

**ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ДЛЯ
ИЗУЧЕНИЯ СТРУКТУРНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В МОЛЕКУЛАХ
ФОТОМОДИФИЦИРОВАННОГО СЫВОРОТОЧНОГО
АЛЬБУМИНА****О. В. Башарина*, В. Г. Артюхов, А. А. Лушева, У. С. Секретарева***ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»*

Поступила в редакцию 29.12.2021 г.

Аннотация. Детектируемые изменения белковой молекулы часто связываются с разворачиванием/сворачиванием белковой глобулы, сопровождающимся экспонированием/экранированием ее хромофорных групп относительно поверхности белковой макромолекулы. Основная задача фото-биологии состоит в том, чтобы проследить путь передачи энергии от начального акта поглощения через последовательность физических и химических процессов, ведущих к необратимым изменениям структуры и биологической функции.

Были исследованы спектры поглощения растворов нативного и фотомодифицированного (λ_{max} 254 нм, интенсивность облучения - 1,8 Дж/(см²·мин), диапазон исследуемых доз УФ-света – 302 - 3020 Дж/м²) бычьего сывороточного альбумина, проанализирована тонкая структура спектров БСА с помощью второй производной, проведена оценка вклада светорассеяния в спектры поглощения исследуемых растворов. Определение гидродинамического радиуса молекулы БСА проводили методом динамического светорассеяния. Скрытые максимумы в спектре поглощения были соотнесены с вкладом определенных аминокислотных радикалов. Поскольку в белковой глобуле все аминокислотные остатки участвуют в образовании связей, поддерживающих пространственную структуру, то выявленные максимумы смещены в длинноволновую область по сравнению с таковыми в свободных аминокислотах, что согласуется с литературными данными. Под действием УФ-облучения молекула альбумина разворачивается, но при этом не происходит образования фотопродуктов ароматических аминокислот, так как не происходит сдвига длин волн электронных переходов в радикалах данных аминокислот. Рассчитаны величины эмпирических коэффициентов, характеризующих вклад светорассеяния в спектры поглощения БСА. Нами показано, что истинные спектры поглощения (то есть с вычетом светорассеяния) фотомодифицированных растворов БСА статистически значимо не отличаются от спектра нативного белка, при этом вклад светорассеяния носит дозозависимый характер (повышается с ростом дозы облучения). Полученные расчетные данные согласуются с определением гидродинамического радиуса молекулы альбумина: воздействие УФ-света в дозах 1510 и 3020 Дж/м² приводит к увеличению радиуса молекулы БСА.

Ключевые слова: бычий сывороточный альбумин, светорассеяние, спектр поглощения, УФ-свет

Несмотря на развитие новых биофизических методов исследования, изучение спектров поглощения биомолекул остается одним из наиболее эффективных и доступных методов при анализе структурных свойств биомолекул [1-3]. Спектральные свойства белковых макромолекул исследуются в основном в области поглощения боковых групп ароматических аминокислот в диапазоне длин волн 240 - 320 нм [4 - 7]. Выяснение

соответствия полос поглощения определенным электронным переходам, которые их формируют, позволяет получить важную информацию о перестройках в молекулах белков под влиянием ряда физико-химических факторов.

Действие УФ-излучения основано на возможности атомов и молекул избирательно поглощать энергию квантов света. При поглощении энергии молекулы белков переходят в возбужденное состояние, это запускает в них фотохимические процессы. В основе биологического действия УФ

© Башарина О. В., Артюхов В. Г., Лушева А. А., Секретарева У. С., 2022

света лежат химические изменения молекул биополимеров [1, 8]. Известно, что УФ-излучение повреждает нативную структуру белков, приводит к разрыву слабых связей и разворачиванию белковой глобулы и, следовательно, к увеличению светорассеяния [2, 9, 10]. Определение вклада светорассеяния в спектральные свойства белка представляется важным этапом подобных исследований: зная, как изменились спектральные свойства белка, в дальнейшем можно сделать выводы о том, какой вклад в это изменение вносит светорассеяние, и, таким образом, как изменился объем белковой глобулы.

Спектральные методы широко используются для контроля качества лекарственных препаратов. В отличие от обычных лекарственных средств, которые производятся с использованием химических и физических методов, обеспечивающих высокую степень стабильности, производство медицинских биологических препаратов связано с биологическими процессами и материалами, такими как экстракция материала из живых организмов. Эти биологические процессы характеризуются вариабельностью, что приводит к непостоянству спектра и природы сопутствующих продуктов [11]. Важнейшим аспектом решения этого вопроса является применение анализа тонкой структуры спектра для контроля качества лекарственных препаратов, в том числе содержащих определенные белки.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Раствор бычьего сывороточного альбумина ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л в 0.1 моль/л натрий-фосфатном буфере pH 7.4, 2 мл) облучали УФ-светом с помощью облучателя Bio-Link-BLX (Vilber Lourmat, Франция) в узких диапазонах длин волн: с λ_{\max} 254 нм. Интенсивность облучения 1 лампы из 6 – 0.3 Дж/(см²·мин).

Регистрировали спектры поглощения растворов бычьего сывороточного альбумина (БСА) на спектрофотометре UV-2401 PC («Shimadzu», Япония) в диапазоне длин волн от 240 до 400 нм, спектральная ширина щели 0.2 нм, шаг сканирования 0.2 нм, скорость сканирования соответствовала режиму Slow. Измерения были проведены в стандартной кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм. С целью уменьшения систематических ошибок базовой линии, а также ошибки, обусловленной асимметрией кювет, все измерения проводили на одном оптическом канале, второй канал (канал сравнения) использовали в качестве опорного (режим Split-beam) [12].

Для снижения случайных ошибок фотометрических измерений, обусловленных тепловым шумом фотодетектора, спектры поглощения сглаживались в Spline toolbox пакета Matlab с помощью сглаживающего сплайна 4-го порядка, параметр сглаживания $p = 0.67$. Увеличение разрешения в спектрах поглощения образцов осуществлялось путем вычисления второй производной (D''), для наглядности на графике приведен квадрат второй производной (D'')². Для учета вклада светорассеяния в белковых образцах модифицировали метод, предложенный в работе [13].

Определение гидродинамического радиуса молекулы БСА проводили методом динамического светорассеяния с использованием технологии неинвазивного обратного рассеяния (NiBS) с помощью Zetasizer Nano ZS (Великобритания).

Необходимые расчеты выполнены с помощью программных средств UVProbe (Shimadzu, Япония), пакета Matlab и Microsoft Excel (Microsoft, США). Достоверность отличий сравниваемых показателей оценивали методом попарных сравнений с использованием программы STADIA при уровне значимости $< 5\%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектр поглощения сывороточного альбумина расположен в интервале длин волн 190 - 300 нм. На рис. 1А представлены спектры поглощения нативного и УФ-облученных растворов сывороточного альбумина. Сложная полоса поглощения альбумина в области 250-300 нм обусловлена светопоглощением фенилаланина (коротковолновое плечо полосы поглощения), триптофана и тирозина.

На рис. 1Б можно видеть спектры поглощения БСА и вторые производные этих спектров, для удобства восприятия на рисунке приведены данные только для нативного и облученного в максимальной дозе белка. Из анализа производной спектра поглощения нативного БСА следует, что локальные максимумы (переходы в полосе поглощения) наблюдаются при длинах волн: $\lambda = 242,9; 249,2; 255,8; 262,5; 267,0; 271,2; 282,1; 289,2$ и $295,2$ нм. Основную роль в механизме УФ-индуцированной фотоинактивации белков играют белковые хромофоры. Известно, что УФ-свет в области 240-300 нм в белковой молекуле поглощают радикалы серосодержащих и ароматических аминокислот. Поглощение серосодержащих аминокислот цистеина и метионина обусловлено пере-

ходом одного из неподеленных электронов атома серы с основного на возбужденный уровень; при $\lambda_{\max} = 240$ нм коэффициент молярного поглощения (ϵ) составляет для цистеина 33, а для метионина - 23 л/(моль·см), поэтому в исследуемом диапазоне длин волн для них отсутствуют выраженные максимумы поглощения [1, 14]. Таким образом, основная роль в формировании спектра поглощения белков принадлежит боковым группам триптофана, тирозина и фенилаланина: молекула БСА содержит 2 остатка триптофана, 19 – тирозина и 27 – фенилаланина [15].

В работе [14] было проведено комплексное исследование спектральных свойств растворов аминокислот, радикалы которых являются хромофорами белков в диапазоне длин волн 240 – 300 нм, показано, что для фенилаланина при $\lambda_{\max} = 257.0$ нм $\epsilon = 190$, для тирозина $\lambda_{\max} = 275.2$ нм $\epsilon = 1369$ и для триптофана главный максимум с $\lambda_{\max} = 281.6$ нм $\epsilon = 5278$ и максимумом с $\lambda_{\max} = 288.4$ нм $\epsilon = 4463$ л/(моль·см). Молекулярные электрон-

ные спектры поглощения белков в УФ-области всегда представляют собой сложные полосы, образованные перекрывающимися полосами поглощения отдельных квантовых переходов в хромофорных группах. Собственные данные о спектрах БСА и литературные источники о спектральных свойствах ароматических аминокислот [2, 4, 14] суммированы в табл. 1.

Из приведенных данных видно, какие максимумы обусловлены вкладом определенных аминокислотных радикалов. Так как в молекуле белка все аминокислотные остатки вовлечены во взаимодействия, формирующие пространственную структуру белка, то локальные максимумы смещены в длинноволновую область по сравнению с соответствующими переходами в свободных аминокислотах. Полученные данные хорошо коррелируют с данными, полученными для других белков. Так, в работе [16] показано, что аминокислотные остатки ароматических аминокислот претерпевают положительный (красный) сдвиг длины вол-

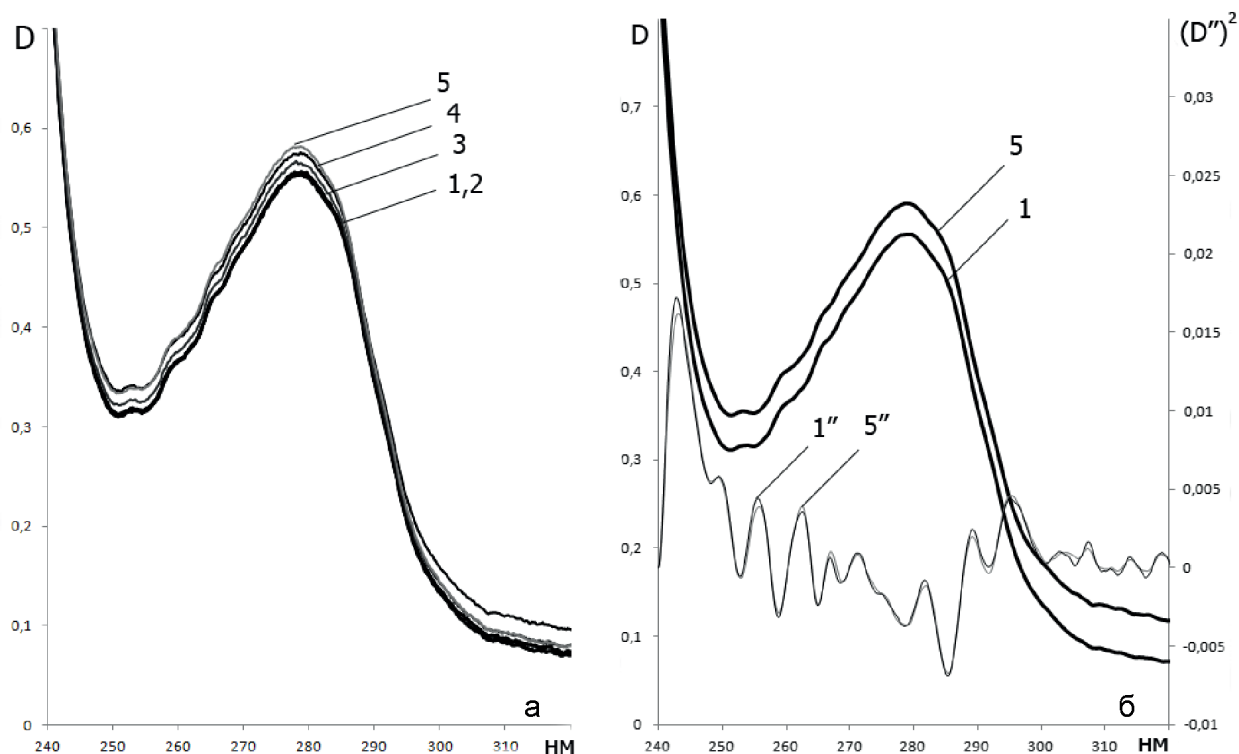


Рис. 1. Спектры поглощения и вторые производные спектров нативного и УФ-облученного (λ_{\max} 254 нм) растворов БСА. Обозначения: 1 – нативный белок; белок, облученный в дозах: 2- 302, 3 - 755, 4 - 1510, 5 - 3020 Дж/м²; 1'' и 5'' – вторые производные соответствующих спектров.

Таблица 1

Максимумы поглощения ароматических аминокислот

| Образец | Длина волны, нм | | | | | | | |
|---------|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Phe | 251.6 | 257.0 | 260.4 | 263.4 | | | |
| Tyr | | | | 267.0 | 270.0 | 275.2 | 282.4 | |
| Trp | | | | | 272.2 | | 281.6 | 288.4 |
| БСА | 252.8 | 258.7 | 265.1 | 268.5 | 274.9 | 278.8 | 285.2 | 291.8 |

ны в спектре поглощения белка по отношению к максимумам поглощения этих аминокислот в растворе. Разница, возникающая в положениях пиков полос поглощения белков, определяется наложением относительных вкладов аминокислотных остатков, эта суперпозиция является результатом линейной комбинации спектров аминокислотных остатков и их различных (неоднородных) сдвигов длины волны в зависимости от микроокружения хромофоров этих остатков.

Из рис. 1Б также следует, что в спектре УФ-облученного БСА не изменяется положение характеристических точек по сравнению с нативным белком. Таким образом, можно констатировать, что не происходит образования окисленных продуктов ароматических аминокислот, возможное изменение микроокружения хромофорных групп не приводит к сдвигу длин волн электронных переходов в ароматических радикалах аминокислот.

Когда электромагнитная волна сталкивается с молекулой, она может либо рассеиваться (происходит рассеяние электромагнитных волн при их взаимодействии с молекулой), либо поглощаться (регистрируется уменьшение интенсивности света при прохождении сквозь вещество) [17, 18]. Возможность протекания одного из вышеперечисленных процессов зависит от свойств молекулы белка, с которой произошло столкновение, и прежде всего, от размера белковой глобулы. Как видно из рис. 1А, изменение спектральных свойств УФ-облученного БСА характеризуется увеличением оптической плотности во всем исследуемом диапазоне длин волн, это связано с повышением светорассеяния: известно, что под воздействием УФ-облучения разрываются слабые связи, что приводит к увеличению объема молекулы [1, 19, 20]. Оптическая плотность УФ-модифицированного белка увеличивается как в максимумах, так и в минимумах поглощения, повышение данного параметра в области максимумов статистически достоверно в растворах БСА, облученного УФ-светом в дозах 755, 1510 и 3020 Дж/м² (254 нм). Определяется дозозависимый характер повышения оптической плотности и, следовательно, увеличения объема глобулы белка.

Измеренная оптическая плотность представляет собой сумму истинного значения оптической плотности и оптической плотности, обусловленной не поглощением, а рассеиванием света. Поправки на светорассеяние вводятся путем экстраполяции из области, где истинное поглощение отсутствует, лежащей при этом в длинноволновой

области от исследуемой полосы поглощения (в данном случае – 340–400 нм) (рис. 2). Для учета вклада светорассеяния использовали формулу $D_{\text{рас}} = 10^a \cdot \lambda^n$ [11], где a и n – эмпирические коэффициенты, характеризующие светорассеяние. Из графика $\lg D = f(\lg \lambda)$ в области 340–400 нм и по уравнению, описывающему полученную линейную зависимость, находили коэффициенты, необходимые для расчета $D_{\text{рас}}$, а следовательно, и истинного значения оптической плотности. На рис. 2 представлен спектр нативного БСА с учетом светорассеяния.

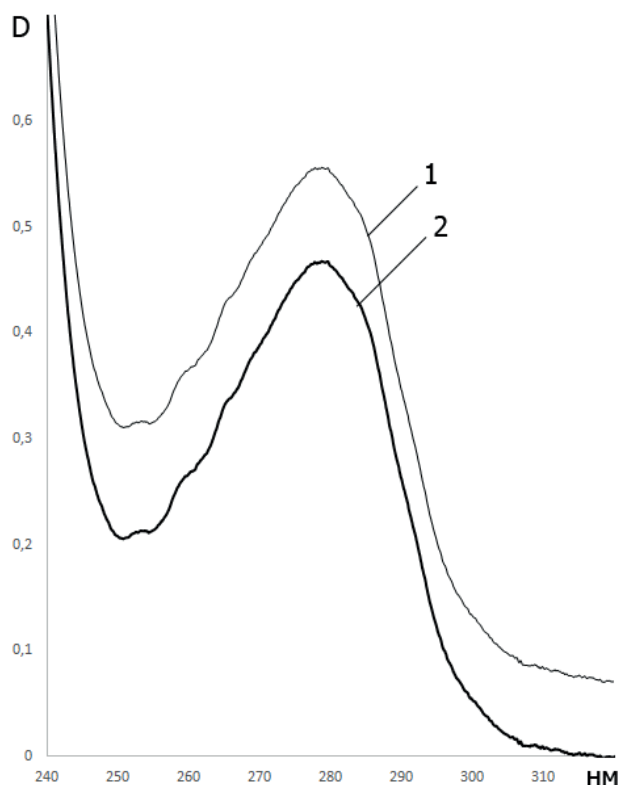


Рис. 2. Спектр поглощения нативного раствора БСА с учетом вклада светорассеяния. Обозначения: 1 – измеренная и 2 – истинная оптическая плотность (с вычетом вклада светорассеяния)

На рис. 3 приведены истинные спектры поглощения облученных растворов белка (т.е. с учетом вклада светорассеяния), показана также величина светорассеяния, рассчитанная по приведенным выше формулам. Видно, что спектры поглощения фотомодифицированных растворов практически не отличаются от исходного спектра, вклад светорассеивания повышается с ростом дозы облучения, минимальная из использованных доз (302 Дж/м²) не приводит к статистически значимым изменениям изучаемых параметров, при максимальной дозе УФ-облучения (3020 Дж/м²), воз-

можно, происходят более глубокие структурные перестройки, приводящие к изменению вклада отдельных хромофоров в суммарный спектр поглощения белка. Рассчитанные величины эмпирических коэффициентов a и n приведены в табл.2.

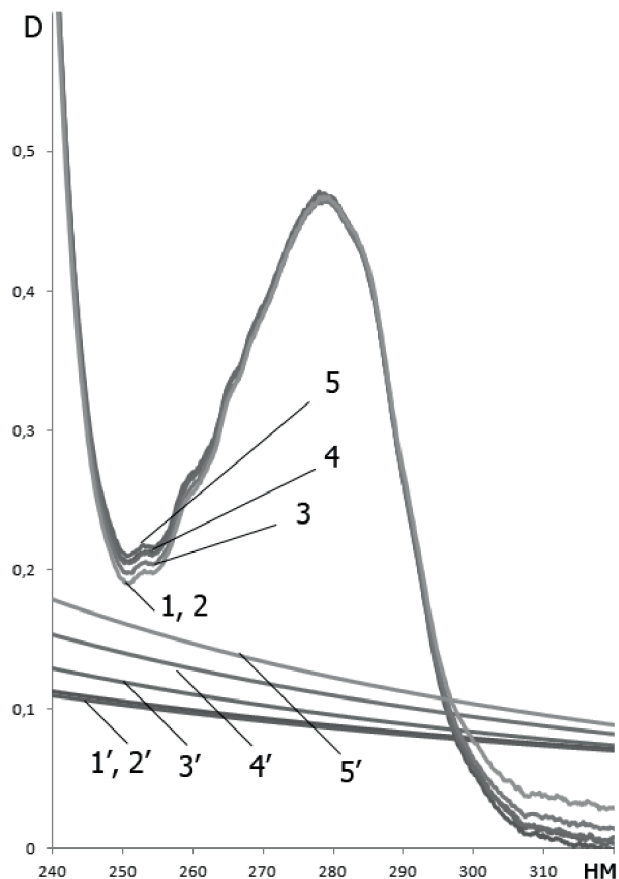


Рис. 3. Спектры поглощения нативного и УФ-облученных растворов БСА с учетом вклада светорассеяния. Обозначения: 1 – нативный белок; белок, облученный в дозах: 2- 302, 3 - 755, 4 - 1510, 5 - 3020 Дж/м²; 1' - 5' – вклад светорассеяния в соответствующий спектр.

Таблица 2

Оценка вклада светорассеяния с помощью эмпирических коэффициентов

| Объект | n | a |
|---|------|------|
| Нативный БСА | 1.54 | 2.71 |
| БСА + УФ-свет (302 Дж/м ²) | 1.57 | 2.78 |
| БСА + УФ-свет (755 Дж/м ²) | 1.93 | 3.69 |
| БСА + УФ-свет (1510 Дж/м ²) | 2.17 | 4.36 |
| БСА + УФ-свет (3020 Дж/м ²) | 2.44 | 5.06 |

Полученные расчетные данные хорошо согласуются с определением гидродинамического радиуса молекулы БСА методом динамического светорассеяния. Показано, что для нативного БСА он составил 5.56 нм, в то время как УФ-облучение в дозах 1510 и 3020 Дж/м² приводит к увеличению

радиуса молекулы до 5.86 нм и 6.04 нм соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы получили подтверждение возможности количественной оценки степени разворачивания белковой глобулы по определению вклада светорассеяния в спектр поглощения белка. Разрабатываемые методические подходы могут быть использованы для оценки структурных перестроек различных белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артюхов В.Г., Ковалева Т.А., Наквасина М.А., Башарина О.В., Путинцева О.В., Шмелев В.П. Биофизика: Учебник для вузов. Москва; Екатеринбург: Издательство "Академический проект", 2015. 295 с.
2. Lavrinenko I.A., Vashanov G.A., Ruban M.K. // Journal of Applied Spectroscopy. 2014. V. 80. P. 899-904.
3. Lavrinenko I.A., Vashanov G.A., Artyukhov V.G. // Biophysics. 2015. V. 60. P. 197-204.
4. Артюхов В.Г., Башарина О.В., Брагин М.В., Суханов Д.Ю., Вашанов Г.А. // Биофизика. 2012. Т. 57. № 3. С. 410-415.
5. Lavrinenko I. A., Holyavka M. G., Chernov V. E., Artyukhov V. G. // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2020. V. 227. P. 117722.
6. Лавриненко И. А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2017. Т. 2. № 1. С. 321-326.
7. Лавриненко И.А. Вашанов Г.А., Артюхов В.Г. // Вестник Воронежского государственного университета. 2018. Химия. Биология. Фармация. № 4. С. 82-88.
8. Артюхов В.Г., Башарина О.В. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2021. Т. 61. № 1. С. 54-68.
9. Рошупкин Д.И., Артюхов В.Г. Основы фотобиофизики: Учеб. пособие. Воронеж: Изд-во ВГУ, 1997. 116 с.
10. Панкова С. М., Холявка М. Г., Кондратьев М. С., Вышкворкина Ю.М., Лукин А.Н., Артюхов В.Г. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2020. Т. 60. – № 4. С. 411-417.
11. ГОСТ Р 5.2.249-2009. Правила производства и контроля качества лекарственных средств : национальный стандарт Российской Федерации : дата введения 01.01.2010 / Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии. – Изд. официальное – Москва : Стандартинформ, 2010. 132 с.
12. Лавриненко И.А. Разрешение, идентификация и анализ перекрывающихся полос поглощения хромофоров некоторых простых и сложных белков в диапазоне длин волн 240–320 нм : дис. канд. био. наук / Лавриненко Игорь Андреевич; науч. рук. В.Г. Артюхов ; Воронеж, 2015. 217 с.
13. Владимиров Ю.А. Литвин Ф. Ф. Фотобиология и спектральные методы исследования. Москва : Высш. школа, 1964. 209 с.

14. Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Рубан М.К. // Журнал прикладной спектроскопии. 2013. Т. 80. № 6. С. 907-912.
15. Peters Jr, T, Serum albumin, The plasma. proteins, 1,133-138, (1975), Chemistry behind Serum Albumin: A Review Kajal, Anu Radha Pathania E3S Web of Conferences 309, 01086 (2021)
16. Lavrinenko I.A., Holyavka M.G., Chernov V.E., Artyukhov V.G. // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2020.V. 227. P. 117722.
17. Bradford M.M. Anal Biochem. 1976. V. 7 (72). P. 248-254.
18. Суковатая И.Е., Кратасюк В.А., Межевикин В.В. Свидерская И.В., Есимбекова Е.Н., Немцева Е.В. Фотобиофизика : учеб. Пособие. Электрон. учеб.-метод. комплекс дисциплины. Сибирский федеральный университет – Красноярск, 2008. 434 с.
19. Артюхов В.Г., Башарина О.В., Пантак А.А., Свекло Л.С. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2000. Т. 129. № 6. С. 633-636.
20. Финкельштейн А. В.. Физика белковых молекул. – Москва; Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2014. 423 с.

Воронежский Государственный Университет
Башарина О. В., кандидат биол. наук, доцент
кафедры биофизики и биотехнологии
E-mail: bov-bio@yandex.ru

Voronezh State University
Basharina O. V., PhD, Associate Professor,
department of Biophysics and Biotechnology
E-mail: bov-bio@yandex.ru

Артюхов В. Г., доктор биол. наук, профессор,
зав. кафедрой биофизики и биотехнологии

Artyukhov V. G., PhD., DSci, Full professor, Head
of the Biophysics and Biotechnology department

Лушева А. А., студент кафедры биофизики и
биотехнологии

Lusheva A. A., student of the Biophysics and
Biotechnology department

Секретарева У. С., студент кафедры биофи-
зики и биотехнологии

Sekretareva U. S., student of the Biophysics and
Biotechnology department

APPLICATION OF SPECTRAL METHODS TO STUDY STRUCTURAL REARRANGEMENTS IN PHOTOMODIFIED SERUM ALBUMIN MOLECULES

O. V. Basharina*, V. G. Artyukhov, A. A. Lusheva, U. S. Sekretareva

Abstract. Detectable changes in the protein molecule are often associated with the unfolding/folding of the protein globule, accompanied by exposure/screening of its chromophore groups relative to the surface of the protein macromolecule. The main task of photobiology is to trace the path of energy transfer from the initial act of absorption through a sequence of physical and chemical processes leading to irreversible changes in structure and biological function.

The absorption spectra of solutions of native and photomodified (λ_{\max} 254 nm, irradiation intensity - 1.8 J/(cm²•min), the range of studied doses of UV light - 302 – 3020 J/m²) bovine serum albumin were studied, the fine structure of the BSA spectra was analyzed using the second derivative, the contribution of light scattering to the absorption spectra was evaluated the studied solutions. Determination of the hydrodynamic radius of the BSA molecule was carried out by the method of dynamic light scattering. Hidden maxima in the absorption spectrum were correlated with the contribution of certain amino acid radicals. Since all amino acid residues in the protein globule are involved in the formation of bonds that support the spatial structure, the identified maxima are shifted to the long-wavelength region compared to those in free amino acids, which is consistent with the literature data. Under the action of UV irradiation, the albumin molecule unfolds, but there is no formation of photo-products of aromatic amino acids, since there is no shift in the wavelengths of electronic transitions in the radicals of these amino acids. The values of empirical coefficients characterizing the contribution of light scattering to the absorption spectra of

BSA are calculated. We have shown that the true absorption spectra (that is, minus light scattering) of photomodified BSA solutions do not statistically significantly differ from the spectrum of the native protein, while the contribution of light scattering is dose-dependent (increases with increasing radiation dose). The calculated data obtained are consistent with the determination of the hydrodynamic radius of the albumin molecule: exposure to UV light at doses of 1510 and 3020 J/m² leads to an increase in the radius of the BSA molecule.

Keywords: bovine serum albumin, light scattering, absorption spectrum, UV light

REFERENCES

1. Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Nakvasina M.A., Basharina O.V., Putinceva O.V., Shmelev V.P. *Biofizika: Uchebnik dlya vuzov*. Moskva; Ekaterinburg: Izdatel'stvo "Akademicheskij proekt", 2009, 295 s.
2. Lavrinenko I.A., Vashanov G.A., Ruban M.K. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2014, V. 80, pp. 899-904.
3. Lavrinenko I.A., Vashanov G.A., Artyukhov V. G. *Biophysics*, 2015, V. 60, pp. 197-204.
4. Artyukhov V.G., Basharina O.V., Bragin M.V., Sukhanov D.Yu., Vashanov G.A. *Biofizika*, 2012, V. 57, № 3, pp. 410-415.
5. Lavrinenko I.A., Holyavka M.G., Chernov V.E., Artyukhov V.G. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, V. 227, pp. 117722.
6. Lavrinenko I.A., Holyavka M.G., Artyukhov V.G. *Aktual'nye voprosy biologicheskoy fiziki i himii*, 2017, V. 2, № 1, pp. 321-326.
7. Lavrinenko I.A., Vashanov G.A., Artyukhov V.G. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta, Himiya. Biologiya. Farmatsiya*, 2018, № 4, pp. 82-88.
8. Artyukhov V.G., Basharina O.V. *Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya*, 2021, V. 61, № 1, pp. 54-68.
9. Roshchupkin D.I., Artyukhov V.G. *Osnovy fotobiofiziki: Ucheb. posobie*. Voronezh: Izdatel'stvo VGU, 1997, pp. 116.
10. Pankova S.M., Holyavka M.G., Kondrat'ev M.S., Vy'shkvorkina Yu.M., Lukin A.N., Artyukhov V.G. *Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya*, 2020, V. 60, № 4, pp. 411-417.
11. GOST R 5.2.249-2009. *Pravila proizvodstva i kontrolya kachestva lekarstvennykh sredstv : nacional'nyj standart Rossijskoj Federacii : data vvedeniya 01.01.2010 / Federal'noe agentstvo po tekhnicheskomu regulirovaniyu i metrologii*. – Izd. oficial'noe, Moskva : Standartinform, 2010, P. 132.
12. Lavrinenko I.A. *Razreshenie, identifikatsiya i analiz perekryvayushchih polos pogloshcheniya hromoforov nekotorykh prostykh i slozhnykh belkov v diapazone dlin voln 240–320 nm : dis. kand. bio. nauk / Lavrinenko Igor' Andreevich; nauch. ruk. V.G. Artyukhov ; Voronezh*, 2015, P. 217.
13. Vladimirov YU.A., Litvin F.F. *Fotobiologiya i spektral'nye metody issledovaniya*. Moskva : Vyssh. shkola, 1964, 209 s.
14. Lavrinenko I.A., Vashanov G.A., Ruban M.K. *Zhurnal prikladnoj spektroskopii*, 2013, V. 80, № 6, pp. 907-912.
15. Peters Jr, T, Serum albumin, The plasma proteins, 1,133-138, (1975), *Chemistry behind Serum Albumin: A Review* Kajal, Anu Radha Pathania E3S Web of Conferences 309, 01086 (2021).
16. Lavrinenko I.A., Holyavka M.G., Chernov V.E., Artyukhov V.G. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, Vol. 227, pp. 117722.
17. Bradford M.M. *Anal Biochem*, 1976, V. 7 (72), pp. 248-254.
18. Sukovataya I.E., Kratasyuk V.A., Mezhevikin V.V., Sviderskaya I.V., Esimbekova E.N., Nemceva E.V. *Fotobiofizika: ucheb. Posobie. Elektron. ucheb.-metod. kompleks discipliny. Sibirskij federal'nyj universitet, Krasnoyarsk*, 2008, P. 434.
19. Artyukhov V.G., Basharina O.V., Pantak A.A., Sveklo L.S. *Byulleten' eksperimental'noj biologii i mediciny*, 2000, V. 129, № 6, pp. 633-636.
20. Finkel'shtejn A. V. *Fizika belkovykh molekul*. Moskva; Izhevsk: Institut komp'yuterny'x issledovaniy, 2014, 423 s.