

## ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЯ РАЗМЕРОВ И УДЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МОЛЕКУЛ КОЛЛАГЕНАЗЫ ИЗ *CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM* ПОСЛЕ УФ-ОБЛУЧЕНИЯ

С. М. Панкова<sup>1,2</sup>, Ф. А. Сакибаев<sup>1</sup>, А. Н. Дубовицкая, М. Г. Холявка<sup>1,3</sup>, В. Г. Артюхов<sup>1</sup>

1 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

2 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко»

3 – ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

Поступила в редакцию 02.09.2021 г.

**Аннотация.** Лекарственные средства на основе ферментов используются в разных областях современной медицины, фармакологии и косметологии. Для коррекции патологических рубцов кожи в настоящее время активно применяются ферментные препараты коллагеназы, обеспечивающие гидролиз коллагена в рубцовоизмененных тканях с последующим восстановлением нормального состава эпидермиса и структуры внеклеточного матрикса. Коллагеназа (КФ 3.4.24.7) – протеолитический фермент семейства матриксных металлопротеаз, обладающая эстеразной и протеазной активностями.

В современной медицине находят применение комплексные подходы к лечению гнойно-некротических процессов в коже, например, энзимная терапия в сочетании с УФ-облучением. Действие УФ-излучения на кожные покровы складывается из гуморального и нервно-рефлекторного влияния на обменные процессы. Энергия УФ-света, поглощенная белками, главным образом, коллагеном эпидермиса, вызывает возбуждение их атомов, переход электронов на более высокий энергетический уровень. Эти процессы приводят к перегруппировке атомов и молекул в новое физическое состояние, при котором увеличивается способность клеток к фотохимическим реакциям.

В данной работе была изучена динамика изменения размеров глобулы и удельной активности коллагеназы после УФ-облучения в диапазоне доз 151-6040 Дж/м<sup>2</sup>. Количество белка в образцах измеряли с помощью метода Лоури, их каталитическую активность определяли по скорости гидролиза субстрата – бычьего сывороточного альбумина. Процесс УФ-облучения происходил при непрерывном перемешивании раствора магнитной мешалкой с помощью ртутно-кварцевой лампы в течение 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40 минут. Размеры молекул нативной и облученной коллагеназы измеряли на приборе Nano Zetasizer ZS.

Анализ всех исследуемых растворов (облученной и необлученной) коллагеназы показал поочередное преобладание молекул нативного фермента и продуктов его автолиза. Воздействие дозой 3020 Дж/м<sup>2</sup> привело к увеличению числа частиц, соответствующих нативной молекуле, до 20 %, также при данной дозе зарегистрирован рост количества продуктов автолиза до 18 %. Количество агрегатов энзима снизилось в ~ 5 раз по сравнению с необлученным образцом при применении максимальной из исследуемых нами доз УФ-света – 6040 Дж/м<sup>2</sup>. Снижение каталитической активности коллагеназы на ~ 9 % зарегистрировано только при использовании дозы УФ-облучения 3020 Дж/м<sup>2</sup>.

**Ключевые слова:** коллагеназа, УФ-свет, продукты автолиза, агрегация

Проблема подбора материалов для лечения ран и очистки их от омертвевших тканей в настоящее время является актуальной и нерешенной. Терапия гнойно-некротических процессов наиболее эффективна, если обеспечивается удаление нежизнеспособных тканей, а также подавление развития микрофлоры в очаге воспаления. В этом случае ре-

паративные процессы завершаются раньше, сохраняется физиологическая подвижность тканей. Для удаления некротических тканей из ран и устранения косметических дефектов в настоящее время используют многочисленные ферментные препараты микробного, растительного и животного происхождения. Действие таких средств основывается на способности энзимов растворять внеклеточный матрикс. Наиболее широко используемые

© Панкова С. М., Сакибаев Ф. А., Дубовицкая А. Н., Холявка М. Г., Артюхов В. Г., 2021

ферментные препараты – «Лидаза», «Ронидаза», «Лонгидаза» [1, 2]. При введении в рубцовую ткань они оказывают своеобразный «разрыхляющий» эффект, что способствует проникновению в рубец лекарственных веществ. Недостатком данных препаратов является то, что их действие не направлено на гидролиз фибриллярных белков, поэтому более целесообразно применять средства, обладающие коллагенолитической активностью, такие как «Террилитин», «Морикраза», «Коллализин», «Коллагеназа», «Коллагеназа-КК» и «Ферменкол» [1-5].

Бактериальная коллагеназа, выделенная из *Clostridium histolyticum* (КФ 3.4.24.7), – протеолитический фермент, относящийся к семейству матриксных металлопротеаз, обладающий протеазным и эстеразным видами активности. Молекулярная масса клостридиальных коллагеназ составляет 68-130 кДа. Значения изоэлектрической точки коллагеназ попадают в диапазон 5.3-6.2 единиц pH [6-8]. Вследствие уникальности структуры коллагена, в коллагенолитических протеазах необходимо наличие коллаген-связывающего сайта. Коллагеназа из *C. histolyticum* взаимодействует с тройной спиралью коллагена и раскручивает  $\alpha$ -цепи молекулы, расщепляя их до смеси небольших пептидов. Гидролиз с помощью металлопротеаз в основном происходит между пептидной связью аминокислотного остатка и участком Gly-Pro. Клостридиальные коллагеназы содержат атомы кальция, которые, вероятно, необходимы для стабилизации структуры белка [9, 10]. В медицине бактериальная коллагеназа используется для удаления некротических тканей из ран, лечения заболеваний глаз в офтальмологии, ускорения рассасывания швов из кетгута и расщепления переродившейся рубцовой ткани сухожилий при болезни Дюпюитрена [11, 12].

В качестве антимикробного и ранозаживляющего агента, помимо коллагеназы, может выступать ультрафиолетовое излучение. Бактерицидное, обеззараживающее действие УФ-лучей используется для лечения гнойных ран, а также широко применяется для дезинфекции помещений и хирургических инструментов [13-15].

В связи с этим целью работы было исследовать динамику изменения размеров и удельной активности молекул коллагеназы из *Clostridium histolyticum* после УФ-облучения ее растворов в диапазоне доз 151-6040 Дж/м<sup>2</sup>.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования была выбрана коллагеназа из *Clostridium histolyticum* фирмы «Sigma-Aldrich», субстратом для гидролиза слу-

жил бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы «Sigma-Aldrich».

Определение количества белка в образцах проводили методом Лоури [16]. При выявлении каталитической активности препаратов применяли метод Лоури, но с модификацией – без добавления в реакционную среду сульфата меди [17, 18].

Процесс УФ-облучения происходил при непрерывном перемешивании раствора в объеме 4 мл (толщина слоя в середине кюветы 7 мм) магнитной мешалкой в круглодонной термостатируемой кювете (20±1 °С) с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240-390 нм в течение 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40 минут. Доза облучения составляла соответственно 151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м<sup>2</sup>.

Размеры молекул нативной и облученной коллагеназы измеряли на приборе Nano Zetasizer ZS (Malvern Instruments). Обратный рассеянный свет от He/Ne-лазера мощностью 4 мВт (632.8 нм) собирали под углом 173° при температуре 25 °С [19]. Было выделено 3 группы частиц с диаметром: 1) меньшим, чем размер нативной коллагеназы (частицы, составляющие эту группу возникли, вероятно, в результате автолиза); 2) соответствующим нативной молекуле коллагеназы; 3) превосходящим таковой для коллагеназы и, таким образом, соответствующим агрегатам ее молекул (ди-, тетра-, октамерам и агрегатам, превышающим размер октамера). За диаметр нативной коллагеназы принимали диапазон между 5 и 10 нм, полученный на основе модели пространственной структуры фермента [20]. Для каждой из названных размерных групп было рассчитано среднее значение количества частиц, на основе которого были построены зависимости данного показателя от дозы облучения и времени инкубации образцов после облучения в 50 мМ трис-HCl буфере с pH 7.5 при температуре 25 °С.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при уровне значимости 5 % с использованием t-критерия Стьюдента. Все экспериментальные исследования осуществляли минимум в 8-кратной повторности.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При УФ-облучении коллагеназы в дозах 151, 453, 755 и 1510 Дж/м<sup>2</sup> изменение удельной протеолитической активности фермента не зарегистрировано, энзим сохранял свои каталитические свойства на относительно постоянном (первоначальном) уровне. Снижение каталитической спо-

способности препарата (на ~ 9 %) происходило только после воздействия дозой 3020 Дж/м<sup>2</sup> (рис. 1).

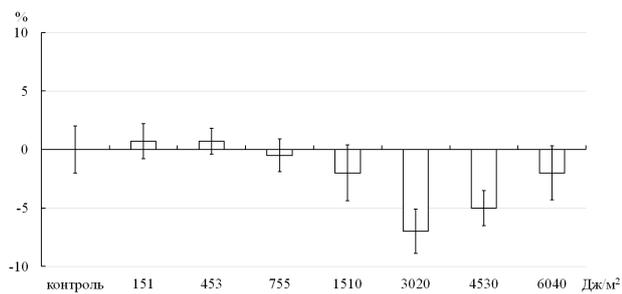


Рис. 1. Влияние УФ-излучения в дозах 151-6040 Дж/м<sup>2</sup> на изменение (в процентах) удельной активности коллагеназы

При инкубации растворов необлученной и облученной различными дозами УФ-излучения (151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м<sup>2</sup>) коллагеназы наблюдалась высокая дисперсия в значениях количества частиц всех размерных групп.

Анализ растворов облученной и необлученной коллагеназы показал поочередное преобладание частиц, соответствующих по размеру нативному ферменту и продуктам его автолиза (рис. 2, 3). В данном случае частицы, размер которых составил

5-10 нм, могут также являться агрегатами продуктов автолиза. При использовании доз облучения 151-1510 Дж/м<sup>2</sup> среднее количество частиц, соответствующих по размеру нативной коллагеназы и продуктам автолиза, находилось в пределах 10-14 %. Воздействие дозой 3020 Дж/м<sup>2</sup> приводило к увеличению числа частиц размером 5-10 нм до 20 %, также при данной дозе зарегистрирован рост количества продуктов автолиза до 18 %. После облучения дозами 4530 и 6040 Дж/м<sup>2</sup> процент частиц, соответствующих по размеру нативной коллагеназы, снизился до 12 %. Количество агрегатов энзима при использовании доз 151-1510 Дж/м<sup>2</sup> увеличилось в ~ 2.5 раза, а применение максимальной дозы (6040 Дж/м<sup>2</sup>) привело к снижению их числа в ~ 5 раз по сравнению с необлученным образцом (рис. 4).

Увеличение величины дисперсии числа частиц всех трех групп в растворе (рис. 5), вероятно, свидетельствует о снижении стабильности самой коллагеназы, ее надмолекулярных комплексов и продуктов автолиза при повышении дозы облучения. На рис. 6 видно, что максимальное количество агрегатов в системе уменьшается с увеличением дозы облучения, особенно после

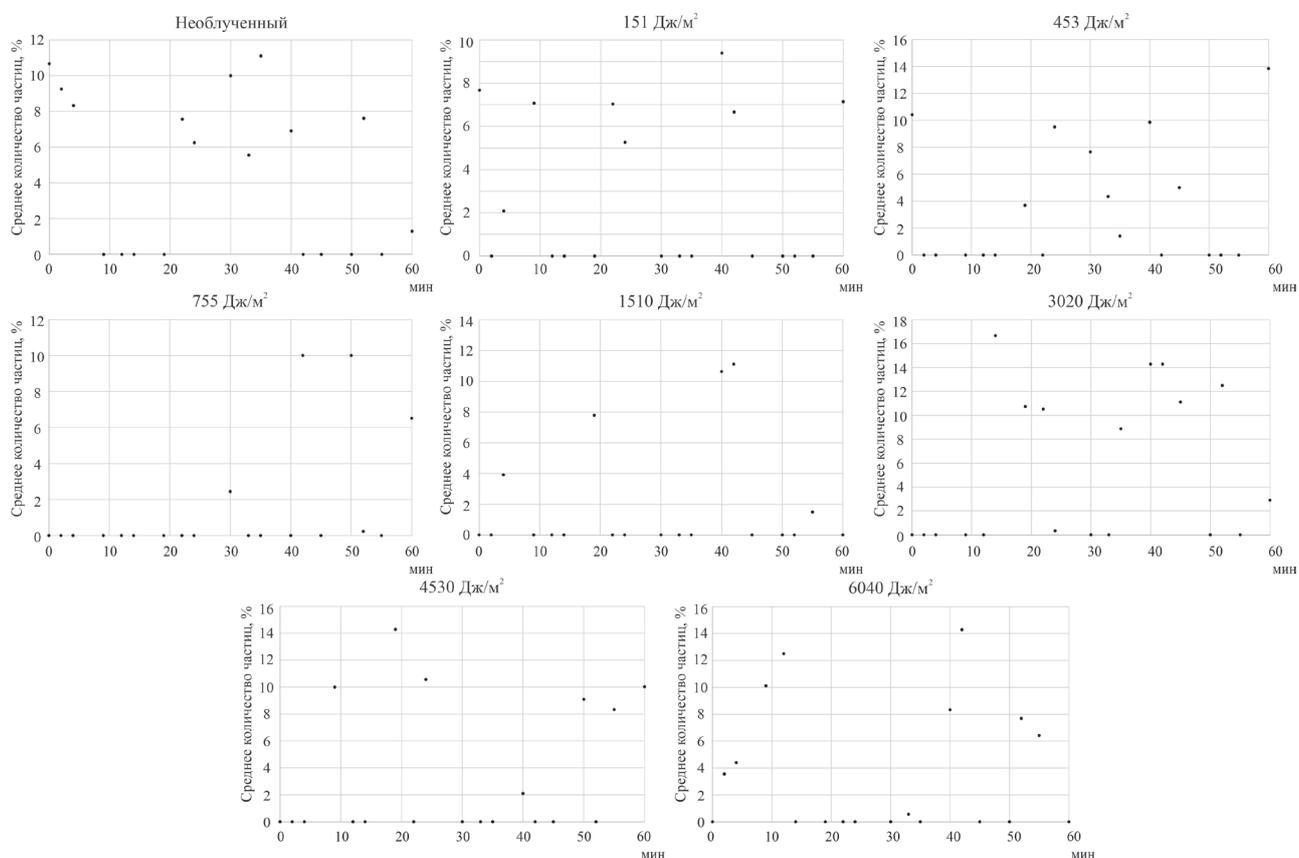


Рис. 2. Количество частиц, соответствующих по размеру продуктам автолиза коллагеназы (%), после УФ-облучения дозами 151-6040 Дж/м<sup>2</sup> в 50 мМ трис-HCl буфере с pH 7.5 и последующей инкубации в течение часа при 25 °С

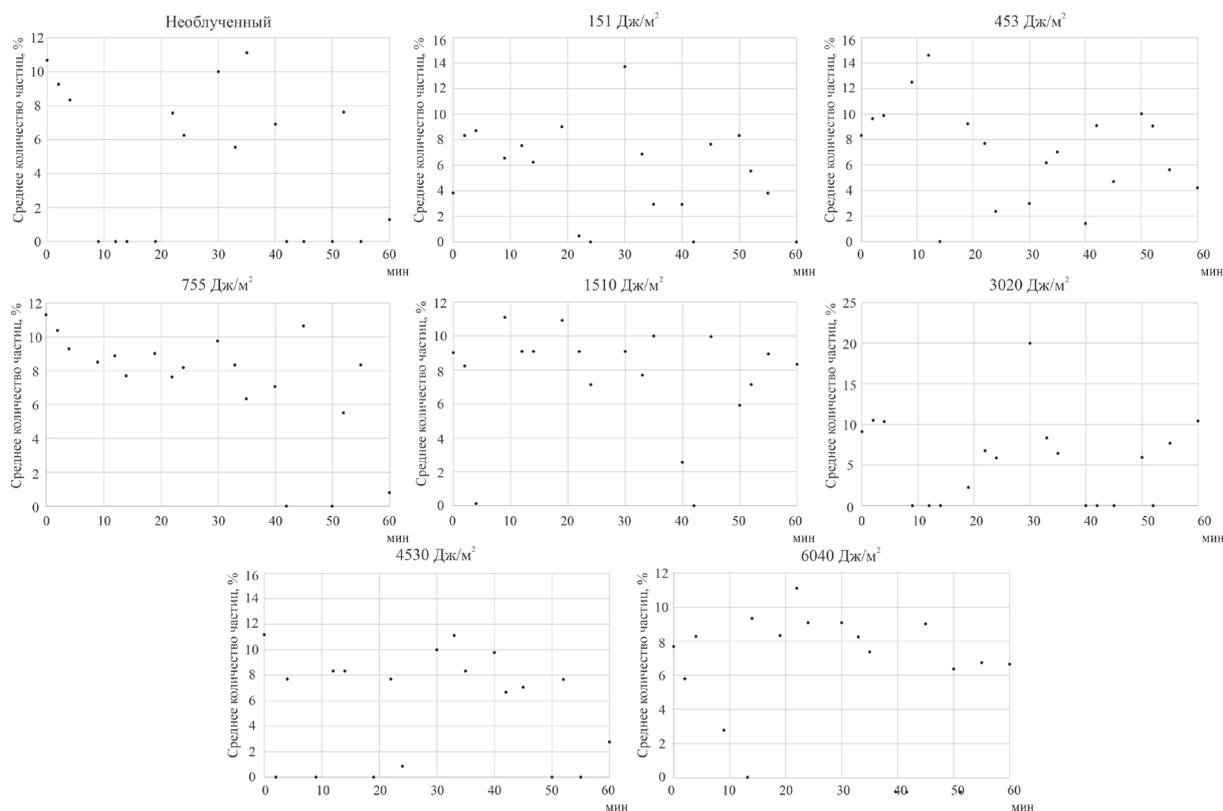


Рис. 3. Количество частиц, соответствующих по размеру молекуле нативной коллагеназы (%), после УФ-облучения дозами 151-6040 Дж/м<sup>2</sup> в 50 мМ трис-HCL буфере с рН 7.5 и последующей инкубации в течение часа при 25 °С

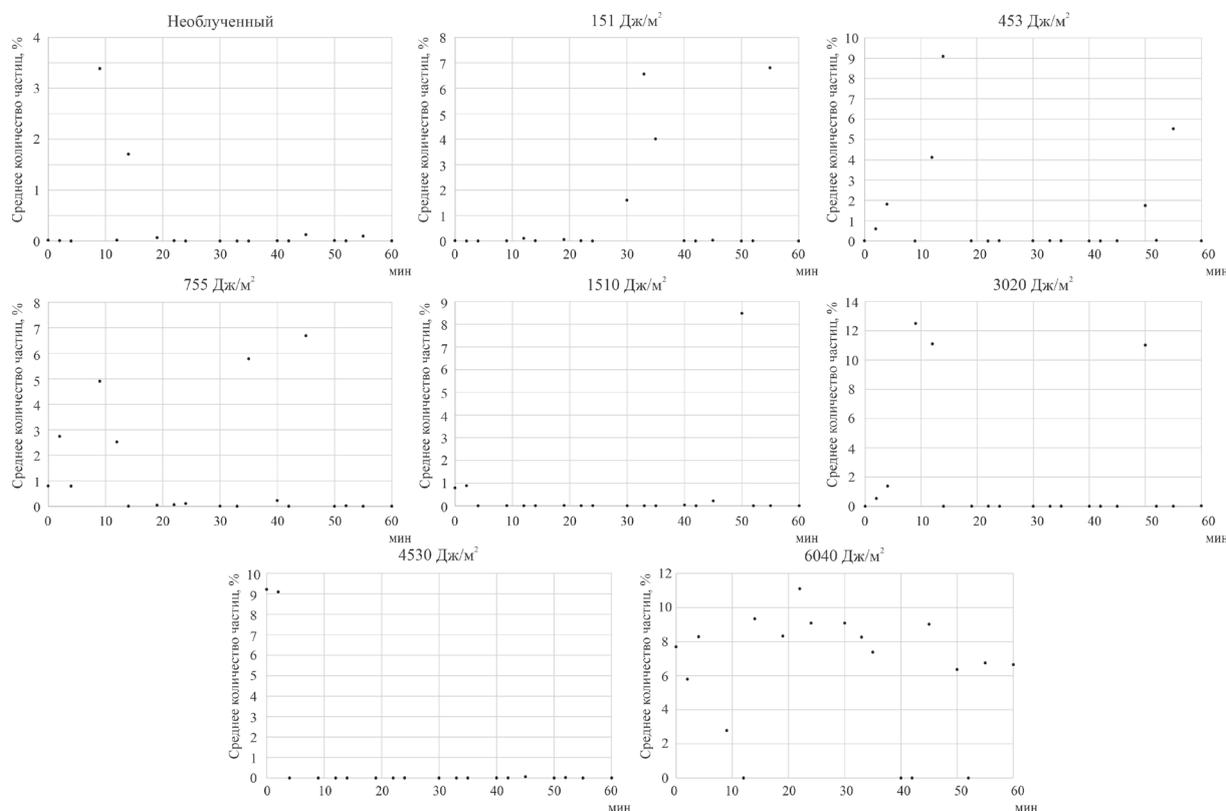


Рис. 4. Количество частиц, соответствующих по размеру агрегатам коллагеназы (%), после УФ-облучения дозами 151-6040 Дж/м<sup>2</sup> в 50 мМ трис-HCL буфере с рН 7.5 и последующей инкубации в течение часа при 25 °С

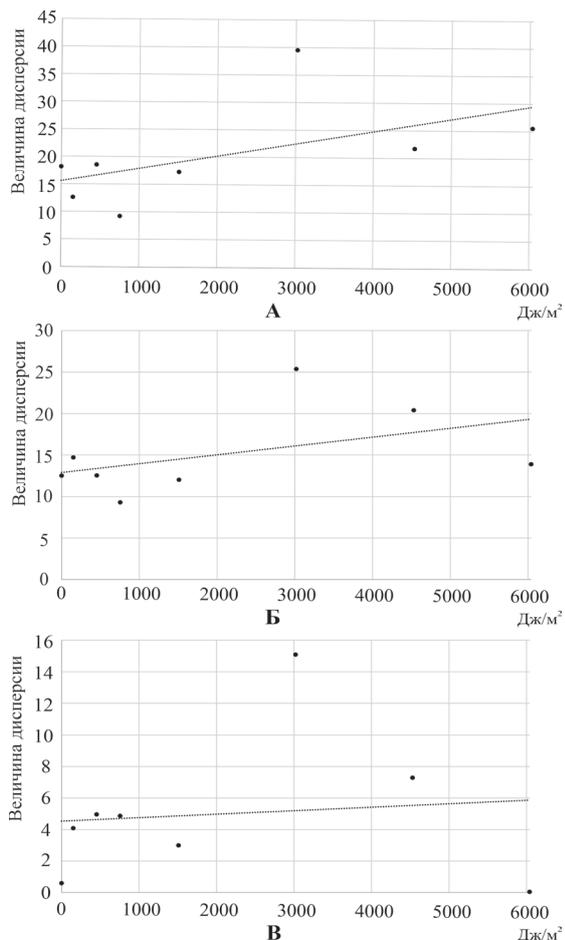


Рис. 5. Зависимость дисперсии размеров частиц, соответствующих продуктам автолиза (А), молекуле нативной коллагеназы (Б) и её агрегатам (В) от дозы облучения

использования дозы 3020 Дж/м<sup>2</sup> и выше, что может указывать на значительное снижение их стабильности при высоких дозах УФ-света.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ всех исследуемых растворов (облученной в диапазоне доз 151-6040 Дж/м<sup>2</sup> и необлученной) коллагеназы показал поочередное преобладание в них частиц, соответствующих по размеру 5-10 нм (т.е. нативному ферменту) и продуктам его автолиза. Параллельно было выявлено увеличение величины дисперсии числа всех частиц в системе: молекул коллагеназы, ее агрегатов и продуктов автолиза.

После облучения коллагеназы дозой 3020 Дж/м<sup>2</sup> зарегистрированы: 1) снижение ее удельной протеолитической активности на ~ 9 %, 2) увеличение числа частиц, соответствующих нативной молекуле фермента, до 20 %, 3) рост количества продуктов автолиза до 18 %. При этом анализ динамики изменения размеров частиц в растворе показал снижение способности коллагеназы образовывать надмолекулярные комплексы с дальнейшим возрастанием дозы ее облучения УФ-светом.

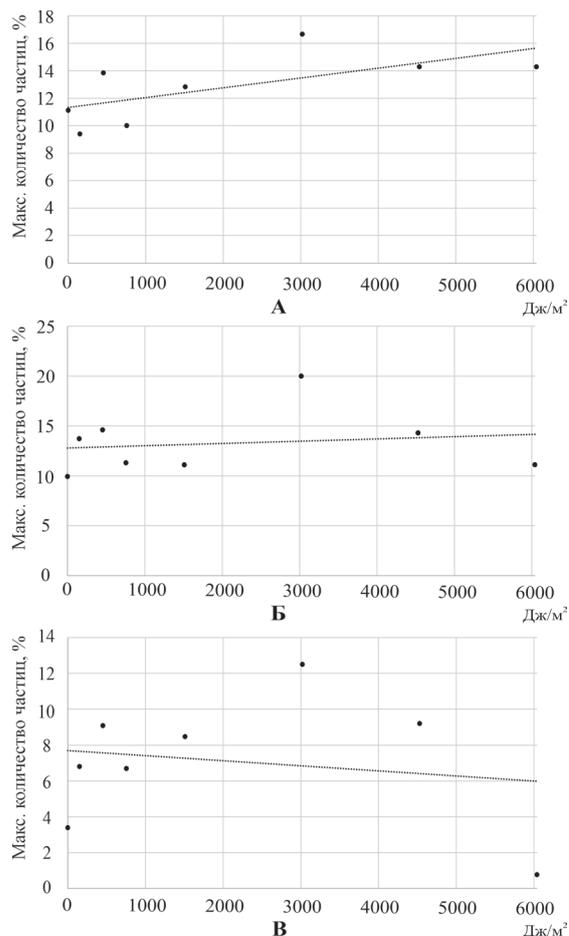


Рис. 6. Зависимость максимального числа частиц, соответствующих продуктам автолиза (А), молекуле нативной коллагеназы (Б) и её агрегатам (В) от дозы облучения

кулярные комплексы с дальнейшим возрастанием дозы ее облучения УФ-светом.

*Работа выполнена при финансовой поддержке в форме гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук МД-1982.2020.4. Соглашение 075-15-2020-325.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Парамонов Б.А., Турковский И.И., Антонов С.Ф., Климова О.В., Семенов Д.П., Бондарев С.В. // Вестник эстетической медицины. 2009. Т. 8. № 2. С. 24-29.
2. Сергеева И.А., Хитрина К.А., Крот А.Р., Сукнева А.В., Петрова Г.П. // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2017. Т. 17. № 3. С. 171-178.
3. Федосов П.А., Сливкин А.И., Николаевский В.А., Бузлама А.В. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2015. № 4. С. 141-144.
4. Никогосян А.Р., Тейхриб С.С. // Аллея науки. 2019. Т. 2. № 4 (31). С. 89-92.

5. Локарев А.В., Огай М.А., Степанова Э.Ф., Морозов Ю.А., Нам Н.Л., Сливкин А.И., Беленова А.С. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2020. № 2. С. 115-122.
6. Duarte A.S., Correia A., Esteves A.C. // Critical Reviews in Microbiology. 2016. V. 42. №. 1. P. 106-126.
7. Smeraglia F., Del Buono A., Maffulli N. // British medical bulletin. 2016. V. 118. №. 1. P. 157-166.
8. Van Wart H.E. // Handbook of proteolytic enzymes. 3rd Edn. Academic Press. 2013. V.1. P. 607-611.
9. Watanabe K. // Applied microbiology and biotechnology. 2004. V. 63. №. 5. P. 520-526.
10. Панкова С.М., Сакибаев Ф.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. // Химико-фармацевтический журнал. 2021. Т. 55. № 5. P. 42-47.
11. Hay D.C., Louie D.L., Earp B.E., Kaplan F.T., Akelman E., Blazar P. E. // Hand Surg. Eur. 2014. V. 39, № 5. P. 463-465.
12. Syed F., Thomas A.N., Singh S., Kolluru V., Emeigh Hart S.H., Bayat A. // PLoS ONE. 2012. V. 7. P. 42
13. Grimes D. R. // Medical Physics. 2015. № 1. P. 440-455.
14. Панкова С.М., Сакибаев Ф.А., Беляева Т.Н., Дубовицкая А.Н., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. // Актуальная биотехнология. 2020. № 3 (34). С. 346.
15. Холявка М.Г., Панкова С.М., Вышкворкина Ю.М., Лукин А.Н., Артюхов В.Г. // Радиационная биология. Радиозоология. 2019. Т. 59. № 1. С. 63-67.
16. Folin O., Ciocalteu V. // J. Biol. Chem. 1951. V 73. P. 627-650.
17. Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. // Биофарм. журн. 2015. № 2. С. 13-16.
18. Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Беленова А.С. // Вестн. ВГУ. Серия: "Химия. Биология. Фармация". 2013. № 2. С. 116-119.
19. Kharat S.J. // Journal of Molecular Liquids. 2008. V. 140. P. 10-14.
20. Eckhard U., Schönauer E., Brandstetter H. // Journal of Biological Chemistry. 2013. V. 288(28). P. 20184-20194.

*Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко*

*\*Панкова С. М., ассистент кафедры нормальной физиологии, м.н.с. кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета*

*E-mail: sazykina.93@mail.ru*

*Воронежский государственный университет  
Сакибаев Ф. А., аспирант кафедры биофизики  
и биотехнологии*

*E-mail: farkhatlukum@gmail.com*

*Дубовицкая А.Н., студент кафедры биофизики  
и биотехнологии*

*E-mail: a.n.dubovitskaya@mail.ru*

*Холявка М. Г., д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии; профессор кафедры «Физика», Севастопольский государственный университет*

*E-mail: holyavka@rambler.ru*

*Артюхов В. Г., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии*

*E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

*Voronezh State Medical University N.N. Burdenko  
\*Pankova S. M., Assistant Professor, Department of Normal Physiology, junior researcher Department of Biophysics and Biotechnology of Voronezh State University*

*E-mail: sazykina.93@mail.ru*

*Voronezh State University  
Sakibaev F. A., post-graduate student, Department of Biophysics and Biotechnology*

*E-mail: farkhatlukum@gmail.com*

*Dubovitskaya A. N., student of the Department of Biophysics and Biotechnology*

*E-mail: a.n.dubovitskaya@mail.ru*

*Holyavka M. G., PhD., DSci., Full Professor, Biophysics and Biotechnology Department; Full Professor of Physics Department, Sevastopol State University*

*E-mail: holyavka@rambler.ru*

*Artyukhov V. G., PhD., DSci., Full Professor, Head of the Department of Biophysics and Biotechnology*

*E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

## STUDY OF DYNAMICS OF SIZE CHANGE AND SPECIFIC ACTIVITY OF COLLAGENASE MOLECULES FROM *CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM* AFTER UV IRRADIATION

S. M. Pankova<sup>1,2</sup>, F. A. Sakibaev<sup>1</sup>, A. N. Dubovitskaya<sup>1</sup>, M. G. Holyavka<sup>1,3</sup>, V. G. Artyukhov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Voronezh State University

<sup>2</sup>Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko

<sup>3</sup>Sevastopol State University

**Abstract.** Enzyme-based medicines are used in various fields of modern medicine, pharmacology and cosmetology. For the treatment of pathological scars of the skin, collagenase enzyme preparations are currently actively used, which provide hydrolysis of collagen in cicatricial tissues with subsequent restoration of the normal composition of the epidermis and the structure of the extracellular matrix. Collagenase (EC 3.4.24.7) is a proteolytic enzyme of the matrix metalloprotease family with esterase and protease activities.

In modern medicine, complex approaches are used to treat purulent-necrotic processes in the skin, for example, enzyme therapy in combination with UV irradiation. The effect of UV radiation on the skin consists of humoral and neuro-reflex influences on metabolic processes. The energy of UV light absorbed by proteins, mainly the collagen of the epidermis, causes the excitation of their atoms, the transition of electrons to a higher energy level. These processes lead to the rearrangement of atoms and molecules into a new physical state, in which the ability of cells to photochemical reactions increases.

In this work the dynamics of changes in the size of the globule and the specific activity of collagenase after UV irradiation in the dose range 151-6040 J/m<sup>2</sup> was studied. The amount of protein in the samples was measured using the Lowry method; their catalytic activity was determined by the rate of bovine serum albumin hydrolysis as substrate. The process of UV irradiation took place with continuous stirring of the solution with a magnetic stirrer using a mercury-quartz lamp for 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40 minutes. The molecular sizes of native and irradiated collagenase were measured using a Nano Zetasizer ZS instrument.

Analysis of all investigated solutions (irradiated and non-irradiated) collagenase showed an alternate predominance of particles corresponding in size to the native enzyme and the products of its autolysis. Exposure to a dose of 3020 J/m<sup>2</sup> led to an increase in the number of particles corresponding to the native molecule up to 20 %, also, at this dose, an increase in the amount of autolysis products was recorded up to 18 %. The amount of enzyme aggregates decreased by ~ 5 times in comparison with the non-irradiated sample when using the maximum dose of UV light (6040 J/m<sup>2</sup>) we have studied. A decrease in the catalytic activity of collagenase by ~ 9% was recorded only using an UV irradiation dose of 3020 J/m<sup>2</sup>.

**Keywords:** collagenase, UV light, autolysis products, aggregation

### REFERENCES

1. Paramonov B.A., Turkovskij I.I., Antonov S.F., Klimova O.V., Semenov D.P., Bondarev S.V., Vestnik estetichej mediciny, 2009, V. 8. No. 2, pp. 24-29.
2. Sergeeva I.A., Hitrina K.A., Krot A.R., Sukneva A.V., Petrova G.P., Izvestiya Saratovskogo universiteta. Novaya seriya. Seriya: Fizika. 2017. V. 17. No. 3, pp. 171-178.
3. Fedosov P.A., Slivkin A.I., Nikolaevskij V.A., Buzlama A.V., Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya. 2015. No. 4, pp. 141-144.
4. Nikogosyan A.R., Tejxrib S.S., Alleya nauki. 2019. V. 2. No. 4 (31), pp. 89-92.
5. Lokarev A.V., Ogaj M.A., Stepanova E.F., Morozov Yu.A., Nam N.L., Slivkin A.I., Belenova A.S., Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya. 2020. No. 2, pp. 115-122.
6. Duarte A.S., Correia A., Esteves A.C., Critical Reviews in Microbiology. 2016. V. 42. No. 1, pp. 106-126.
7. Smeraglia F., Del Buono A., Maffulli N., British medical bulletin. 2016. V. 118. No. 1, pp. 157-166
8. Van Wart H.E., Handbook of proteolytic enzymes. – 3rd Edn. – Academic Press. 2013. V. 1, pp. 607-611.
9. Watanabe K., Applied microbiology and biotechnology. 2004. V. 63. No. 5, pp. 520-526.
10. Pankova S.M., Sakibaev F.A., Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. 2021. V. 55. No. 5, pp. 42-47.

11. Hay D.C., Louie D.L., Earp B.E., Kaplan F.T., Akelman E., Blazar P. E., Hand Surg. Eur. 2014. V. 39. No. 5, pp. 463-465.
12. Syed F., Thomas A. N., Singh S., Kolluru V., Emeigh Hart S.H., Bayat A., PLoS ONE. 2012. V. 7, pp. 42.
13. Grimes D.R., Medical Physics. 2015. No. 1, pp. 440-455.
14. Pankova S.M., Sakibaev F.A., Belyaeva T.N., Duboviczkaya A.N., Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Aktual'naya biotekhnologiya. 2020. No. 3 (34), pp. 346.
15. Holyavka M.G., Pankova S.M., Vy`shkvorkina Yu.M., Lukin A.N., Artyukhov V.G., Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya. 2019. V. 59. No. 1, pp. 63-67.
16. Folin O., Ciocalteau V., J. Biol. Chem. 1951. V 73, pp. 627-650.
17. Loginova O.O., Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Biofarm. zhurn. 2015. No. 2, pp. 13-16.
18. Loginova O.O., Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Belenova A.S., Vestn. VGU. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya. 2013. No. 2, pp. 116-119.
19. Kharat S.J., Journal of Molecular Liquids. 2008. V. 140, pp. 10-14.
20. Eckhard U., Schönauer E., Brandstetter H., Journal of Biological Chemistry. 2013. V. 288(28), pp.20184-20194.