

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА И БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В СРЕДАХ С РАЗЛИЧНЫМ ИЗОТОПНЫМ $^2\text{H}/^1\text{H}$ -СОСТАВОМ

© 2020 г. С.В. Козин*, **, А.А. Кравцов*, **, К.К. Туроверов***, А.В. Фонин***, Е.В. Чихиржина***, В.В. Малышко**, ****, А.В. Моисеев*****, А.В. Чуркина*

*Кубанский государственный университет, 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, 149

**Южный научный центр РАН, 344006, Ростов-на-Дону, просп. Чехова, 41

***Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4

****Кубанский государственный медицинский университет МЗ РФ, 350063, Краснодар, ул. Седина, 4

*****Кубанский государственный аграрный университет, 350004, Краснодар, ул. Калинина, 13

E-mail: kozinsv85@mail.ru

Поступила в редакцию 123.123.2019 г.

После доработки 123.123.2019 г.

Принята к публикации 123.123.2019 г.

Установлено, что среда с пониженным содержанием дейтерия не оказывает влияния на вторичную структуру пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина и не вызывает конформационных изменений в структуре этих белков. Помещение данных белков в буферный раствор, приготовленный на обедненной дейтерием воде, приводило к уменьшению интенсивности собственной триптофановой флуоресценции, при этом спектры кругового дихроизма практически не изменялись. Снижение содержания дейтерия в реакционной среде приводило к уменьшению активности пероксидазной реакции окисления *o*-дианизидина и люминола пероксидом водорода.

Ключевые слова: дейтерий, протий, изотопный обмен, пероксидаза хрена, бычий сывороточный альбумин, собственная триптофановая флуоресценция, спектроскопия кругового дихроизма, кинетика реакции.

DOI: 10.31857/S0006302920020039

Известно, что в природе содержание дейтерия в воде колеблется в разных регионах планеты, но в среднем находится на уровне около 150 ppm [1, 2]. Также экспериментально установлено, что даже относительно небольшое изменение изотопного состава воды (двух-трехкратное повышение или понижение содержания дейтерия) существенным образом сказывается на метаболизме как микроорганизмов [3–5], так и высших растений [6–8] и животных, а также характеризуется изменением активности модельных систем [9]. Полученные на сегодняшний день данные свидетельствуют в пользу того, что дейтерий является необходимым элементом для нормального метаболизма живых систем, а колебания его концентрации способны как стимулировать, так и угнетать разнообразные физиологические процессы [10]. Например, возрастание содержания дейтерия в воде вызывает изменение физиологии и морфологии клеток и нередко оказывает отрицательное влияние на их метаболизм. С другой стороны, снижение содержания дейтерия главным

образом благотворно сказывается на функциональной активности организма [11–13].

Однако несмотря на достаточно широкий спектр результатов о стимулирующем влиянии понижения содержания дейтерия в потребляемой воде на физиологические функции живых систем [14–17], механизм этого феномена до сих пор остается не вполне ясным, хотя установлено, что всегда происходит изменение изотопного состава тканей внутренних органов [18]. Считается, что термодинамическая неравноценность изотопологов воды, обусловленная различиями свойств ядер протия и дейтерия, вызывает появление кинетического изотопного эффекта. Предполагается, что различия в кинетике химических и биохимических реакций в воде с различным содержанием дейтерия могут являться следствием большей прочности связи D–O по сравнению со связью H–O [19]. В ряде работ рассматривается роль воды как ключевого фактора, определяющего физико-химические свойства растворов [20, 21]. Кроме того, при изменении изотопного со-

става воды диссоциирующие атомы водорода растворенных биомолекул подвергаются замещению и при уменьшении содержания дейтерия в растворителе происходит его замещение протием в молекулах органических соединений, а повышение содержания дейтерия в воде приводит к дейтерированию биомолекул. Этот процесс обратим и протекает с большей скоростью и вероятностью у атомов водорода, которые находятся ближе к поверхности биомолекулы и менее прочно связаны с соседними атомами (азота, кислорода, серы и других). Очевидно, что в силу различий свойств протия и дейтерия такое замещение может приводить к изменению экспрессии регуляторных белков [22], а также, возможно, к изменению структуры белков, кроме того, поскольку существенная часть белков — это ферменты, осуществляющие катализ самых разнообразных и часто критически важных для метаболизма реакций, логично ожидать, что даже относительно небольшие изменения их конформации будут иметь весьма серьезные последствия для функционирования как отдельных клеток, так и всего организма. Ввиду этого представляется весьма актуальным исследование влияния изменения изотопного состава воды на структуру растворенных в ней белков.

Целью исследования являлось изучение влияния сниженного содержания дейтерия в растворе на функциональные свойства пероксидазы хрена и структуру бычьего сывороточного альбумина.

МЕТОДЫ

Обедненную по дейтерию воду получали на установке, разработанной в Кубанском государственном университете [23–25]. Затем полученную воду с пониженным содержанием дейтерия и дистиллированную воду с естественным содержанием дейтерия подвергали дополнительной очистке в системе очистки воды LaboStar TWF 7 (Evoqua, Германия) до показателей по сопротивлению 18.2 МОм·см.

Для определения активности пероксидазы хрена в средах с различным содержанием дейтерия (50 и 150 ppm, здесь и далее в ppm указано содержание дейтерия) использовали две модельные системы. Первая представляет собой реакцию пероксидазного окисления *o*-дианизидина (Sigma-Aldrich, США) пероксидом водорода [26, 27]. Вторая модельная система — сопровождающееся хемилюминесценцией окисление люминола пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена [28].

Для этих модельных систем были приготовлены следующие растворы: стоковый (основной) раствор пероксидазы хрена (Sigma-Aldrich, США) готовили в 0.01 М калий-фосфатном буфере (pH 7.5), приго-

товленном на воде с природным содержанием дейтерия (150 ppm); за два часа до измерений готовили два рабочих раствора пероксидазы и термостатировали при 37°C — первый рабочий раствор готовили разведением основного раствора фосфатным буфером (pH 7.5), приготовленного на воде с природным содержанием дейтерия (150 ppm); второй рабочий раствор готовили разведением основного раствора фосфатным буфером, приготовленным на воде с пониженным содержанием дейтерия (50 ppm). Концентрацию пероксидазы в рабочих растворах, составившую 7.5 нг/мл, определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 403 нм ($\epsilon_{403} = 10 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [29]). Растворы перекиси готовили разбавлением исходного 38%-го раствора водой. Концентрацию пероксида водорода определяли титриметрически с раствором перманганата калия. Раствор *o*-дианизидина готовили в этаноле по навеске до его конечной концентрации 0.25 мг/мл. Люминол (Sigma-Aldrich, США) растворяли в диметилсульфоксиде также по навеске до концентрации 7 мг/мл. Из этого раствора готовили рабочий раствор люминола путем стократного разведения фосфатным буфером (150 ppm).

Первый эксперимент состоял из следующих этапов: в шестилуночные планшеты с диаметром лунки 3.5 см последовательно приливали 2 мл рабочего буферного раствора пероксидазы и 0.1 мл спиртового раствора *o*-дианизидина. Реакцию инициировали добавлением пероксида водорода требуемой концентрации в объеме 0.1 мл. Кинетику реакции изучали спектрофотометрически, измеряя начальную скорость окисления *o*-дианизидина (V_0) при длине волны 460 нм ($\epsilon_{460} = 3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для конечного продукта при температуре 37°C [30]). Измерения проводили на многофункциональном ридере для микропланшетов FilterMax F5 (Molecular Devices, США). По результатам измерений строили график зависимости начальной скорости пероксидазной реакции окисления от начальной концентрации пероксида водорода при постоянной концентрации *o*-дианизидина. Линеаризацию зависимости начальной скорости пероксидазной реакции окисления от начальной концентрации пероксида водорода осуществляли в координатах Лайнуивера—Берка и Иди—Хофсти. По данным графикам определяли максимальную скорость реакции и константу Михаэлиса.

Эксперимент со второй модельной системой состоял в следующем: к 2 мл рабочего буферного раствора пероксидазы (50 и 150 ppm) при температуре 37°C добавляли 15 мкл люминола. Реакцию инициировали добавлением пероксида водорода (0.25 мМ) в объеме 30 мкл. Свечение, вызванное окислением люминола пероксидом водорода в отсутствие фермента, было на уровне фонового. Кинетику реакции измеряли хемилюминесцентным методом с помощью аппаратно-

программного комплекса «Lum-5773» (ООО «ДИСофт», Москва) и специализированного программного обеспечения PowerGraph 3 Professional с определением светосуммы и тангенса угла наклона касательной [31].

Структуру пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина в средах с различным содержанием дейтерия (50 и 150 ppm) изучали с помощью спектров собственной флуоресценции этих белков и спектров кругового дихроизма. Для этого были приготовлены следующие растворы: стоковые (основные) растворы пероксидазы и альбумина готовили на воде с природным содержанием дейтерия (150 ppm) в 0.01 М калий-фосфатном буфере при pH 7.5. За два часа до измерений готовили два рабочих раствора пероксидазы и два рабочих раствора альбумина и термостатировали при 37°C. Первый рабочий раствор для каждого белка готовили разведением основного раствора фосфатным буфером (pH 7.5, 150 ppm). Второй рабочий раствор для обоих белков готовили разведением основного раствора фосфатным буфером, приготовленным на обедненной дейтерием воде (50 ppm). Концентрацию пероксидазы и альбумина, составившую 0.1 мг/мл, в рабочих растворах определяли спектрофотометрически: $\epsilon_{403} = 10 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для пероксидазы хрена [5] и $\epsilon_{279} = 43824 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для бычьего сывороточного альбумина [32, 33].

Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, Австралия). Собственную триптофановую флуоресценцию возбуждали светом длиной волны 297 нм [33], а совместную триптофановую и тирозиновую флуоресценцию измеряли при возбуждении светом с длиной волны 280 нм [34, 35]. Спектры кругового дихроизма регистрировали на дихрографе J-810 (Jasco Inc., США).

Статистическую обработку данных проводили на лицензионной программе Statistika 10 с помощью *t*-критерия Стьюдента.

ОБСУЖДЕНИЕ И РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании ферментативной реакции в модельной системе «*o*-дианизидин – пероксидаза хрена – H_2O_2 » установлено, что зависимость начальной скорости реакции пероксидазного окисления *o*-дианизидина от начальной концентрации пероксида водорода в средах с разным содержанием дейтерия (50 ppm и 150 ppm) имеет общий линейный характер при малых концентрациях перекиси водорода (от 0.01 до 0.1 мМ) и указывает в данном диапазоне концентраций окислителя на первый порядок ферментативной реакции. При дальнейшем увеличении концентрации субстрата окислителя (от 0.25 до 1 мМ) происходит выход

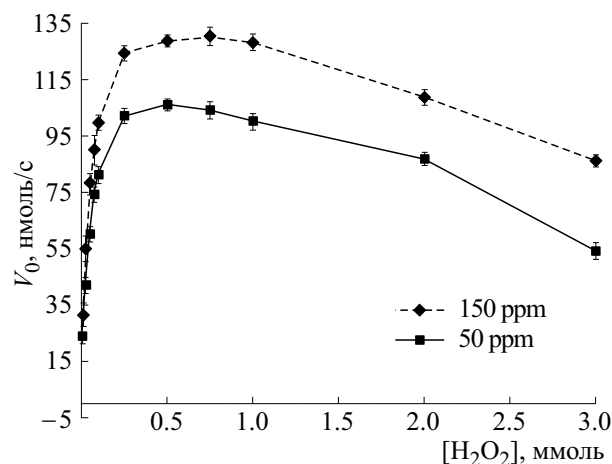


Рис. 1. Зависимости начальной скорости пероксидазного окисления *o*-дианизидина от начальной концентрации пероксида водорода ($M \pm m$) в среде с пониженным содержанием дейтерия (pH 7.5).

реакции на плато, где ее начальная скорость практически перестает зависеть от концентрации пероксида водорода (порядок ферментативной реакции становится нулевым). Таким образом, в диапазоне концентраций от 0.01 до 1 мМ данная ферментативная реакция описывается уравнением Михаэлиса–Ментен. При более высоких концентрациях H_2O_2 (больше 1 мМ) в средах с содержанием дейтерия 50 ppm и 150 ppm происходит ингибирование реакции пероксидазного окисления *o*-дианизидина пероксидом водорода. В среде, приготовленной на обедненной дейтерием воде, начальная скорость реакции достоверно меньше, чем в среде с концентрацией дейтерия 150 ppm, во всех исследуемых разведениях (рис. 1).

Линеаризацию проводили в двойных обратных координатах Лайнуивера–Берка и координатах Иди–Хофсти, поскольку при таких концентрациях окислителя ферментативная реакция описывается уравнением Михаэлиса–Ментен (рис. 2 и 3), по результатам построения были найдены максимальная скорость реакции и константа Михаэлиса (таблица).

Анализ полученных экспериментальных прямых в двух координатных системах показал, что максимальная скорость реакции пероксидазного окисления *o*-дианизидина пероксидом водорода была выше в среде, приготовленной на воде с природным содержанием дейтерия. Константа Михаэлиса, полученная в координатах Лайнуивера–Берка, была выше на 26% для ферментативной реакции, протекающей в обедненном дейтерием буфере. В координатах Иди–Хофсти данный показатель был больше на 20% в среде со сниженной концентрацией дейтерия, что указывает на меньшее сродство субстрата с ферментом

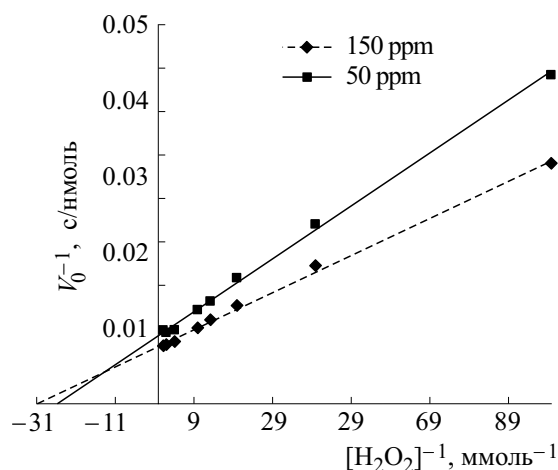


Рис. 2. Зависимости начальной скорости пероксидазного окисления *o*-дианизидина от начальной концентрации пероксида водорода в координатах Лайнуивера–Берка в среде с пониженным содержанием дейтерия (рН 7,5).

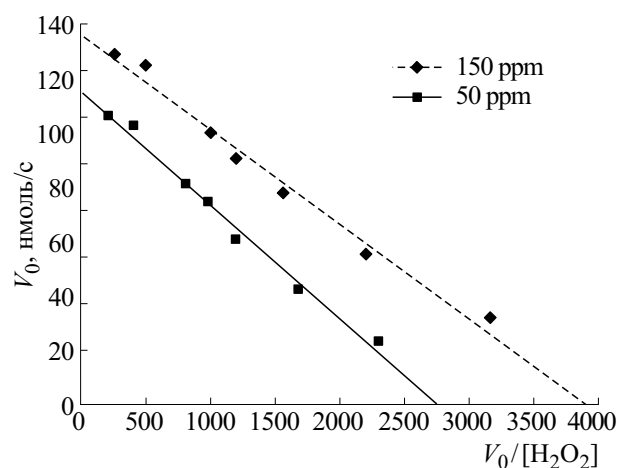


Рис. 3. Зависимости начальной скорости пероксидазного окисления *o*-дианизидина от начальной концентрации пероксида водорода в координатах Иди–Хофсти в среде с пониженным содержанием дейтерия (рН 7,5).

в данной модельной системе, когда содержание дейтерия в три раза меньше естественного.

Результаты исследования хемилюминесцентной реакции пероксидазного окисления люминола пероксидом водорода в модельной системе «люминол – пероксидаза хрена – H_2O_2 » с различным содержанием дейтерия представлены в таблице. Интегральный показатель свечения, а также тангенс угла наклона кривой нарастания были достоверно меньше ($p < 0.05$, рис. 4) в реакционной среде, приготовленной на воде с концентрацией дейтерия 50 ppm.

Данные кинетические параметры отражают интенсивность свечения, развиваемого в ходе пероксидазного окисления люминола. Интенсивность хемилюминесценции данной реакции пропорциональна скорости генерации радикалов люминола. Таким образом, уменьшение интенсивности хемилюминесценции при окислении люминола пероксидазой хрена в среде, приготовленной на обедненной дейтерием воде, можно объяснить снижением активности фермента в данных условиях реакции.

При оценке собственной триптофановой флуоресценции пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина установлено, что интенсивность флуоресценции альбумина была примерно в десять раз выше, чем у пероксидазы. Данные отличия вызваны различиями как в количестве триптофана в молекулах этих белков, так и в их микроокружении. Белок альбумин имеет два триптофановых остатка, один из них расположен интрамолекулярно, а другой – на поверхности молекулы. Взаимодействие поверхностного триптофана альбумина с молекулами растворителя приводит к смещению максимума длины волны испускания в длинноволновую область. Несмотря на то что в ферменте единственный триптофановый остаток расположен внутри гидрофобной части молекулы, его спектр флуоресценции также имеет длинноволновый максимум. Это вызвано ван-дер-ваальсовым взаимодействием между триптофаном и гемом фермента. Снижение концентрации дейтерия в растворителе не вызвало заметного сдвига максимума эмиссии в коротковолновую или длинноволновую область спектра. При нахождении белков в растворителе с концентрацией дейтерия

Показатели активности пероксидазы хрена в средах с разным содержанием дейтерия

2H среды, ppm	k_M (Л. – Б.), мм	k_M (Ид. – Х.), мм	V_{max} (Л. – Б.), нмоль/с	V_{max} (Ид. – Х.), нмоль/с	Светосумма, усл. ед.	$tg\alpha \cdot 10^{-4}$
150	0.026	0.035	131	136	3637 ± 49	53.0 ± 1.5
50	0.033	0.042	111	115	$2557 \pm 124^*$	$18.7 \pm 0.6^*$

Примечание. * – $p < 0.05$ к группе 150 ppm, данные представлены в виде $M \pm m$, «Л. – Б.» – координаты Лайнуивера–Берка, «Ид. – Х.» – координаты Иди–Хофсти.

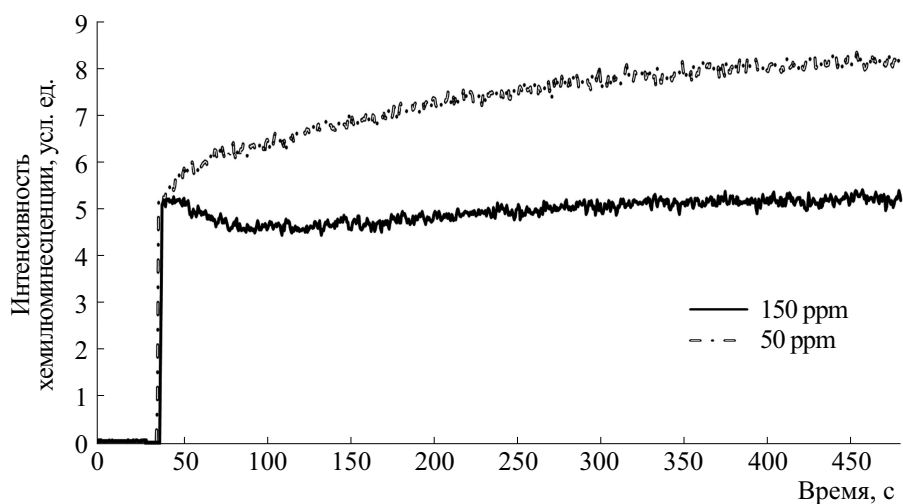


Рис. 4. Кинетические кривые хемилуминесцентной реакции окисления люминола пероксидазой хрена в среде с пониженным содержанием дейтерия.

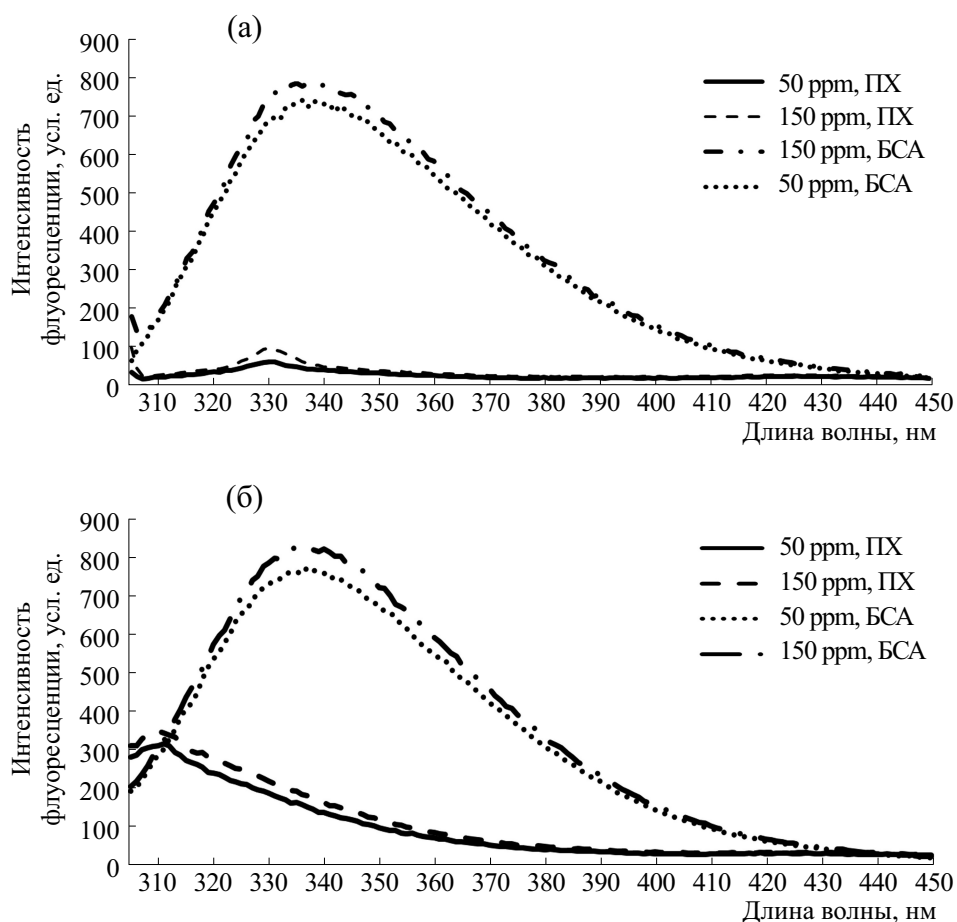


Рис. 5. Интенсивность флуоресценции бычьего сывороточного альбумина и пероксидазы хрена в среде с пониженным содержанием дейтерия (50 ppm): (а) – триптофановая флуоресценция (297 нм), (б) – триптофановая и тирозиновая флуоресценция (280 нм).

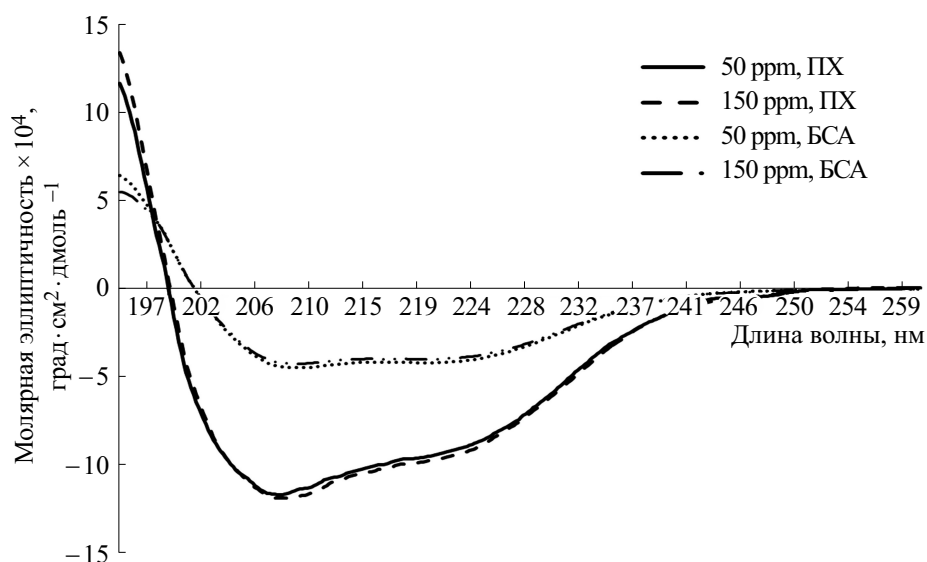


Рис. 6. Спектры кругового дихроизма (дальний ультрафиолетовый диапазон) пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина в среде с пониженным содержанием дейтерия.

50 ppm наблюдалось снижение интенсивности флуоресценции в обоих образцах (рис. 5а).

Особенности собственной триптофановой и тирозиновой флуоресценции могут быть обусловлены тем, что количество тирозина в альбумине составляет девятнадцать против семи в молекуле пероксидазы хрена. При возбуждении светом с длиной волны 280 нм интенсивность флуоресценции альбумина была примерно в два с половиной раза выше, чем в пероксидазе. Для альбумина интенсивность флуоресценции при длине возбуждения 280 и 297 нм практически не отличалась (разница не превышала 5%). Это может означать, что основной вклад в совместную флуоресценцию альбумина вносят остатки триптофана. В пероксидазе происходило резкое увеличение интенсивности флуоресценции при 280 нм. Таким образом, основной вклад в совместную флуоресценцию фермента вносят тирозиновые остатки. Максимум испускания для альбумина составил 335 нм, а для пероксидазы — 310 нм. Коротковолновый максимум флуоресценции у молекулы пероксидазы хрена связан, возможно, с гидрофобным окружением тирозиновых остатков. Среда с пониженным содержанием дейтерия не повлияла на положение максимумов в спектрах опытных белков, но при этом вызвала снижение интенсивности флуоресценции (рис. 5б).

Исследование спектров кругового дихроизма показало, что в далекой УФ-области для обоих белков имеются два минимума в области 207–220 нм. При этом для пероксидазы кривая пересекает нулевую линию в точке 199 нм, а для альбумина эта точка равна 201 нм. Спектры с такой амплиту-

дой и формой характерны для глобулярных белков с высокоупорядоченной вторичной структурой. Известно, что эллиптичность при 220 нм является мерой упорядоченности структуры белка. Амплитуда спектра пероксидазы в данной точке была в два с половиной раза больше, чем у альбумина, что говорит о большом содержании β -слоев во вторичной структуре альбумина (рис. 6). Необходимо отметить, что уменьшение концентрации дейтерия в растворителе не оказало влияния на вторичную структуру обоих белков.

Известно, что у альбумина основными тушителями триптофановой флуоресценции являются молекулы растворителя (воды), а также тирозиновые остатки за счет переноса энергии по диполь-дипольному механизму. В то же время у молекулы пероксидазы хрена основным акцептором энергии триптофана и тирозина является простетическая группа (гем). Также безизлучательный перенос энергии с этих хромофоров возможен за счет их ферстеровского взаимодействия между собой.

Можно предположить, что тушение собственной тирозиновой и триптофановой флуоресценции в среде с пониженным содержанием дейтерия происходит по одному из вышеуказанных механизмов. Однако спектрометрия кругового дихроизма не показала заметного изменения во взаимном расположении молекулярных структур «гем–триптофан» в пероксидазе и «триптофан–тирозин» в обоих белках. Также не наблюдался сдвиг максимумов спектров испускания в обоих белках при изменении концентрации дейтерия в растворителе, что указывает на постоянное окружение хромофоров. Известно, что атомы водоро-

да, связанные с атомами, имеющими свободную пару электронов, как правило, претерпевают быстрый обмен с другими атомами водорода. Помещение биополимеров в среду с измененным по дейтерию изотопным составом приводит к изменению соотношения $^2\text{H}/^1\text{H}$ в их составе. Так, в водных растворах белков изотопный обмен $^2\text{H}/^1\text{H}$ происходит быстро в атомах водорода, связанных с атомами азота, серы или кислорода, в то время как атомы водорода, связанные с углеродом практически не подвержены изотопному обмену. Изотопное замещение дейтерия на протий протекает с минимальной скоростью в экранированных гидрофобных участках молекулы, а также в составе пептидных групп, испытывающих сферическое затруднение. Напротив, $^2\text{H}/^1\text{H}$ -обмен происходит с высокой интенсивностью в функциональных группах, активно взаимодействующих с растворителем. Вероятно, при растворении исследуемых белков в среде с пониженным содержанием дейтерия происходит локальное замещение атомов дейтерия на протий в поверхностной структуре белка, контактирующей с гидратной оболочкой. Такое замещение приводит к уменьшению энергии водородной связи между функциональными группами аминокислотных остатков с молекулами воды. Возможно, в результате ослабления водородных связей с молекулами растворителя амплитуда колебаний боковых групп аминокислот, смотрящих в гидрофильную область, увеличивается. В литературе имеются данные, что в белках тушение собственной флуоресценции может происходить за счет функциональных групп соседних аминокислотных остатков [34]. Можно предположить, что усиление подвижности соседних аминокислотных радикалов, окружающих тирозиновые и триптофановые остатки, находящиеся вблизи поверхности белка, приводит к возрастанию вероятности переноса энергии с хромофоров на функциональные группы соседних акцепторов.

Таким образом, проведенные оптические исследования структуры пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина показали, что среда с пониженным содержанием дейтерия не оказывает влияния на вторичную структуру данных белков и не вызывает конформационных изменений в структуре фермента, затрагивающих его активный центр. Возможные локальные изменения в поверхностной структуре белка, вызванные изотопным замещением дейтерия на протий, вероятно, не могут стать причиной уменьшения ферментативной активности, наблюдаемой нами в двух исследованных модельных системах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-44-233005) и Государственного задания ЮНЦ РАН (№ АААА-А19-119040390083-6).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. L. Schmidt, R. J. Robins, and R. A. Werner, *Isotopes in Environmental and Health Studies* **51** (1), 155 (2015).
2. M. I. Bykov, S. S. Dzhimak, A. A. Basov, et al., *Voprosy Pitaniia* **84** (4), 89 (2015).
3. D. I. Nikitin, M. N. Oranskaya, and V. I. Lobyshev, *Biophysics* **48** (4), 636 (2003).
4. А. А. Киркина, В. И. Лобышев, О. Д. Лопина и др., *Биофизика* **59** (2), 399 (2014).
5. A. A. Samkov, S. S. Dzhimak, M. G. Barishev, et al., *Biophysics* **60** (1), 107 (2015).
6. V. I. Lobyshev and L. P. Kalinichenko, *Isotopic effects of D_2O in biological systems* (Nauka, M., 1978).
7. A. Basov, L. Fedulova, E. Vasilevskaya, and S. Dzhimak, *Molecules* **24** (22), 4101 (2019). DOI: 10.3390/molecules24224101.
8. А. В. Косенков, М. В. Гуляев, В. И. Лобышев и др., *Биофизика* **63** (5), 1021 (2018).
9. S. Rodin, P. Rebellato, A. Lundin, et al., *Sci. Rep.* **8** (1), e16249 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-34704-0.
10. A. A. Kravtsov, S. V. Kozin, and E. R. Vasilevskaya, *J. Pharmacy & Nutrition Sci.* **8** (2), 42 (2018). DOI: 10.6000/1927-5951.2018.08.02.3.
11. A. Basov, L. Fedulova, M. Baryshev, et al., *Nutrients* **11** (8), 1903 (2019). DOI: 10.3390/nu11081903.
12. С. В. Козин, А. А. Кравцов, А. А. Елкина и др., *Биофизика* **64** (2), 362 (2019).
13. A. A. Basov, A. A. Elkina, A. A. Samkov, et al., *Iranian Biomed. J.* **23** (2), 129 (2019). DOI: 10.29252/23.2.129.
14. A. Rasooli, F. Fatemi, R. Hajhosseini, et al., *Pharmaceut. Biol.* **57** (1), 125 (2019). DOI: 10.1080/13880209.2018.1563622.
15. K. Yavari and L. Kooshesh, *Nutrition and Cancer* **71** (6), 1019 (2019). DOI: 10.1080/01635581.2019.1595048.

16. I. M. Chernukha, L. V. Fedulova, E. A. Kotenkova, et al., *Voprosy Pitaniia* **85** (5), 36 (2016).
17. S. S. Dzhimak, A. A. Basov, A. A. Elkina, et al., *Jundishapur J. Natural Pharmaceut. Products* **13** (2), e69557 (2018). DOI: 10.5812/jjnpp.69557.
18. A. A. Basov, S. V. Kozin, I. M. Vikov, et al., *Biol. Bull.* **46** (6), 531 (2019). DOI: 10.1134/S1062359019060049.
19. О. Ю. Зрелов, А. В. Сыроешкин, Е. В. Успенская и др., *Хим.-фармацевт. журн.* **49** (6), 51 (2015).
20. В. В. Гончарук, В. Б. Лапшин, Т. Н. Бурдейная и др., *Химия и технология воды* **33** (1), 15 (2011).
21. A. V. Syroeshkin, N. V. Antipova, A. V. Zlatska, et al., *J. Trace Elements Med. Biol.* **50**, 629 (2018).
22. X. Zhang, M. Gaetani, A. Chernobrovkin, et al., *Mol. Cell Proteomics* **18** (12) 2373 (2019). DOI: 10.1074/mcp.RA119.001455.
23. М. Г. Барышев, С. Н. Болотин и С. С. Джимама, *Наука Кубани* **3**, 18 (2010).
24. М. Г. Барышев, С. Н. Болотин, В. Ю. Фролов и др., *Экол. вестн. науч. центров ЧЭС*, № 1, 13 (2013).
25. I. S. Petriev, S. N. Bolotin, V. Y. Frolov, et al., *Bull. Rus. Acad. Sci.* **82** (7), 807 (2018).
26. О. В. Лебедева, Н. Н. Угарова и И. В. Березин, *Биохимия* **42**, 1372 (1977).
27. N. V. Yaglova, D. A. Tsomartova, S. S. Obernikhin, et al., *Biol. Bull.* **46** (1), 74 (2019). DOI: 10.1134/S1062359018060122.
28. Д. Ю. Измайлов, Е. В. Проскурина, С. А. Шишканов и др., *Биофизика* **62** (4), (2017).
29. В. В. Рогожин, Г. Д. Кутузова и Н. Н. Угарова, *Биоорганическая химия* **26** (2), 156 (2000).
30. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурина, *Успехи биол. химии* **49**, 341 (2009).
31. А. М. Поляничко, Н. В. Михайлов, Н. М. Романов и др., *Цитология* **58** (9), 707 (2016).
32. L. M. Danilenko, *Research Res. Pharmacol.* **4** (1), 81 (2018).
33. О. В. Степаненко, И. М. Кузнецова, К. К. Турове-ров и др., *Цитология* **47** (11), 988 (2005).
34. N. V. Yaglova, S. S. Obernikhin, D. A. Tsomartova, et al., *Bull. Experim. Biol. Med.* **165** (4), 508 (2018). DOI: 10.1007/s10517-018-4205-8.
35. J. A. Ross, W. R. Laws, and K. W. Rouslang, *Topics in fluorescence in spectroscopy* (Springer US, 2002).

Change of Functional Activity of Horseradish Peroxidase and Bovine Serum Albumin in Media with Various Isotopic $^2\text{H}/^1\text{H}$ Composition

S.V. Kozin^{*, **}, A.A. Kravtsov^{*, **}, K.K. Turoverov^{***}, A.V. Fonin^{***}, E.V. Chihirzhina^{***}, V.V. Malyshko^{**}, ^{****}, A.V. Moiseev^{*****}, and A.V. Churkina^{*}

^{*}Kuban State University, Stavropolskaya ul. 149, Krasnodar, 350040 Russia

^{**}Southern Scientific Center, Russian Academy of Sciences, prosp. Chekhova 41, Rostov-on-Don, 344006 Russia

^{***}Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretsky prosp. 4, St. Petersburg, 194064 Russia

^{****}Kuban State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Sedina 4, Krasnodar, 350063 Russia

^{*****}Kuban State Agrarian University, ul. Kalinina 13, Krasnodar, 350004 Russia

Experiments have revealed that the medium with reduced deuterium content has no effect on the secondary structure of horseradish peroxidase and bovine serum albumin and no conformational changes occur in the structure of these proteins. The addition of these proteins into the buffer solution prepared on deuterium-depleted water led to a decrease in the intensity of intrinsic tryptophan fluorescence, while the circular dichroism spectra remained virtually unchanged. At lower deuterium content in the reaction medium, there was a decrease in the activity of the peroxidase oxidation reaction of o-dianisidine and luminol with hydrogen peroxide.

Keywords: deuterium, protium, isotopic metabolism, horseradish peroxidase, bovine serum albumin, intrinsic tryptophan fluorescence, circular dichroism spectroscopy, reaction kinetics