выявлении спектров гаптоглобина / А.В. Никитин, Л.И. Смышникова, О.А. Землянухина // *Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегион. сб. науч. раб.* – Воронеж: ВГУ, 2000. – С. 85–88.
37. Определение количества и фенотипа гаптоглобина у больных гипертонической болезнью / О.А. Землянухина, Ю.И. Чернов, Г.А. Батищева [и др.] // *Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегион. сб. науч. раб.* – Воронеж: ВГУ, 2003. – С. 53–58.
38. Пospelova A.B. Гаптоглобины сыворотки крови, их свойства, структура и обмен / А.В. Пospelova, В.М. Родионов // *Успехи биологической химии.* – 1970. – Т. 2. – С. 128–148.
39. Логинов А.С. Частота фенотипов гаптоглобина у больных с хронически активными заболеваниями печени / А.С. Логинов, П.Е. Крель, Г.К. Гинтер // *Терапевтический архив.* – 1980. – Т. 52, № 7. – С. 43–46.
40. Ключников М.Т. Селен в профилактике бесплодия коров / М.Т. Ключников, Н.Ф. Ключникова // *Сб. науч. трудов ВАСХНИЛ.* – Хабаровск: Изд-во ДальНИИСХ, 1990. – С. 28–32.
41. Влияние гаптоглобина на иммунохимические свойства гемоглобина / А.П. Андреева, А.А. Левина, В.М. Белоостоцкий [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 1971. – Т. 72, № 2. – С. 58–61.

References

1. Andreeva V.A. Ferment peroksidaza: Uchastie v zashhitnom mehanizme rastenij / V.A. Andreeva. М.: Nauka, 1988. pp. 8–40.
2. Welinder K.G. Plant peroxidases. Their primary, secondary and tertiary structures, and relation to cytochrome c peroxidase // *European Journal of Biochemistry.* 1985. V. 151. no. 3. pp. 497–504.
3. Zamocky M., Gasselhuber B., Furtmuller P.G., Obinger C. Turning points in the evolution of peroxidase-catalase superfamily: molecular phylogeny of hybrid heme peroxidases // *Cell. Mol. Life Sci.* 2014. V. 71. pp. 4681–4696.
4. Zaharova G.S. Peroksidaza iz kornej hrena. Modulirovanie svojstv belkovej globuly i gema / G.S. Zaharova, I.V. Uporov, V.I. Tishkov // *Uspeshi biologicheskoy himii.* 2011. T. 51. pp. 37–64.

5. Poleskaja O.G. Rastitelnaja kletka i aktivnye formy kisloroda: uchebnoe posobie / O.G. Poleskaja; pod red. I.P. Ermakova. M.: KDU, 2007. 140 p.
6. Fattahi Neisiani F., Modarees Sanavy S.A.M., Ghanati F., Dolatabadian A. Effect of foliar application of pyridoxine on antioxidant enzyme activity, proline accumulation and lipid peroxidation of Maize (*Zea mays* L.), under water deficit // *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*. 2009. V. 37. no. 1. pp. 16–121.
7. Prolin i funkcionirovanie antioksidantnoj sistemy rastenij i kultiviruemykh kletok *Thellungiella salsuginea* pri oksidativnom stresse / T.N. Soshnikova, N.L. Radjukina, D.V. Korolkova, A.V. Nosov // *Fiziologija rastenij*. 2013. T. 60, no. 1. pp. 47–60.
8. Rubin B.A. Fiziologija i biohimija dyhanija rastenij: ucheb. posobie dlja biol. specialnostej un-tov / B.A. Rubin, M.E. Ladygina. M.: Izd. Mosk. un-ta, 1974. 512 p.
9. Dolgih Ju.I. Selekcija na osmoustojchivost kukuruzy in vitro i harakteristika rastenij-regenerantov / Ju.I. Dolgih, S.H. Larina, Z.B. Shamina // *Fiziologija rastenij*. 1994. T. 41, no. 1. pp. 114–117.
10. O vozmozhnosti izmenenija kineticheskikh harakteristik Na⁺-ATFazy mikrovdorosli *Tetraselmis viridis* pri adaptacii ee k razlichnym koncentracijam NaCl / I.G. Strizh, L.G. Popova, I.M. Andreev, Ju.V. Balnokin // *Doklady Akademii nauk*. 2002. T. 383, no. 1. pp. 120–123.
11. Yuan Huang, Zhilong Bie, Zhixiong Liu, Ai Zhen, Weijuan Wang. Protective role of proline against salt stress is partially related to the improvement of water status and peroxidase enzyme activity in cucumber // *Soil Science and Plant Nutrition*. 2009. V. 55. pp. 698–704.
12. Baysal Furtana G., Tipirdamaz R. Physiological and antioxidant response of three cultivars of cucumber (*Cucumis sativus* L.) to salinity // *Turk. J. Biol.* 2010. V. 34. pp. 287–296.
13. Lvov S.G. Jenzimologija novoobrazovaniy: mezhvuzovskij nauchno-tematicheskij sbornik / S.G. Lvov; pod red. A.M. Golubeva. Saratov: Izd-vo Sarat. un-ta, 1981. pp. 88–96.
14. Pigarevskij V.E. Gipoteza o rezorbtivnoj kletochnoj rezistentnosti kak osoboj forme antimikrobnoj zashhity organizma / V.E. Pigarevskij // *Arhiv patologii*. 1992. T. 54, vyp. 8. pp. 40–45.
15. Aktivnost antioksidantnykh fermentov krovi pri hronicheskikh porazhenijah pecheni / B.N. Matjushin, A.S. Loginov, G.N. Jakimchuk, V.D. Tkachev // *Voprosy medicinskoj himii*. 1995. no. 4. pp. 54–56.
16. Kontbaeva A.E. Citohimicheskie pokazateli aktivnosti mieloperoksidazy i soderzhanija kateholaminov v krovi rodilnic, prozhivajushhikh na territorijah, prilagajushhikh k Semipalatinскому jadernomu poligonu / A.E. Kontbaeva, L.T. Bazeljuk // *Voprosy medicinskoj himii*. 2002. T. 48, no. 3. pp. 293–296.
17. Maslov A.K. Vlijanie kornja hrena na funkcionalnye sposobnosti fagocitov, formulu krovi i sostojanie pecheni myshj s jeksperimentalnoj leproj / A.K. Maslov, S.A. Luzhnova, O.V. Kaljanina // *Bjulleten jeksperimentalnoj biologii i mediciny*. 2002. T. 134, no. 8. pp. 181–183.
18. Maslov A.K. Rol peroksidazy v patogeneze zabolovanij i realizacija ee farmakologicheskoy aktivnosti na primere jeksperimentalnoj leproj / A.K. Maslov // *Vestnik novykh medicinskih tehnologij*. 2007. T. 14, no. 4. pp. 161–164.
19. Ferrer M.A., Pedreno M.A., Munoz R., Ros Barcelo A. Soluble peroxidase gradients in lupin hypocotyls and the control of the level of polarly transported indole-3yl-acetic acid // *Journal of Plant Growth Regulation*. 1991. V. 10. pp. 139–146.
20. Alpeeva I.S., Castillo Leon J., Chubar T.A., Galaev I.Yu., Csoregi E., Sakharov I.Yu. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers // *Proc. 6 Intern. Sym. Biotechnology state of the art and prospects of development (Moscow, Russia, October 14–18, 2002)*. M., 2002. pp. 623.
21. Latger-Cannard V., Bardet V., Malet M., Lagrange M., Empereur F., Fenneteau O. Evaluation of peroxidase activity by alpfa-naphtol/pyronine staining compared with benzidine staining in 101 acute leukemia cases // *Laboratory hematology: official publication of the international society for laboratory hematology*. 2010. V.16. no. 4. pp. 76–82.
22. Simonova Z.A. Aktivnost peroksidazy *Betula pendula* kak indikator kachestva gorodskoj sredy (na primere g. Saratova) / Z.A. Simonova, D.A. Chemarkin // *Fundamentalnye issledovanija*. 2013. no. 8–5. pp. 1097–1101.
23. Nelson D. Osnovy biohimii Lenindzhera: v 3 t. T. 2: Bioenergetika i metabolizm / D. Nelson, M. Koks; per. s angl. M.: BINOM, 2014. 636 p.
24. Rogozhin V.V. Peroksidaza: stroenie i mehanizm dejstvija / V.V. Rogozhin, V.V. Verhoturov, T.V. Rogozhina. Irkutsk: Iz-vo IGU, 2004. 200 p.
25. Zemljanuhin A.A. Praktikum po biohimii: uchebnoe posobie / A.A. Zemljanuhin. Voronezh: Izd-vo VGU, 1993. 188 p.
26. Rafikov H.S. Vyjavlenie nasledstvennykh variantov cerryuloplazmina i gaptoglobina v syvorotke krovi cheloveka na odnoj foregramme / H.S. Rafikov // *Laboratornoe delo*. 1980. no. 4. pp. 253–254.
27. Latger-Cannard V., Bardet V., Malet M., Lagrange M., Empereur F., Fenneteau O. Evaluation of peroxidase activity by alpha-naphthol/pyronine staining compared with benzidine staining in 101 acute leukemia cases // *Lab. Hematol.* 2010. V. 16. no. 4. pp. 76–82.
28. Levites E.V. Genetika izofermentov rastenij / E.V. Levites; otv. red. S.I. Maleckij. Novosibirsk: Nauka, 1986. 145 p.
29. Primenenie disk-jelektroforeza v linejnom gradiente koncentracii poliakrilamidnogo gelya dlja odnovernennogo frakcionirovanija summarnykh belkov syvorotki krovi, gaptoglobinov i lipoproteidov / G.H. Bozhko, P.V. Voloshin, L.S. Kostjukovskaja, V.M. Kulabuhov // *Ukrainskij biohimicheskij zhurnal*. 1983. T. 55, no. 3. pp. 318–324.
30. Jurenkova S.I. Ontogeneticheskij polimorfizm izofermentnykh sistem u lna-dolgunca / S.I. Jurenkova, V.V. Titok, L.V. Hotyleva // *Doklady Nacionalnoj akademii nauk Belarusi*. 2001. T. 45, no. 1. pp. 79–82.
31. Polimorfizm vidov lna po izofermentnym i metabolicheskim markeram / S.I. Jurenkova, S.V. Kubrak, V.V. Titok, L.V. Hotyleva // *Genetika*. 2005. T. 41, no. 3. pp. 334–340.
32. Izuchenie metabolizma pljusovykh derev duba chereschatogo (*Quercus robur* L.) / K.A. Karpechenko, I.Ju. Karpechenko, O.A. Zemljanuhina [i dr.] // *Fundamentalnye issledovanija*. 2013. no. 1–2. pp. 287–291.
33. Leontievskiy A.A., Myasoedova N.M., Maltseva O.V., Termkhitarova N.G. Mn-dependent peroxidase and oxidase I of *Panus tigrinus* 8/18: purification and properties // *Biochemistry*. M., 1990. V. 55. pp. 1375–1380.
34. Aktivnost i izozimnyj spektr peroksidazy klonov karelskoj berezy, razmnozhennykh in vitro / O.A. Zemljanuhina, O.S. Mashkina, I.V. Sablina [i dr.] // *Organizacija i reguljacija fiziologo-biohimicheskikh processov: mezhregion. sb. nauch. rab. Voronezh: VGU, 2003*. pp. 46–52.
35. Izuchenie biohimicheskikh osobennostej transgennykh rastenij saharnoj svekly / O.A. Zemljanuhina, E.N. Vasilchenko, T.P. Zhuzhzhhalova [i dr.] // *Organizacija i reguljacija fiziologo-biohimicheskikh processov: mezhregion. sb. nauch. rab. Voronezh: VGU, 2007*. pp. 60–68.
36. Nikitin A.V. Sravnenie razlichnykh metodicheskikh podhodov v vyjavlenii spektrov gaptoglobina / A.V. Nikitin, L.I. Smyshnikova, O.A. Zemljanuhina // *Organizacija i reguljacija fiziologo-biohimicheskikh processov: mezhregion. sb. nauch. rab. Voronezh: VGU, 2000*. pp. 85–88.
37. Opredelenie kolichestva i fenotipa gaptoglobina u bolnykh gipertonicheskoy boleznju / O.A. Zemljanuhina, Ju.I. Chernov, G.A. Batishheva [i dr.] // *Organizacija i reguljacija fiziologo-biohimicheskikh processov: mezhregion. sb. nauch. rab. Voronezh: VGU, 2003*. pp. 53–58.
38. Pospelova A.B. Gaptoglobiny syvorotki krovi, ih svojstva, struktura i obmen / A.B. Pospelova, V.M. Rodionov // *Uspehi biologicheskoy himii*. 1970. T. 2. pp. 128–148.
39. Loginov A.C. Chastota fenotipov gaptoglobina u bolnykh s hronicheskimi aktivnymi zabolovanijami pecheni / A.C. Loginov, P.E. Krel, G.K. Ginter // *Terapevticheskij arhiv*. 1980. T. 52, no. 7. pp. 43–46.
40. Kljuchnikov M.T. Selen v profilaktike besplodija korov / M.T. Kljuchnikov, N.F. Kljuchnikova // *Sb. nauch. trudov VASHNIL. Habarovsk: Izd-vo DalNIISH, 1990*. pp. 28–32.
41. Vlijanie gaptoglobina na immunohimicheskie svojstva gemoglobina / A.P. Andreeva, A.A. Levina, V.M. Belostockij [i dr.] // *Bjulleten jeksperimentalnoj biologii i mediciny*. 1971. T. 72, no. 2. pp. 58–61.