

DOI: 10.7868/S3034574X26010083
УДК 577.112

Оригинальная статья

ОБ ОСОБЕННОСТЯХ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ ПРОИЗВОДНОЙ И МНОГОМЕРНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ СОБСТВЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ БЕЛКОВ

Н.М. Малыгина^{1,2,*}, А.Ю. Лянгузов¹, Т.А. Петрова¹, А.М. Иванов^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Российская Федерация

²Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Российская Федерация

*E-mail: n.m.malygina@mail.ru

Аннотация. Методами производной и многомерной флуоресцентной спектроскопии исследованы свойства гемоцианина наземного брюхоногого моллюска *Achatina fulica* — белка с исключительно высокой молекулярной массой и уникальной структурной организацией. Белками сравнения выбраны бычий сывороточный альбумин и альдолаза из мышц кролика. Для рассматриваемых примеров наиболее информативными оказались результаты анализа одиночных спектров общей флуоресценции белков с расчетом их четвертых производных, для чего разработан оригинальный скрипт на свободном языке программирования R. Спектры записаны при возбуждении светом с длиной волны 280 нм (зона перекрывания полос поглощения света тирозином и триптофаном). Показано, что четвертая производная представляет собой спектральный «портрет» белка, отражающий его индивидуальные особенности. В дальнейшем такой подход может быть применим не только для характеристики других белков и изучения влияния на них разных факторов, но и для исследования соединений небелковой природы. Многомерная флуоресцентная спектроскопия лишь подтвердила выводы, сделанные при регистрации одиночных спектров собственной флуоресценции белков. Однако в общем случае она может быть полезной для оценки оптимальных диапазонов длин волн возбуждения и эмиссии аналитов с целью уточнения параметров их использования.

Ключевые слова: собственная флуоресценция белков, производная флуоресцентная спектроскопия, четвертая производная спектра флуоресценции, многомерная флуоресцентная спектроскопия, гемоцианин *Achatina fulica*, бычий сывороточный альбумин, альдолаза из мышц кролика

Финансирование. Исследование финансировалось Санкт-Петербургским государственным университетом в рамках исследовательского проекта 123042000071-8.

Соблюдение этических стандартов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

Конфликт интересов. Авторы данной работы заявляют, что у них отсутствует конфликт интересов.

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи.

Благодарность. Работа выполнена с использованием оборудования Ресурсного центра «Обсерватория экологической безопасности» Научного парка СПбГУ.

Ссылка для цитирования: Малыгина Н.М., Лянгузов А.Ю., Петрова Т.А., Иванов А.М. Об особенностях применения методов производной и многомерной флуоресцентной спектроскопии при исследовании собственной флуоресценции белков. *Прикладная биохимия и микробиология / Applied biochemistry and microbiology*. 2026. Т. 62. № 1. С. 103–110. <https://doi.org/10.7868/S3034574X26010083>

ON THE UTILITY OF DERIVATIVE AND MULTIDIMENSIONAL FLUORESCENCE SPECTROSCOPY FOR STUDYING THE INTRINSIC FLUORESCENCE OF PROTEINS

N.M. Malygina^{1,2,*}, A.Y. Lianguzov¹, T.A. Petrova², A.M. Ivanov^{1,2}

¹St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

²Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

*E-mail: n.m.malygina@mail.ru

Abstract. The properties of hemocyanin from the terrestrial gastropod *Achatina fulica*, a protein with an exceptionally high molecular mass and unique structure, were studied using derivative and multidimensional fluorescence spectroscopy. Bovine serum albumin and rabbit muscle aldolase were chosen for comparison. The fourth derivatives of single total fluorescence spectra of the proteins proved to be the most informative. To compute the derivatives, an original script in the R open programming language was developed. The excitation wavelength was set to 280 nm in correspondence with the overlap of tyrosine and tryptophan absorption bands. The fourth derivatives were found to be indicative of individual features of proteins, and thus they may be regarded as their spectral “portraits”. In the future this approach can be applied not only to characterize other proteins and investigate the influence of different factors on them, but also to study compounds of non-protein nature. Multidimensional fluorescence spectroscopy only confirmed the conclusions made when recording single spectra of intrinsic fluorescence of the proteins. With that, in general, it may help to define the optimal excitation and emission wavelength ranges of analytes and thus to refine the parameters of their handling.

Keywords: intrinsic fluorescence of proteins, derivative fluorescence spectroscopy, the fourth derivative of fluorescence spectrum, multidimensional fluorescence spectroscopy, hemocyanin from *Achatina fulica*, bovine serum albumin, aldolase from rabbit muscles

Funding. The work was supported by the Saint Petersburg State University as part of research project no. 123042000071-8.

Ethics declarations. This work does not contain any studies involving human and animal subjects.

Conflict of interests. The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

Authors contribution. All authors made a significant contribution to the development of the concept, conduct of the study, and preparation of the article.

Acknowledgements. The work was carried out using the equipment of the Environmental Safety Observatory Research Center at the St. Petersburg State University Science Park.

For Citation: Malygina N.M., Lianguzov A.Y., Petrova T.A., Ivanov A.M. On the utility of derivative and multidimensional fluorescence spectroscopy for studying the intrinsic fluorescence of proteins. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya / Applied biochemistry and microbiology*. 2026;62(1):103–110. (In Russ.) <https://doi.org/10.7868/S3034574X26010083>

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в биологии и медицине стали широко использоваться методы флуоресцентной спектроскопии, в том числе с применением искусственных флуорофоров. Эти методы, как и спектрофотометрические, позволяют быстро и неразрушающим способом изучать растворы белков, а также при необходимости исследовать влияние различных факторов на изменение их структуры и характеризуются существенно более высокой чувствительностью. Однако результаты измерений флуоресценции, а также математической обработки спектральных данных очень сильно зависят от множества параметров, связанных как с характеристиками самих приборов и кювет, так и с условиями проведения экспериментов и алгоритмами их анализа. Это означает, что использование методов флуоресцентной спектроскопии требует соблюдения максимально строгих условий и контроля выполнения работ. В то же время белки обладают собственной флуоресценцией, обусловленной наличием в их структурах ароматических аминокислот, в первую очередь триптофана, а также некоторых простетических групп, что позволяет исследовать нативные белки без использования искусственных флуорофоров, которые могут влиять как на спектральные, так и иные свойства молекул образцов [1–3].

Разрешающую способность анализа можно дополнительно повысить с помощью метода производной флуоресцентной спектроскопии. Однако не все производные спектров флуоресценции с одинаковой эффективностью позволяют выделять отдельные полосы в спектрах белков.

Цель настоящей работы — оценить эффективность применения производной флуоресцентной спектроскопии с расчетом четвертых производных спектров и многомерной флуоресцентной спектроскопии при исследовании собственной флуоресценции нативных белков на примере анализа гемоцианина *Achatina fulica*, бычьего сывороточного альбумина и альдолазы из мышц кролика.

МЕТОДИКА

Объектами исследования служили гемоцианин из плазмы гемолимфы наземного брюхоногого моллюска *Achatina fulica* и коммерческие препараты бычьего сывороточного альбумина (БСА) и альдолазы из мышц кролика (Sigma-Aldrich, США). Моллюски были любезно предоставлены сотрудниками Ленинградского зоопарка.

Препарат гемоцианина получали методом центрифужной ультрафильтрации плазмы гемолимфы с использованием концентраторов Vivaspin 6 с номинальным порогом отсеивания 300 кДа (Sartorius Stedim, Германия). Дополнительно образец белка дважды промывали деионизированной водой и

разводили до объема исходной аликвоты плазмы гемолимфы [4]. Растворы БСА и альдолазы также готовили на деионизированной воде.

Чистота препаратов гемоцианина оценивалась по соотношению показателей поглощения при длинах волн 345 и 280 нм, которое составило $0,23 \pm 0,01$, что соответствовало значениям, полученным для других видов брюхоногих моллюсков [5–7].

Собственную флуоресценцию белков исследовали на флуоресцентном спектрометре Perkin-Elmer LS 55 (США) с помощью программы управления прибором FL WinLab. Исходные растворы разводили таким образом, чтобы конечные концентрации белков оказывались в диапазоне 0,03–0,09 мг/мл. В работе использовали кварцевые люминесцентные кюветы объемом 4 мл с толщиной оптического слоя 1 x 1 см. Скорость сканирования составляла 50 нм/мин, шаг спектра — 0,5 нм, ширина щелей возбуждения и эмиссии — 10 нм и 2,5 нм соответственно.

Одиночные спектры общей флуоресценции белков в трех повторностях записывали в предустановленном пользовательском режиме одиночного измерения Single Scan в диапазоне длин волн 290–420 нм при возбуждении светом с длиной волны 280 нм и сохраняли в формате ASCII.

Все условия записи спектров подобраны опытным путем.

Для обработки экспериментальных данных и графического и численного представления результатов применяли функции и скрипты библиотеки открытого языка программирования R [8], а также скрипт авторской разработки для анализа спектров методом производной флуоресцентной спектроскопии. Оригинальный скрипт позволяет усреднять спектры, рассчитывать их четвертые производные и строить графики с предварительным сглаживанием шумов с использованием функции «spline».

Четвертые производные спектров в диапазоне длин волн 300–390 нм рассчитывали методом численного дифференцирования по скользящей центральной пятичленной формуле [9]:

$$y_i^{(4)} = (y_{i-2st} - 4 \cdot y_{i-st} + 6 \cdot y_i - 4 \cdot y_{i+st} + y_{i+2st}) / (h^4),$$

где i — номер точки числового ряда, st — расстояние между узлами дифференцирования ($st=14$, что соответствует $h=st \cdot 0,5=7$ нм, где значение 0,5 — шаг спектра, параметры подбираются экспериментально).

Для сравнительного анализа белков попарно рассчитывали коэффициенты корреляции четвертых производных одиночных спектров флуоресценции разных белков.

При использовании метода многомерной флуоресцентной спектроскопии наборы спектров флуоресценции регистрировали в автоматическом

режиме многомерного измерения 3D Scan при переменной длине волны возбуждения в диапазоне 250–310 нм с шагом сканирования 3 нм таким образом, что для каждого значения длины волны возбуждения получали индивидуальный спектр эмиссии. Диапазон длин волн эмиссии составлял 290–420 нм. Каждая серия включала двадцать спектров.

Результаты многомерной флуоресцентной спектроскопии белков сравнивали по значениям длин волн возбуждения и эмиссии, при которых наблюдались максимумы интенсивности флуоресценции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе основным белком интереса является гемоцианин *A. fulica*, имеющий необычную структурную организацию и исключительно высокую молекулярную массу, оцениваемую для большинства брюхоногих моллюсков примерно в 9000 кДа [10]. Белками сравнения были выбраны БСА как «золотой стандарт» в биохимических исследованиях и дополнительно альдолаза из мышц кролика. Их молекулярные массы составляют 66 кДа [11] и 158 кДа [12] соответственно. В молекуле БСА одна полипептидная цепь [11], альдолазы — четыре [13], а в молекуле гемоцианина их десятки, сгруппированные по восемь в составе субъединиц, объединенных в дидекамер [14]. БСА и альдолаза представляют собой простые белки [8, 10], а гемоцианин — сложный, содержащий несколько сотен ионов меди в качестве простетической группы [14]. Важно отметить, что высокая молекулярная масса гемоцианина и сложность его структуры существенно ограничивают возможность применения рутинных биохимических методов для работы с ним как с нативным белком. Ранее на примере БСА и гемоцианина была показана эффективность использования методов производной УФ-спектрофотометрии с расчетом четвертых производных спектров поглощения нативных белков [15]. В настоящем исследовании обратились к методам флуоресцентной спектроскопии, также обеспечивающим щадящие условия выполнения экспериментов.

Был определен режим регистрации одиночных спектров собственной флуоресценции БСА, альдолазы и гемоцианина. На рис. 1а приведено сравнение спектров общей флуоресценции этих белков с масштабированием под максимальное значение флуоресценции БСА. Спектры записаны при облучении образцов светом с длиной волны возбуждения 280 нм, которая находится в зоне перекрывания полос поглощения тирозина и триптофана. Различия между белками заметны уже на графиках исходных спектров. Максимальная интенсивность флуоресценции зарегистрирована в области 346–350 нм для БСА, 327–330 нм для

альдолазы и 330–333 нм для гемоцианина. Простетическая группа гемоцианина, максимально поглощающая свет при длинах волн 345 нм и 580 нм, флуоресценцией не обладала.

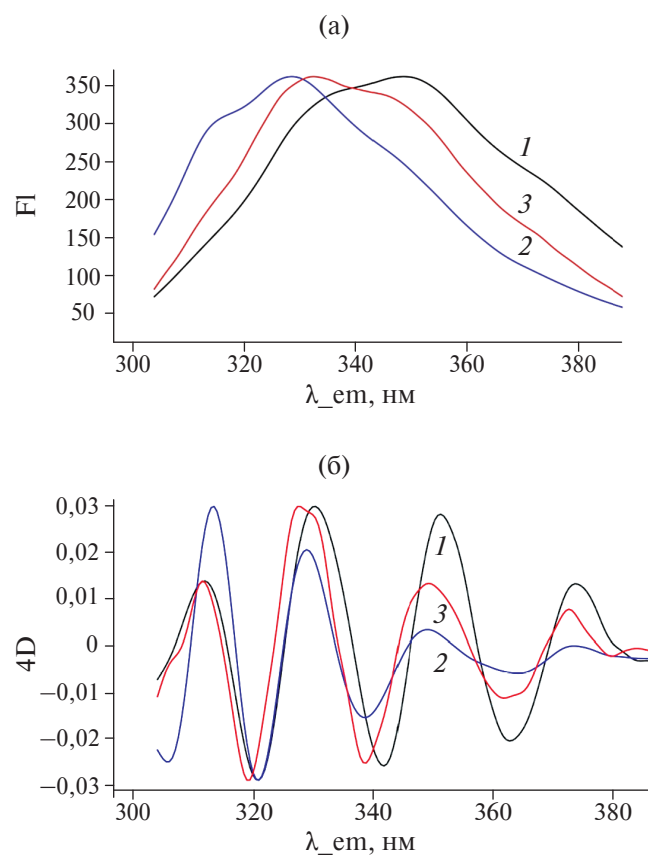


Рис. 1. Сравнение спектров собственной флуоресценции (а): БСА (1), альдолазы (2) и гемоцианина *Achatina fulica* (3), и их четвертых производных (б). Длина волны возбуждения — 280 нм

Fig. 1. Comparison of the intrinsic fluorescence spectra (a): BSA (1), aldolase (2) and hemocyanin from *Achatina fulica* (3) and their fourth derivatives (b). Excitation wavelength, 280 nm

Большой объем информации из первичных спектральных данных можно извлечь, рассчитывая производные исходных спектров, поскольку сами спектры являются результатом слияния отдельных полос флуоресценции, как и спектры поглощения. Известно, что формы производных нечетных порядков нельзя привязать к составу спектров и поэтому их невозможно использовать для анализа. На производных четных порядков — второй, шестой, десятой и т. д. — исходным максимумам спектра соответствуют минимумы, в то время как максимумы четвертой, восьмой, двенадцатой и т. д. производных совпадают с максимумами самих спектров [16]. Кроме того, необходимо учитывать, что расчет производных высоких порядков может снижать разрешение полос за счет повышения фоновых шумов.

Несмотря на широкое использование флуоресцентной спектроскопии в исследованиях белков, в доступной литературе было найдено лишь несколько публикаций, где белки анализировали с помощью именно производной флуоресцентной спектроскопии, причем с расчетом только вторых производных [17–19]. При этом, как следует из представленных в работах иллюстраций, применение вторых производных не позволило авторам четко вычленить отдельные полосы в спектрах.

Как было показано ранее [15] при сравнении белков методами производной УФ-спектрофотометрии, выбор четвертой производной оптимален для решения практических задач. Четвертые производные характеризуются хорошим разрешением спектральных полос, при этом максимумы на графиках четвертых производных, в отличие от «перевернутых» графиков вторых производных, соответствуют максимумам полос самих спектров, и такое представление результатов более информативно с точки зрения выявления индивидуальных особенностей изучаемых соединений.

На рис. 1б приведено сравнение четвертых производных спектров общей флуоресценции БСА, альдолазы и гемоцианина в диапазоне длин волн 300–390 нм при возбуждении светом с длиной волны 280 нм. На графиках четвертых производных обнаруживались четыре основные полосы, причем профиль производной, в том числе расположение полос на шкале длин волн эмиссии для каждого белка, индивидуален (рис. 1б, табл. 1). Дополнительно оценить различия четвертых производных спектров разных белков можно также, рассчитав попарно их коэффициенты корреляции, которые составили 0,64 для БСА и альдолазы, 0,79 для БСА и гемоцианина и 0,70 для альдолазы и гемоцианина.

Таблица 1. Положение полос четвертых производных спектров собственной флуоресценции гемоцианина *Achatina fulica*, БСА и альдолазы из мышц кролика на шкале длин волн эмиссии (длина волны возбуждения 280 нм)

Table 1. Positions of the bands of the fourth derivatives of the spectra of intrinsic fluorescence of hemocyanin from *Achatina fulica*, BSA and aldolase from rabbit muscle on the emission wavelength scale (excitation wavelength, 280 nm)

Номер полосы	Положение полос четвертых производных на шкале длин волн эмиссии, нм		
	гемоцианин	БСА	альдолаза
1	311,4	311,9	313,3
2	327,8	330,3	328,8
3	350,2	351,1	348,7
4	372,3	373,4	372,7

К сожалению, по четвертым производным спектров невозможно оценить вклад отдельных аминокислот в общую флуоресценцию белков, в отличие от четвертых производных УФ-спектров поглощения [15]. Тем не менее профиль графика четвертой производной спектра флуоресценции дает четкое представление об индивидуальных особенностях белка и может быть использован в качестве его спектрального «портрета».

Для анализа экспериментальных данных был разработан скрипт на открытом языке программирования R, с помощью которого рассчитаны и визуализированы четвертые производные спектров.

Подводя итоги этого раздела работы, следует отметить, что воспроизводимость результатов анализа достигается только при точном соблюдении условий записи исходных спектров, а также алгоритмов математической обработки данных, причем большинство этих параметров необходимо подбирать экспериментально. При смене модели прибора или его марки необходимо проводить «реоптимизацию» условий [20]. Таким образом можно получить внутрилабораторный стандарт, на который следует ориентироваться при дальнейшей работе с конкретным белком.

Автоматическая запись серии индивидуальных спектров флуоресценции в зависимости от переменной длины волны возбуждения может дать более подробную информацию о флуоресцентных свойствах исследуемых белков по сравнению с регистрацией одиночных спектров при возбуждении светом только одной длины волны. В связи с этим были проанализированы два белка — БСА и гемоцианин — известным методом многомерной флуоресцентной спектроскопии. Были записаны серии из двадцати спектров собственной флуоресценции для обоих белков при разных длинах волн возбуждения. Математическая обработка массивов исходных спектральных данных позволила представить их в виде трехмерных изображений или их двумерных проекций на плоскости в виде контурных карт. На рис. 2 приведены контурные карты, на которых числами на изолиниях обозначены значения интенсивности флуоресценции. Для БСА максимальные значения интенсивности флуоресценции зарегистрированы при длинах волн возбуждения и эмиссии в диапазонах 274–280 нм и 348–350 нм (рис. 2а), а для гемоцианина — в диапазонах 274–280 нм и 332–335 нм (рис. 2б) соответственно.

Как и ожидалось, оптимум длин волн возбуждения попадает в зону перекрытия полос поглощения света тирозином и триптофаном. Диапазоны длин волн эмиссии, при которых наблюдались максимумы интенсивности флуоресценции, различались для БСА и гемоцианина и соответствовали значениям, полученным при записи одиночных спектров этих белков (рис. 1а) с фиксированной

длиной волны возбуждения 280 нм. В результате в исследованных нами случаях вполне достаточной оказалась запись одиночных спектров с дальнейшим расчетом их четвертых производных. Кроме того, такой подход менее затратен по времени выполнения эксперимента, что исключительно важно, если речь идет об анализе термолabileльных белков.

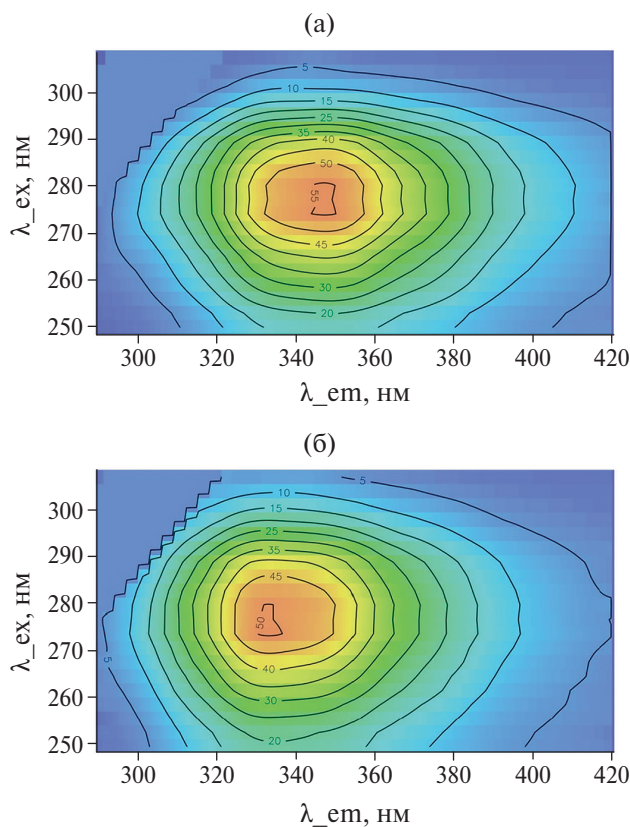


Рис. 2. Контурные карты зависимости интенсивности собственной флуоресценции БСА (а) и гемоцианина *Achatina fulica* (б) от переменной длины волны возбуждения.

Числа на изолиниях — значения интенсивности флуоресценции

Fig. 2. Contour maps of the dependence of intrinsic fluorescence intensity of BSA (a) and hemocyanin from *Achatina fulica* (б) on the variable excitation wavelength. The numbers on the isolines are the values of fluorescence intensity

В общем случае трехмерные изображения интенсивности флуоресценции дают возможность рассматривать получаемые графики с разных сторон, что особенно наглядно позволяет вычленить на спектрах флуоресценции несколько выраженных максимумов, если таковые имеются. Если речь идет об анализах с неисследованными ранее флуоресцентными свойствами, то контурные карты позволяют оценить оптимальные диапазоны длин волн возбуждения и эмиссии с целью дальнейшего уточнения характеристик их использования.

В общем случае флуоресцентная спектроскопия является полезным инструментом при изучении структуры белков и небольших изменений в их молекулах, вызванных разными причинами [1, 3]. Из данных литературы известно и об использовании вторых производных спектров флуоресценции, например, при исследовании влияния химического и термического стресса на структуру антител [18] или гипотермии на комплекс мембранных белков эритроцитов [19], а также при анализе соединений небелковой природы, таких как композиции лекарственных препаратов [21]. Однако изучение влияния каких-либо факторов на структуру белков не входило в задачу настоящей работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно заключить, что в рассмотренных примерах сравнение даже одиночных спектров общей флуоресценции гемоцианина брюхоногого моллюска *Achatina fulica*, БСА и альдолазы из мышц кролика методом производной флуоресцентной спектроскопии с расчетом четвертых производных спектров показало большую эффективность по сравнению с многомерной флуоресцентной спектроскопией. Использование четвертых производных спектров флуоресценции белков предложено впервые. Разработан оригинальный скрипт на открытом языке программирования *R* для расчета четвертых производных усредненных спектров и построения графиков спектров и их производных. Четвертые производные позволяют получить лучшее разрешение спектральных полос по сравнению с исходными спектрами и их вторыми производными.

Многомерная флуоресцентная спектроскопия дает возможность оценить оптимальные диапазоны длин волн возбуждения и эмиссии для неизученных ранее анализов с целью дальнейшего уточнения характеристик их использования, а также в дальнейшем этот метод может быть удобен при исследовании влияния различных факторов на их структуры. Предложенный подход с расчетом четвертых производных спектров флуоресценции особенно полезен в случае белков со сложной структурной организацией, таких как гемоцианин *A. fulica*, для исследования которого в нативном состоянии многие рутинные биохимические методы непригодны.

Совокупность спектральных данных, полученных нами ранее методами производной УФ-спектрофотометрии [15] в сочетании с производной флуоресцентной спектроскопией, можно использовать в качестве стандартного спектрального «портрета» для объективной характеристики индивидуальных особенностей белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd Ed., Springer Science+Business Media, 2006, 954 p. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>
2. Bisswanger H. *Practical enzymology*. 2nd Ed, Weinheim: Wiley-Blackwell, 2011, 376 p. <https://doi.org/10.1002/9783527659227>
3. Limpouchova Z., Prochazka K. *Fluorescence Studies of Polymer Containing Systems*. Ed. K. Prochazka, Berlin: Springer. 2016, vol. 6, 302 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-26788-3>
4. Petrova T.A., Lyanguzov A.Yu., Malygina N.M. J. Spectral and acid-base properties of hemolymph plasma and its fractions in the gastropod pulmonate mollusc *Achatina fulica*. *Evol. Biochem. Physiol.* 2016, vol. 52, pp. 37–45. <https://doi.org/10.1134/s002209301601004x>
5. Dolashki A., Schütz J., Hristova R., Voelter W., Dolashka P. Spectroscopic properties of non-glycosilated functional unit KLH2-c of keyhole limpet hemocyanin. *World J. Agric. Sci.* 2005, vol. 1, pp. 129–136.
6. Sabatucci A., Vachette P., Beltramini M., Salvato B., Dainese E. J. Comparative structural analysis of low-molecular mass fragments of *Rapana venosa* hemocyanin obtained using two different procedures. *Struct. Biol.* 2005, vol. 149, pp. 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2004.10.004>
7. Raynova Y., Doumanova L., Idakieva K.N. Phenoloxidase activity of *Helix aspersa* maxima (garden anail, Gastropod) hemocyanin. *Protein J.* 2013, vol. 32, pp. 609–618. <https://doi.org/10.1007/s10930-013-9523-0>
8. R Project. Reference date: 20.12.2024. <http://doi:cran.r-project.org>
9. Mathews J.H. Computer derivations of numerical differentiation formulae. *Int. J. Math. Educ. Sci. Technol.* 2003, vol. 34, pp. 280–287. <https://doi.org/10.1080/0020739031000158317>
10. van Holde K.E., Miller K.I., Decker H.J. Hemocyanins and invertebrate evolution. *Biol. Chem.* 22001, vol. 276, p. 15563–15566. <https://doi.org/10.1074/jbc.r100010200>
11. Peters T.Jr. *All about Albumin*. Academic Press, 1995, 432 p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-552110-9.X5000-4>
12. Yeom S.-J., Kim H.-J., Lee J.-K., Kim D.-E., Oh D.-K. An amino acid at position 142 in nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 33278 determines the substrate specificity for aliphatic and aromatic nitriles. *Biochem J.* 2008, vol. 415, pp. 401–407. <https://doi.org/10.1042/bj20080440>
13. Sherawat M., Tolan D.R., Allen K.N. Structure of a rabbit muscle fructose-1,6-bisphosphate aldolase A dimer variant. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 2008, vol. 64, pp. 543–550. <https://doi.org/10.1107/s0907444908004976>
14. Decker H., Hellmann N., Jaenicke E., Lieb B., Meissner U., Markl J. Minireview: recent progress in hemocyanin research. *Integr. Comp. Biol.* 2007, vol. 47, pp. 631–644. <https://doi.org/10.1093/icb/icm063>
15. Lianguzov A.Y., Malygina N.M., Ivanov A.M., Petrova T.A. On particular regimens of derivative UV spectrophotometry for comparative analysis of proteins. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2022, vol. 58, suppl. 1, p. S153–S159. <https://doi.org/10.1134/s000368382210009x>
16. Talsky G. *Derivative spectrophotometry*. Ed. T. Mager. Weinheim: Wiley John & Sons, 1994, 228 p. <https://doi.org/10.1002/3527601570>
17. Kumar V., Sharma V.K., Kalonia D.S. Second derivative tryptophan fluorescence spectroscopy as a tool to characterize partially unfolded intermediates of proteins. *Int. J. Pharm.* 2005, vol. 294, pp. 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.01.024>
18. Abbas S.A., Gaspar G., Sharma V.K., Patapoff T.W., Kalonia D.S. Application of second-derivative fluorescence spectroscopy to monitor subtle changes in a monoclonal antibody structure. *J. Pharm. Sci.* 2013, vol. 102, pp. 52–61. <https://doi.org/10.1002/jps.23354>
19. Klichkhanov N.K., Jafarova A.M. Effects of hyotremia on the fluorescent characteristics of rat erythrocyte membrane proteins. *Nat. Sci.* 2022, vol. 8, pp. 4–14. https://doi.org/10.54398/1818507X_2022_3_4
20. Karpinska J. *Macro to Nano Spectroscopy*. Ed. J. Uddin., Rijeka, IntechOpen, 2012, 460 p. <https://doi.org/10.5772/2503>
21. Walsh M.I., El-Brashy A., El-Enany N., Kamel M.E. Second-derivative synchronous fluorescence spectroscopy for the simultaneous determination of fluphenazine hydrochloride and nortriptyline hydrochloride in pharmaceutical preparations. *J. Fluoresc.* 2009, vol. 19, pp. 891–904. <https://doi.org/10.1007/s10895-009-0488-5>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Малыгина Наталья Михайловна — аспирант кафедры биохимии биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета, преподаватель кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Российская Федерация
E-mail: n.m.malygina@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9049-3969>

Лянгузов Андрей Юрьевич — к.б.н., ведущий специалист Ресурсного центра «Обсерватория экологической безопасности» Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Российская Федерация
E-mail: andrey.lyanguzov@spbu.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4803-9070>

Петрова Татьяна Александровна — к.б.н., доцент, специалист Ресурсного центра «Обсерватория экологической безопасности» Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Российская Федерация
E-mail: t.a.petrova@spbu.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0213-5457>

Иванов Андрей Михайлович — член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой лабораторной медицины Санкт-Петербургского государственного университета, заведующий кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, президент Ассоциации специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины», Санкт-Петербург, Российская Федерация
E-mail: a.m.ivanov@spbu.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8899-7524>

Поступила в редакцию 06.10.2025

После доработки 06.10.2025

Принята к публикации 14.10.2025

ABOUT THE AUTHORS

Malygina, Natalia M. — Ph.D. student of the Department of Biochemistry, faculty of Biology, St. Petersburg State University, teacher of the Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, S.M. Kirov Medical Military Academy, St. Petersburg, Russian Federation
E-mail: n.m.malygina@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9049-3969>

Lianguzov, Andrey Y. — Ph.D. in Biochemistry, senior specialist of the Observatory of Environmental Safety Resource Center of the St. Petersburg State University Science Park, St. Petersburg, Russian Federation
E-mail: andrey.lyanguzov@spbu.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4803-9070>

Petrova, Tatiana A. — Ph.D. in Biochemistry, associate professor, specialist of the Observatory of Environmental Safety Resource Center of the St. Petersburg State University Science Park, St. Petersburg, Russian Federation
E-mail: t.a.petrova@spbu.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0213-5457>

Ivanov, Andrey M. — Corresponding Member of the RAS, Dr. of Medical Sciences, professor, Head of Department of Laboratory Medicine of Medical Institute of St. Petersburg State University, Head of the Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, S. M. Kirov Medical Military Academy, President of the Association of laboratory specialists and organizations “Federation of Laboratory Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation
E-mail: a.m.ivanov@spbu.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8899-7524>

Received October 06, 2025

Revised October 06, 2025

Accepted October 14, 2025