

*На правах рукописи*

**Юрина Любовь Владимировна**

**ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ФИБРИНОГЕНА: ВЛИЯНИЕ НА  
СТРУКТУРУ И ФУНКЦИЮ**

1.5.2. Биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

**Научный руководитель:** **Розенфельд Марк Александрович,**  
доктор биологических наук, профессор

**Официальные оппоненты:** **Топунов Алексей Федорович,**  
доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией биохимии азотфиксации и метаболизма азота Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

**Коваленко Татьяна Александровна,**  
кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории внутриклеточной сигнализации и системной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Защита диссертации состоится «    » \_\_\_\_\_ 2024 года в \_\_\_\_ часов \_\_\_\_ минут на заседании Диссертационного совета 24.1.038.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук по адресу: 11991, Москва, Ленинский проспект, д. 38, и на веб-сайте:

<https://biochemphysics.ru/ru/odissertacii/Диссертация%20Юриной%20Любови%20Владимировны/>

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2024 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета 24.1.038.01,  
кандидат химических наук

Л.И. Мазалецкая

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Биологические макромолекулы постоянно подвергаются воздействию окислителей, а окислительное повреждение клеточных компонентов все чаще признается важным патофизиологическим событием, приводящим к болезням и процессам старения. Белки являются высокочувствительными мишенями для молекул активных форм кислорода (АФК). Окислители могут вызывать химические модификации боковых цепей аминокислотных остатков, превращение белка в производные, чувствительные к протеолитической деградации, образование белок-белковых поперечных связей и фрагментации белка, вследствие разрыва полипептидной цепи. Фибриноген является одним из наиболее изучаемых белков в отношении его окисления и функциональных изменений. Такой повышенный интерес к этому белку обусловлен как его огромной значимостью в гемостазе и во многих других физиологических и патофизиологических процессах, так и его наиболее высокой уязвимостью к окислению среди других белков плазмы крови.

В нормальных условиях образование и последующая деградация АФК регулируются клеточными защитными системами, включая ферменты, способными удалять молекулы окислителя или их предшественников, такие как супероксиддисмутаза, каталаза и глутатионпероксидаза, или восставнавливать уже окисленные белки в нативное состояние посредством метионинсульфоксидредуктаз, дисульфидредуктаз/изомеразы. Вне клеток уровни как глутатиона, так и антиоксидантных ферментов слишком низки, чтобы обеспечить адекватную защиту белков от вредного действия метаболитов кислорода. Поэтому исследование окислительной модификации фибриногена *in vitro* имеет большое значение в исследовании адаптации плазменных белков к воздействию окислителей.

Постоянно растущее количество данных подтверждает важную роль фибрин(оген)а и продуктов его деградации в регуляции воспалительной реакции в некоторых тканях-мишенях. Повышенное содержание фибриногена в крови считается индикатором провоспалительного состояния и маркером высокого риска развития сосудистых воспалительных заболеваний, таких как гипертония и атеросклероз. В то время как некоторые патологические состояния характеризуются изменением уровня фибриногена, другие связаны с изменением структурно-функциональных особенностей молекулы, в т. ч. при ее окислении. В этой связи получение данных о возникновении посттрансляционных модификаций (ПТМ) при окислении фибриногена позволит внести вклад в понимание некоторых механизмов развития заболеваний, сопровождающихся воспалительным процессом.

**Цель исследования** состояла в выявлении окислительных модификаций и механизмов нарушения функциональной активности фибриногена при окислении, индуцированном озоном,  $\text{НОС1}^-/\text{ОС1}$  и перекисью водорода.

Для достижения этой цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) выявить набор

модифицированных аминокислотных остатков, определить химическую природу этих модификаций, а также процентное содержание модифицированных аминокислотных остатков в контрольных и обработанных окислителями образцах фибриногена.

2. Оценить уязвимость структурных элементов и функционально значимых участков молекулы фибриногена к действию окислителей.

3. Комплексом методов (спектрофотометрия, упругое светорассеяние (УСР), электрофорез в полиакриамидном геле (ПААГ), конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ)) исследовать влияние окислителей на функциональные свойства фибриногена (кинетика образования фибринового геля, толщина образующихся волокон фибрина, взаимодействие фибриногена с другими белками системы гемостаза (активированный коагуляционный фактор XIII (FXIII), плазмин).

4. Оценить вклад некоторых аминокислотных остатков или отдельных участков молекулы фибриногена в резистентность структуры и поддержание биологической активности белка при воздействии окислителей.

#### **Научная новизна:**

1. Окисление фибриногена, индуцированное окислителями с различной реакционной способностью ( $O_3$ ,  $HOCl/OCl^-$  и  $H_2O_2$ ), приводит к возникновению окислительных ПТМ в определенных участках молекулы. Центральная E область фибриногена демонстрирует наибольшую резистентность к окислению, в то время как другие области фибриногена, такие как периферические D и  $\alpha C$ -области проявляют высокую уязвимость к действию окислителей.

2. Функционально значимые сайты фибриногена, ответственные за связывание тромбина (расположенные в “funnel shaped” домене), а также за сборку протофибрилл фибрина (полимеризационные сайты “knob A: hole a” и D-D интерфейс) толерантны к действию окислителей.

3. Окислительная модификация ряда остатков метионина ( $A\alpha Met476$ ,  $A\alpha Met517$ ,  $A\alpha Met584$ ,  $B\beta Met367$ ,  $\gamma Met264$  и  $\gamma Met94$ ) не влияет на функциональные свойства фибриногена, что позволяет рассматривать их как внутримолекулярные перехватчики АФК.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Сопоставление данных об изменении функциональных свойств фибриногена при окислении с детектированными сайтами ПТМ позволило определить вклад данных окислительных модификаций в аномальную структурную организацию фибринового геля, замедление образования и лизиса сгустка. Полученные результаты дают новое понимание связи между возникновением ПТМ фибриногена, тромбозом и другими патологическими состояниями, связанными с изменениями функциональных свойств фибриногена при окислении.

Исследование окислительной модификации фибриногена *in vitro* вносит вклад в понимание процессов адаптации плазменных белков к воздействию окислителей при отсутствии в плазме крови систем антиоксидантной защиты.

**Методология и методы исследования.** Поиск модифицированных аминокислотных остатков осуществляли методом ВЭЖХ-МС/МС на наножидкостном хроматографе Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., Санта-Клара,

США), совмещенном с тандемным масс-спектрометром высокого разрешения 7T LTQ-FT Ultra (Thermo, Бремен, Германия). Триптические пептиды фибриногена были идентифицированы путем поиска в базе данных UniProtKB (UP000005640-9606 HUMAN, Homo sapiens) с использованием программного обеспечения PEAKS Studio (v. 8.5, Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, ON, Canada).

Скорость полимеризации фибрина, изменения мутности сгустка при гидролизе и УФ-спектров образцов в области 240–350 при окислении фибриногена осуществляли методом спектрофотометрии с использованием оборудования xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer (Bio-Rad, США) и спектрофотометра СФ-2000 (Россия).

Визуализацию статичной структуры фибринового сгустка, а также кинетики плазминового гидролиза гелей проводили методом ЛКСМ с использованием флуоресцентно меченных белков (фибриногена и плазминогена), конъюгированных с флуоресцеин изотиоционатом (ФИТЦ). Для получения микрофотографий использовали микроскоп Zeiss Axio Observer Z1 с конфокальным модулем CSU-X1M 5000 (Carl Zeiss, Jena, Germany) с масляным объективом 100×.

Влияние окисления на структуру фибрина также оценивали методом УСР с помощью спектрометра Malvern (Великобритания) с гелий-неоновым лазером ( $\lambda=632,8$  нм).

Катализируемую активированным FXIII ковалентную сшивку полипептидных цепей фибрина и накопление продуктов деградации молекулы фибриногена под действием плазмينا проверяли с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Окисление фибриногена, индуцированное озоном,  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$  и перекисью водорода, вызывает химическую модификацию широкого спектра аминокислотных остатков. Увеличение концентрации окислителя в образцах вызывает дозозависимое увеличение процентного содержания модифицированных аминокислотных остатков и вовлечение новых сайтов модификации.

2. При обработке фибриногена указанными окислителями обнаружены следующие закономерности:

- при обработке исследуемыми окислителями (озон,  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$  или перекись водорода), в молекуле фибриногена детектируется ряд общих модифицированных аминокислотных остатков;

- область E является наименее уязвимой к действию окислителей по сравнению с другими структурными областями;

- наиболее подверженными окислительной модификации структурами оказались  $\alpha$ C-области и D-области молекулы белка;

- сохраняется структурная целостность ряда аминокислотных остатков и целых участков молекулы, играющих ключевую роль в функционировании фибриногена.

3. Выявлены аминокислотные остатки, окисление которых не оказывает влияния на функциональные свойства фибриногена. Эти аминокислотные остатки могут выполнять функцию перехватчиков АФК, и повышать устойчивость

молекулы белка к их воздействию, тем самым экранируя функционально значимые участки.

4. Высокое содержание легко окисляемых аминокислотных остатков в составе  $\alpha$ C-области, а также ее пространственное расположение в молекуле фибриногена, ограничивающее доступ АФК к центральной E области, вносят вклад в резистентность исследуемого белка к окислительному стрессу.

**Личный вклад диссертанта.** Автор принимал участие в постановке задач и планировании экспериментов, самостоятельно проводил поиск и анализ ранее опубликованных данных, непосредственно участвовал в выполнении экспериментальных работ, обработке полученных результатов и подготовке их к публикации. Материалы диссертации представлены автором в виде устных и стендовых докладов на российских и международных научных конференциях, форумах и конгрессах.

Исследования, проведенные на приборах центра коллективного пользования ИБХФ РАН (ВЭХЖ-МС/МС) выполнялись в соавторстве с к.ф-м.н. Кононихиным А.С., к.б.н. Бугровой А.Е., н.с. Индейкиной М.И., д.ф-м.н. Николаевым Е.Н.

**Степень достоверности полученных результатов** и обоснованность сделанных выводов обеспечена использованием современных и общепринятых методов исследования белков, их структуры и функциональной активности, а также специального программного обеспечения, использующего уникальные алгоритмы обработки данных и статистическую оценку погрешности.

Достоверность полученных результатов подкрепляется согласованностью данных, полученных различными методами исследования, с опубликованными данными других исследований. В работе использовалось современное оборудование ЦКП «Новые материалы и технологии» ИБХФ РАН.

#### **Апробация работы**

Результаты диссертации были представлены на:

XXIX Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (г. Москва, 2017); XII Международной (XXI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых учёных (г. Москва, 2017); XXI Международной школы-конференции «Биология - наука XXI века» (г. Пущино, 2017); X Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз – 2017» (г. Казань, 2017); XVII Ежегодной международной молодежной конференции "Биохимическая физика" ИБХФ РАН-ВУЗы (г. Москва, 2017); Междисциплинарном научном форуме с международным участием "Новые материалы и перспективные технологии" (г. Москва, 2018); XXII Международной школы-конференция «Биология - наука XXI века» (г. Пущино, 2018); Международном конгрессе The 43th FEBS Congress (Чехия, 2018); Международной конференции The 25th International Fibrinogen Conference & 3rd Factor XIII Workshop (USA, 2018); XXII Международной школы-конференция «Биология - наука XXI века» (г. Пущино, 2019); Международном конгрессе The 44th FEBS Congress (Польша, 2019); X Международной конференции «Биоантиоксидант» (г. Москва, 2020); Российском форуме по тромбозу и гемостазу совместно с 10-й (юбилейной) конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии (г.

Москва, 2020); II Международной конференции «Systems biology and systems physiology: regulation of biological networks» (г. Москва, 2021); IX Всероссийской научной молодежной школе-конференции «Химия, физика, биология: пути интеграции» (г. Москва, 2022); XXII Ежегодная молодежная конференция с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы "БИОХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА" (г. Москва, 2022); III Международной конференции «Systems biology and systems physiology: intracellular signaling and metabolism regulation» (г. Москва, 2022).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 20 печатных работ, из них – 7 статей в международных и российских рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК; 13 тезисов в сборниках трудов международных научных конференций.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, описание методов исследования, главу с изложением результатов работы, заключение, раздел с выводами, список сокращений и условных обозначений, список литературы (268 источников). Работа изложена на 121 странице машинописного текста, содержит 3 таблицы и 17 рисунков.

**Список сокращений и условных обозначений.** FXIII – коагуляционный фактор XIII; АФК – активные формы кислорода; ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с тандемной масс-спектрометрией; КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия; ПААГ – полиакриламидный гель; ПТМ – посттрансляционные модификации; УСР – упругое светорассеяние; ФИТЦ – флуоресцеин изотиоционат.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** описана актуальность исследованной темы, цели и задачи исследования и дана общая характеристика работы.

**Глава 1** содержит обзор литературы, который включает описание структуры молекулы фибриногена, процесса образования фибринового геля, взаимодействия фибрин(оген)а с клетками и плазменными белками, а также описана роль фибриногена в возникновении и развитии ряда заболеваний, сопровождающихся воспалительным процессом. Изложены сведения об активных формах кислорода, окислительных модификациях белковых молекул, в том числе фибриногена. Рассмотрены механизмы роль поддержания стабильности плазменных белков при окислении.

**Глава 2** описывает материалы и методы, использованные при выполнении работы. Фибриноген был выделен из плазмы крови модифицированным методом осаждения холодным этанолом по Дулитлу и методом многократного глицинового осаждения. FXIII выделяли из плазмы крови человека методом фракционного осаждения сульфатом аммония с последующей ионообменной хроматографией на DEAE-ToyoPearl M650. Glu-плазминоген выделяли из плазмы крови человека методом аффинной хроматографии на Lys-Sepharose 4B при +4°C и pH 8,0.

Раствор фибриногена обрабатывали озono-кислородной смесью в кварцевом реакторе. Полное истощение озона в каждом эксперименте подтверждалось спектрофотометрически по полосе поглощения при 254 нм. Количество озона варьировали в диапазоне 75–300 мкМ. Образцы фибриногена (1 мг/мл)

обрабатывали  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$  в течение 60 минут при температуре  $+37^\circ\text{C}$ . Количество окислителя варьировали в диапазоне 150–1000 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  и 10–100 мкМ  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$ . Реакцию окисления останавливали 10-молярным избытком L-метионина.

Измерения оптической плотности образцов фибриногена проводили на UV/VIS-спектрофотометре СФ-2000 (Россия). Оценка скорости образования и плазминового гидролиза фибрина оценивали спектрофотометрически при 350 нм, в течение часа.

Сохранение способности FXIII к ковалентному сшиванию цепей окисленного фибриногена, а также оценка накопления продуктов деградации молекулы фибриногена под действием плазмина осуществляли методом ПААГ-электрофореза.

Визуализацию статичной структуры фибринового сгустка, а также кинетики плазминового гидролиза гелей проводили методом ЛКСМ с использованием флуоресцентно меченных белков (фибриногена и плазминогена), конъюгированных с флуоресцеин изотиоцианатом (ФИТЦ). Для получения микрофотографий использовали микроскоп Zeiss Axio Observer Z1 с конфокальным модулем CSU-X1M 5000 (Carl Zeiss, Jena, Germany) с масляным объективом 100×. Влияние окисления на структуру фибрина также оценивали методом УСР с помощью спектрометра Malvern (Великобритания) с гелий-неоновым лазером ( $\lambda=632,8$  нм).

Восстановление дисульфидных связей осуществляли с использованием 5 мМ дитиотреитола, алкилирование проводили 10 мМ йодацетамидом с последующим расщеплением образцов трипсином в соответствии с протоколом производителя. Эксперименты ВЭЖХ-МС/МС проводили на нано-ЖХ Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., Санта-Клара, США), совмещенном с масс-спектрометром высокого разрешения 7T LTQ-FT Ultra (Thermo, Бремен, Германия). Триптические пептиды фибриногена идентифицировали с использованием программного обеспечения PEAKS Studio (версия 8.5, Bioinformatics Solutions Inc., Ватерлоо, Онтарио, Канада) по базе данных UniProtKB (UP000005640–9606 HUMAN, Homo sapiens) с трипсином в качестве гидролитического фермента, допуская одностороннее неспецифическое расщепление. Окислительную модификацию аминокислотного остатка (выраженную в процентах) рассчитывали, как площадь пика пептидов, содержащих данную окисленную аминокислоту, нормированную на сумму всех форм пептида (окисленного и неокисленного), содержащих данный аминокислотный остаток. Каждый аминокислотный остаток считался модифицированным, если степень его окисления увеличивалась не менее чем на 1% по сравнению с контролем.

**Глава 3** посвящена описанию полученных результатов и их обсуждению.

**Окисление фибриногена, индуцированное  $\text{O}_3$ .** Принадлежащий к семейству АФК озон можно рассматривать как чрезвычайно удобный окислитель для моделирования АФК, возникающих *in vivo*. Окислительные модификации, индуцированные озоном, как ранее было выяснено экспериментально, могут протекать как по механизму присоединения озона, так и по свободнорадикальному механизму, причем последний механизм возможен за счет гидроксильных

радикалов, образующихся в водном растворе под действием озона. Таким образом, химия повреждения белков озоном считается во многих отношениях схожей с воздействием других АФК.

Результаты электрофореза показывают, что все три полипептидные цепи  $\text{A}\alpha$ ,  $\text{B}\beta$  и  $\gamma$  окисленного фибриногена сохраняют свою целостность, что подразумевает отсутствие внутримолекулярного расщепления, даже при концентрации окислителя 300 мкМ (Рисунок 1А). На полученной электрофореграмме отсутствуют полосы высокомолекулярных белковых агрегатов, свидетельствуя об отсутствии межмолекулярных ковалентных сшивок в результате окисления.

Изменения УФ-спектров образцов в области 240–360 нм (Рисунок 1Б) показывают, что озон активно взаимодействует с ароматическими аминокислотными остатками триптофана, тирозина и фенилаланина, присутствующими в молекуле фибриногена. Смещение максимума поглощения в коротковолновую область и уменьшение его интенсивности обусловлены образованием хиноидных структур из феноксильных и имидазольных ядер аминокислотных остатков под действием окислителя. Эти эффекты коррелируют с увеличением концентрации озона.

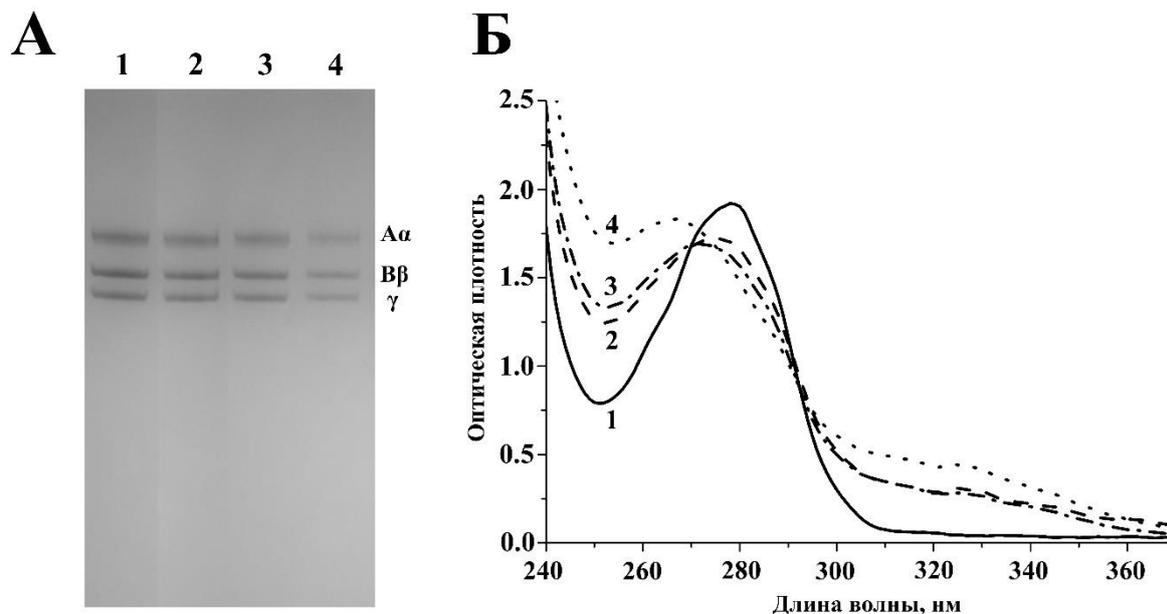


Рисунок 1 – Оценка возможного изменения размера молекул фибриногена, а также окисления его ароматических аминокислотных остатков под воздействием озона. (А) Результаты денатурирующего электрофореза в ПААГ. (Б) Анализ спектров оптического поглощения в диапазоне  $\lambda$  240-360 нм. 1 - неокисленный фибриноген; 2-4 - фибриноген, окисленный 75 мкМ (2), 150 мкМ (3) и 300 мкМ озона

Детектированные окислительные модификации молекулы фибриногена представлены на Рисунке 2. Для всех окисленных остатков наблюдается увеличение степени их окислительных изменений пропорционально концентрации добавленного озона. Общая степень окислительных изменений, а также количество аминокислотных остатков, участвующих в окислительных модификациях боковых цепей аминокислот, уменьшаются в ряду:  $\text{Met} > \text{His} > \text{Trp} > \text{Tyr} > \text{Pro} > \text{Lys}$ .

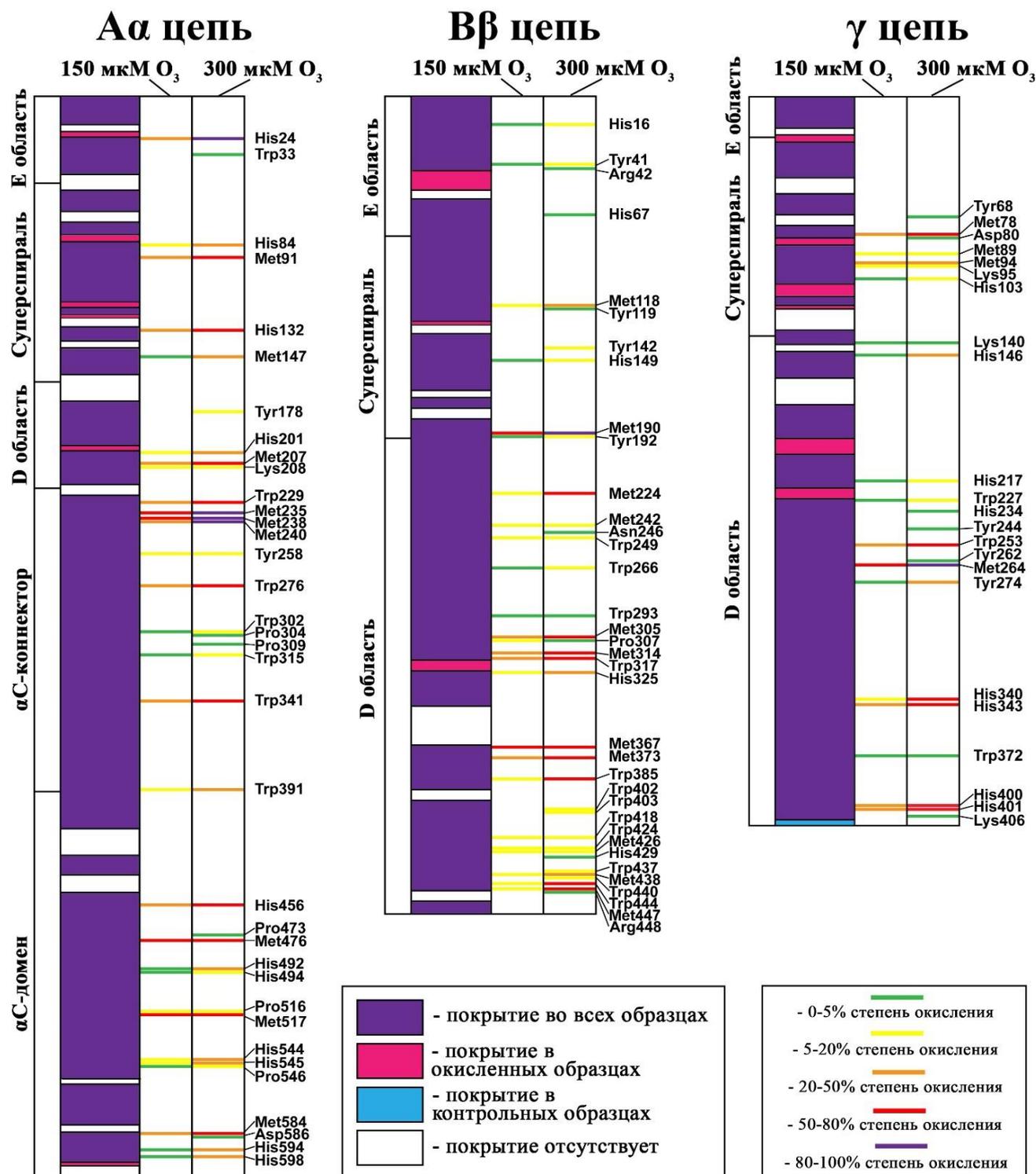


Рисунок 2 – Схематическое изображение полипептидных цепей фибриногена с отмеченными детектированными участками молекулы (покрытие) и окисленными аминокислотными остатками

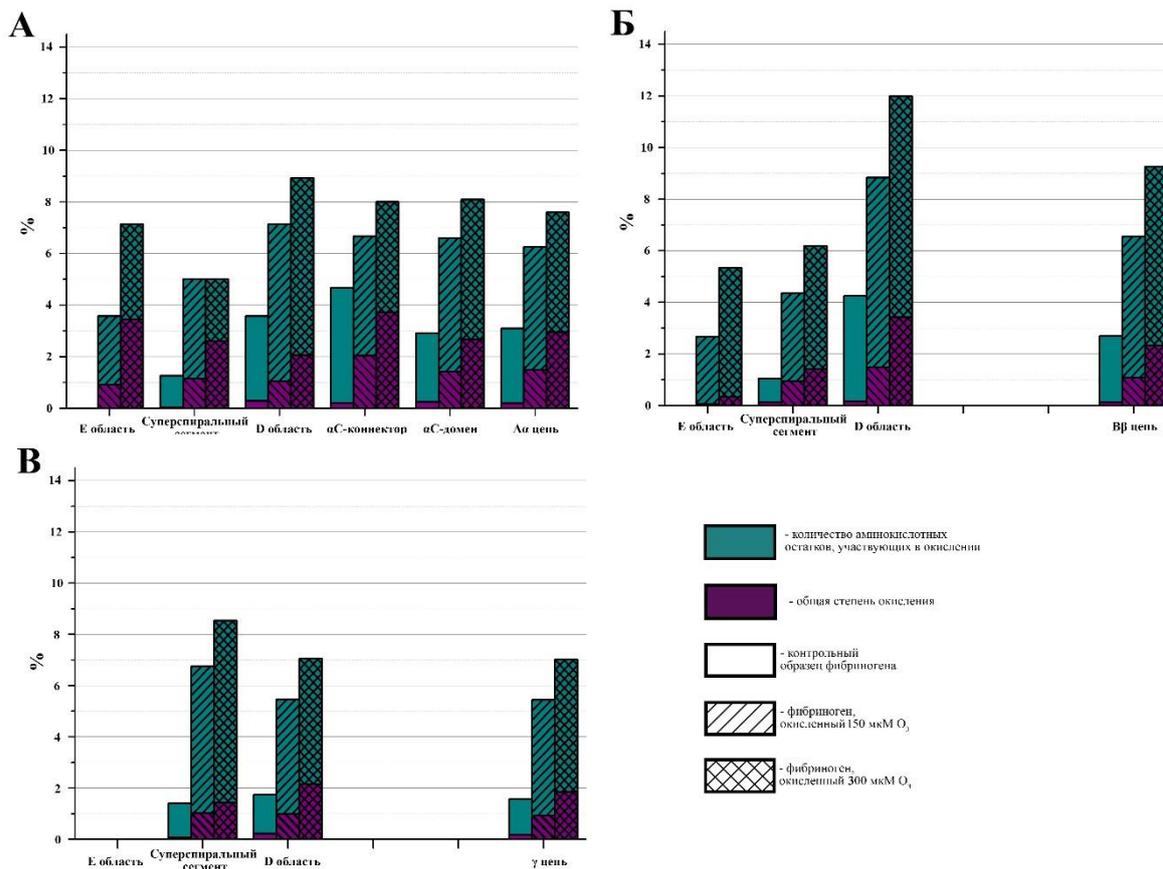


Рисунок 3 – Данные о распределении окислительных модификаций (количество аминокислотных остатков, участвующих в окислении, и общая степень окислительных изменений) по структурным участкам Аα (А), Ββ (Б) и γ (В) цепей фибриногена

Окисленные аминокислотные остатки были обнаружены во всех структурных участках молекулы фибриногена. Для всей молекулы количество аминокислотных остатков, участвующих в окислительных модификациях, и величина общей степени их окислительных изменений оказались равными 2,8% и 0,2% для неокисленного фибриногена, 6,0% и 1,2% для фибриногена, окисленного 150 мкМ озона, 7,8% и 2,4% для фибриногена, окисленного 300 мкМ озона, соответственно. Присутствие окислительных модификаций в контрольном образце можно объяснить случайным окислением во время подготовки и хранения образца. Можно отметить, что γ-цепь во всех образцах демонстрирует наименьшую склонность к окислению (Рисунки 2 и 3).

Во всех образцах наиболее окисленными структурными участками оказались αС-коннекторы, для которых количество аминокислотных остатков, участвующих в окислении, и общая степень окислительных изменений равны 4,5% и 0,2% в контроле, 6,3% и 1,9% - после обработки 150 мкМ озона, 7,7% и 3,6% - после обработки 300 мкМ озона, соответственно. Все части молекулы фибриногена (за исключением области Е, в которой при низкой концентрации озона вообще не было окислений) обнаруживают высокую уязвимость к окислительным модификациям (Рисунок 3).

**Окисление фибриногена, индуцированное  $H_2O_2$ .**  $H_2O_2$  представляет собой нерадикальную активную форму кислорода, являющуюся одним из основных членов семейства АФК. Данные о концентрации перекиси водорода в плазме крови весьма противоречивы. По данным большинства исследований, значения концентрации  $H_2O_2$  в плазме могут находиться в диапазоне от нескольких до сотен мкМ, тогда как есть сообщения о том, что концентрация  $H_2O_2$  в плазме человека может даже достигать 100 мМ.

На Рисунке 4А представлены результаты электрофореза полипептидных цепей нативного и окисленного фибриногена, которые свидетельствуют о том, что, независимо от концентрации окислителя, не наблюдалось ни фрагментации белка, ни образования ковалентных сшивок его цепей.

В присутствии FXIIIa полипептидные цепи фибрина участвуют в ковалентном сшивании, что проявляется в образовании  $\gamma$ - $\gamma$ -димеров и  $\alpha$ - $\alpha$  полимеров. С повышением концентрации окислителя количество образующихся  $\alpha$ - $\alpha$  полимеров и  $\gamma$ - $\gamma$ -димеров снижается, о чем свидетельствует также увеличение содержания исходных A $\alpha$ - и  $\gamma$  цепей (Рисунок 4Б). Очевидно, что это является следствием окислительной модификации структуры молекулы фибриногена.

При оценке подверженности молекулы фибриногена плазминовому гидролизу при окислении хорошо заметно, что даже при минимальном количестве окислителя (150 мкМ) значительно возрастает количество продуктов деградации (Рисунок 4В)

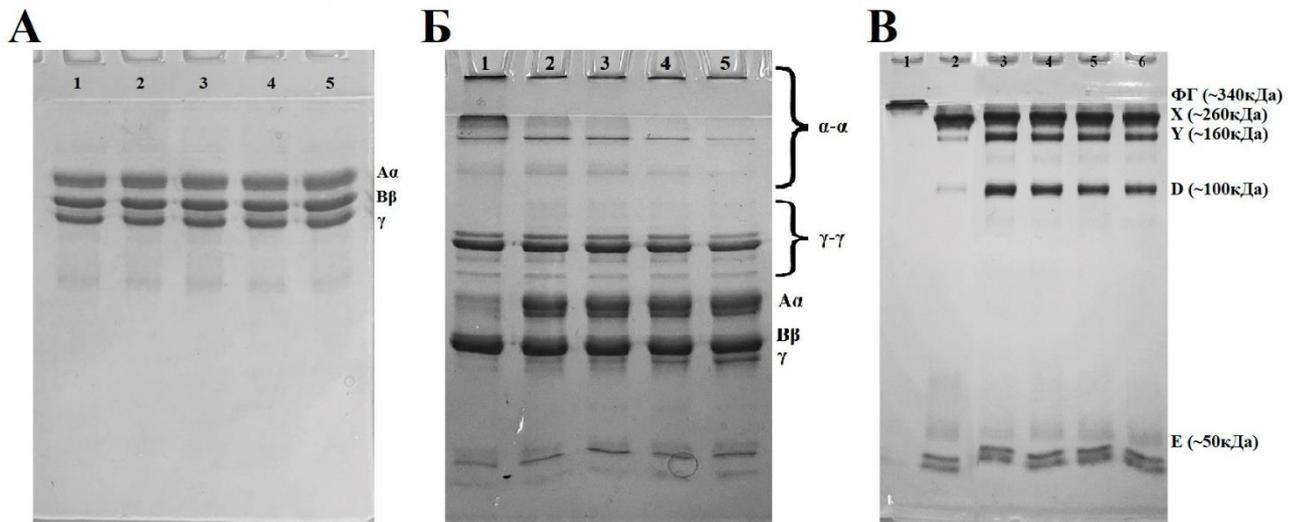


Рисунок 4 – Оценка влияния окисления фибриногена  $H_2O_2$  на размер его молекул (А), продуктов реакции с FXIIIa (Б) и продуктов гидролиза плазмином (В) методом SDS-электрофореза в ПААГ. (А) Результаты для полипептидных цепей (12% гель): 1 – неокисленный фибриноген, 2-5 – фибриноген, окисленный 150 мкМ, 300 мкМ, 600 мкМ и 1000 мкМ  $H_2O_2$ , соответственно. (Б) Результаты для продуктов реакции сшивания фибриногена в реакции с FXIIIa (8% гель): 1- результаты для неокисленного фибриногена; 2-5 – для фибриногена, окисленного 150 мкМ, 300 мкМ, 600 мкМ и 1000 мкМ  $H_2O_2$ , соответственно. (В) Результаты для продуктов плазминового гидролиза фибриногена (8% гель): 1 – негидролизованный

фибриноген; 2 - продукты гидролиза неокисленного фибриногена, 4-6 – продукты гидролиза фибриногена, окисленного 150 мкМ, 300 мкМ, 600 мкМ и 1000 мкМ  $H_2O_2$ , соответственно

Методом масс-спектрометрии были проанализированы образцы неокисленного и обработанного 300 мкМ  $H_2O_2$  фибриногена. Наиболее подверженными окислению оказались остатки метионина, триптофана и гистидина. Среди модификаций, обнаруженных в этих аминокислотных остатках, имеются случаи образования метионинсульфоксида и гидрокситриптофана вследствие присоединения одного атома кислорода к боковой цепи (+15,99), окисления триптофана до кинуренина (+3,99) и отщепления метантиола от боковой цепи Met (-48,00). Как видно из Рисунка 5, модифицированные в результате индуцированного окисления аминокислотные остатки были обнаружены во всех трех полипептидных цепях и всех структурных областях молекулы фибриногена, за исключением E области.

В неокисленном образце также были обнаружены окислительные модификации остатков: A $\alpha$ Met91, A $\alpha$ Met207, A $\alpha$ Met240, A $\alpha$ Trp276, A $\alpha$ Met476, A $\alpha$ Met517, A $\alpha$ Met584, B $\beta$ Met118, B $\beta$ Met190, B $\beta$ Met305, B $\beta$ Met314, B $\beta$ Met367,  $\gamma$ Met78 и  $\gamma$ Trp227, что может быть объяснено базовым окислением молекулы ФГ в плазме крови, а также дополнительным окислением в процессе его препаративного выделения, хранения и анализа. Практически все аминокислотные остатки, модифицированные в контроле, демонстрируют умеренную степень окисления, которая существенно возрастает при индуцированном окислении.

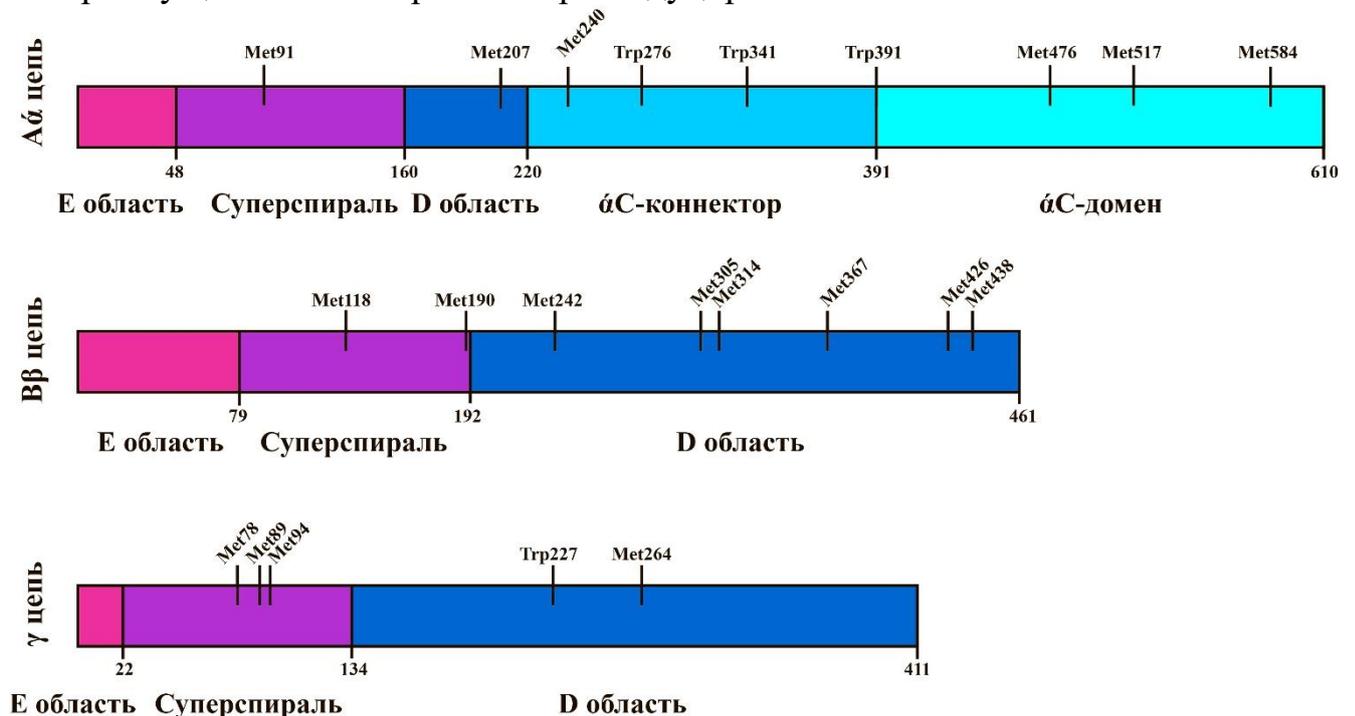


Рисунок 5 – Схематическое изображение полипептидных цепей фибриногена с детектированными окислительными модификациями

Локализованные в E области аминокислотные остатки, которые участвуют в связывании тромбина (A $\alpha$ Trp33, A $\alpha$ Phe35, A $\alpha$ Asp38, A $\alpha$ Glu39, B $\beta$ Ala68, B $\beta$ Asp69,

$\gamma$ Asp27 и  $\gamma$ Ser30, не были подвержены окислительной модификации, что указывает на сохранение тромбин-связывающих сайтов ФГ при окислении. Содержащей наибольшее количество окислительных сайтов является  $\alpha$ C-область (A $\alpha$ Met240, A $\alpha$ Trp276, A $\alpha$ Trp341, A $\alpha$ Trp391, A $\alpha$ Met476, A $\alpha$ Met517, A $\alpha$ Met584).

Для окисленного белка наблюдается замедление накопления  $\alpha$ - $\alpha$  полимеров и  $\gamma$ - $\gamma$  димеров, о чем свидетельствует также увеличение количества исходных A $\alpha$  и  $\gamma$  цепей (Рисунок 4Б). FXIIIa образует ковалентные сшивки между  $\gamma$ Gln398/399 и  $\gamma$ Lys406, продуцируя  $\gamma$ - $\gamma$  димеры и, с более медленной скоростью,  $\alpha$ - $\alpha$  полимеры между A $\alpha$ -цепями в нескольких сайтах: A $\alpha$ Gln328, A $\alpha$ Gln336, A $\alpha$ Lys508, A $\alpha$ Lys556 и A $\alpha$ Lys562. Все детектированные остатки  $\gamma$ Gln398/399 и  $\gamma$ Lys406, A $\alpha$ Gln336, A $\alpha$ Lys508 оставались в нативной форме при окислении. Это может служить дополнительным доказательством того, что ингибирование реакции ковалентного сшивания цепей фибриногена при окислении не является следствием нарушения структуры каталитических сайтов, а обусловлено конформационными перестройками в окисленном белке, делающие эти каталитические сайты менее доступными для FXIIIa. Среди участков молекулы, подверженных плазминовому гидролизу, также не обнаружены сайты окислительных модификаций.

***Индукцированное HOCl/OCl окисление фибриногена: влияние на структуру и функционирование.*** В данной главе описаны результаты исследования окисления фибриногена, индуцированного HOCl/OCl. HOCl/OCl обладает мощными бактерицидными свойствами и играет важную роль в иммунной системе человека, однако этот окислитель также вызывает повреждение тканей, особенно при воспалительных состояниях.

Для мониторинга кинетики катализируемого тромбином превращения фибриногена в фибрин измеряли изменение поглощения фибриновых гелей при длине волны 350 нм во времени (Рисунок 6А). При повышении концентрации HOCl/OCl наблюдается уменьшение максимального наклона полимеризационной кривой, что свидетельствует о замедлении процесса гелеобразования. Также значительно снижается показатель максимальной оптической плотности (на 9% при концентрации HOCl/OCl 25 мкМ, 46% - при 50 мкМ, и на 92% при 100 мкМ HOCl/OCl), т.е. гель становится более прозрачным, что указывает на изменение структуры геля. Окисление фибриногена 10 мкМ HOCl не повлияло на кинетику сборки фибрина, которая была аналогична кинетике контрольного фибринового сгустка (Рисунок 6А, Б)

Кинетика плазминового гидролиза фибриновой сети, образованной из окисленного 10 мкМ HOCl/OCl фибриногена, не отличалась от таковой в контрольном образце (Рисунок 6Г). Начиная с концентрации окислителя 25 мкМ, в образцах наблюдается увеличение времени полулизиса, что свидетельствует о значительном замедлении гидролиза фибрина (Рисунок 6Д). При 25 мкМ окислителе максимальный наклон кривой деградациии сгустков фибрина ( $V_{\max}$ ) снижается в 1,2 раза по сравнению с контролем, а при обработке 100 мкМ – в 3,2 раза (Рисунок 6Е). Эти эффекты напрямую связаны с более высокой плотностью волокон окисленной фибриновой сети, состоящей из более тонких волокон, более устойчивых к фибринолизу.

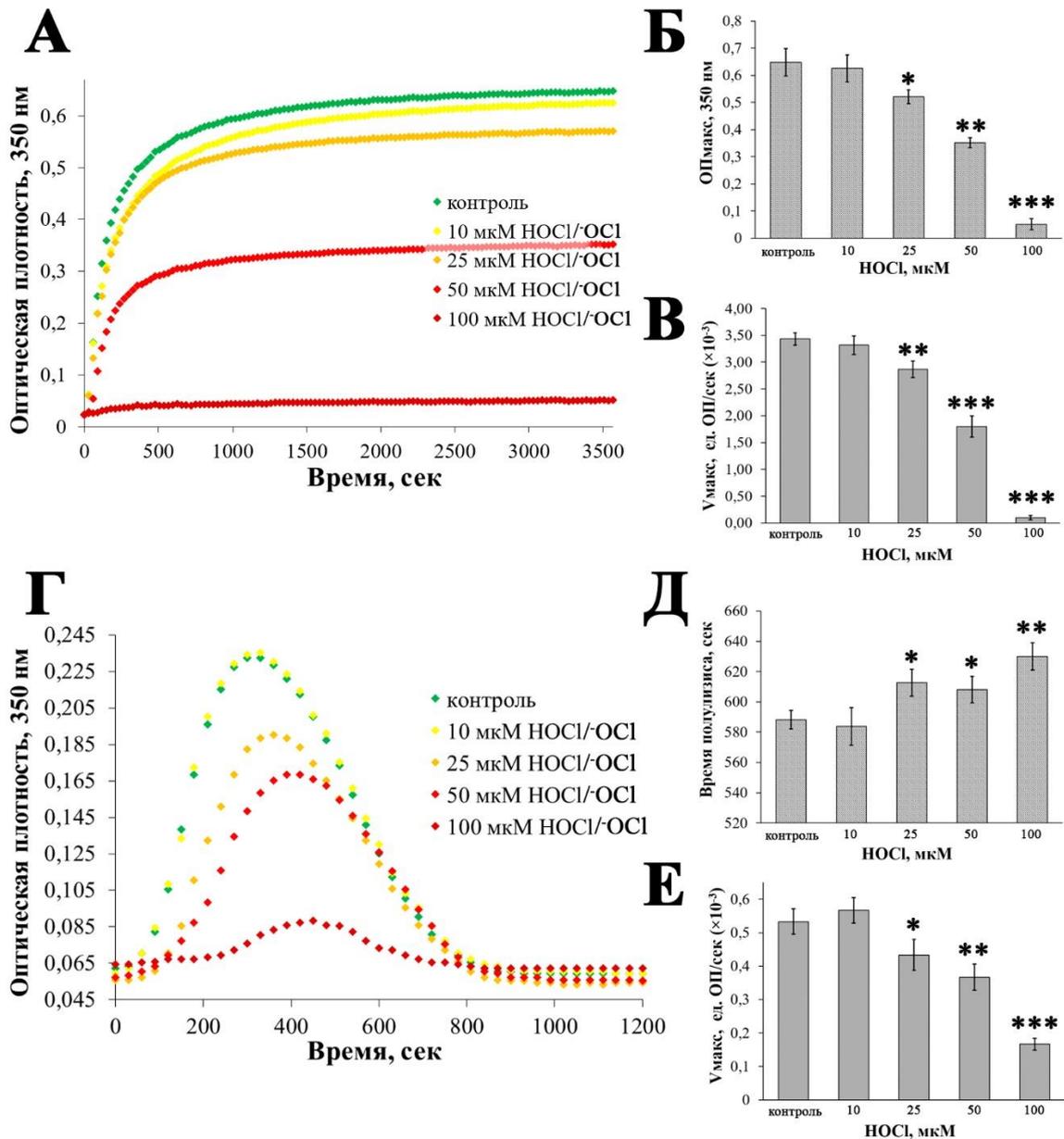


Рисунок 6 – Анализ влияния окисления НОСІ/ОСІ на формирование фибринового сгустка и фибринолиз. (А) Кривые полимеризации фибрина, образованного из неокисленного фибриногена и фибриногена, окисленного НОСІ/ОСІ в указанных концентрациях. (Б) Максимальная мутность растущих сгустков фибрина, образовавшихся из нативного и окисленного фибриногена, регистрируемая через 60 минут после начала полимеризации (В)  $V_{\text{макс}}$  кривых полимеризации фибрина, образованного из неокисленного и окисленного фибриногена. (Г) Кривые фибринолиза сгустка, образованного из нативного и окисленного фибриногена и фибриногена. (Д) Время полулизиса сгустка, образованного из нативного и окисленного фибриногена. (Е)  $V_{\text{макс}}$  деградации сгустков фибрина, образовавшихся из нативного и окисленного фибриногена. Статистический анализ был основан на тесте Т-теста Стьюдента, а значения  $p$  указаны по сравнению с контрольной выборкой ( $N = 6$ ). Значимость была установлена на уровне  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)). Гистограммы Б, В, Д и Е показывают среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение

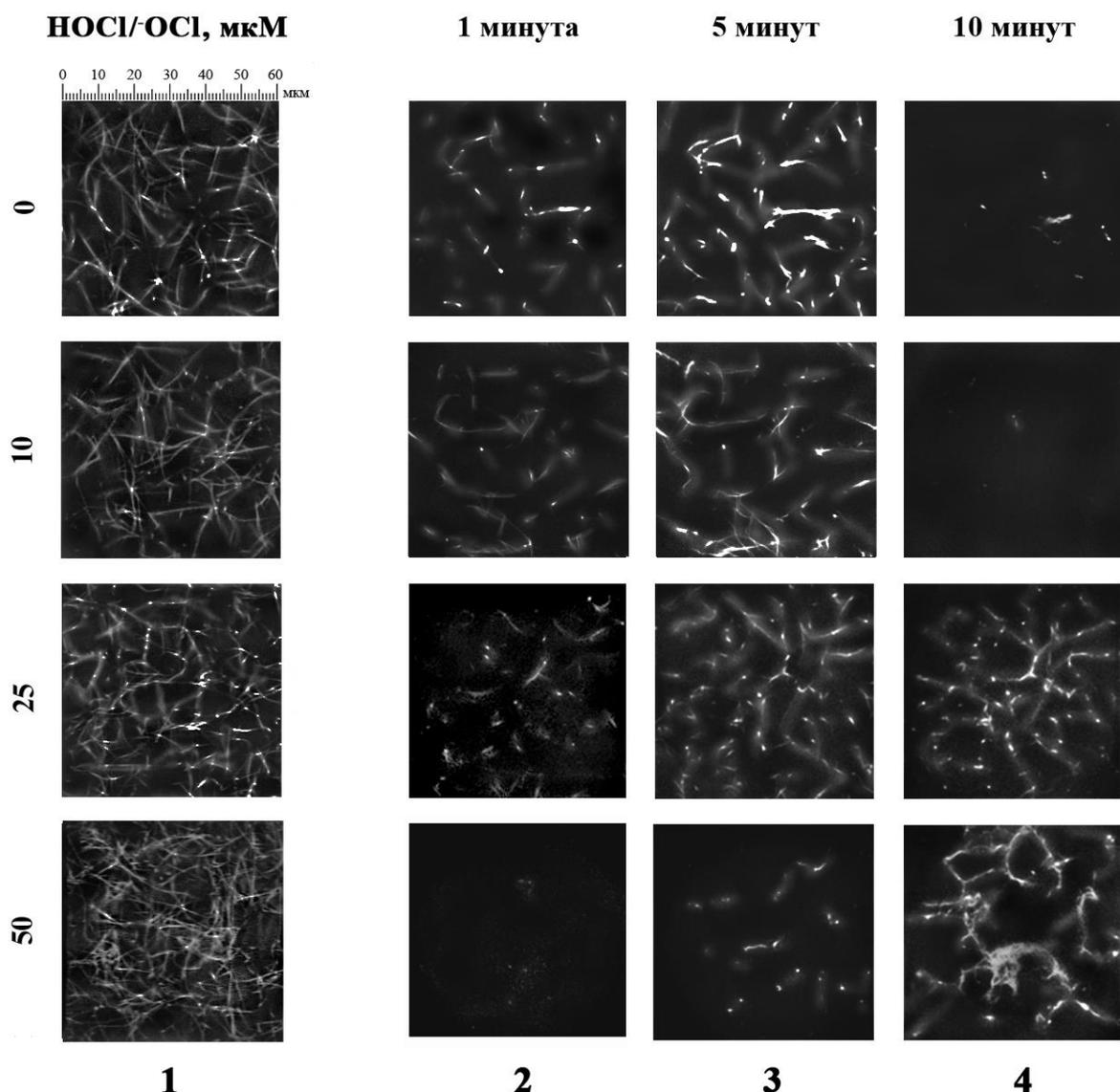


Рисунок 7 – Архитектура фибринового сгустка, образованного из нативного фибриногена и окисленного НОС1/ОС1 фибриногена (столбец 1) и динамика распределения плазима(огена) при фибринолизе (столбцы 2-4)

Полученные методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) изображения фибринового геля из ФИТЦ-меченного фибриногена позволяют визуализировать изменения в статической структуре сгустка (Рисунок 7, столбец 1). Образцы гелей, полученных из нативного и обработанного 10 мкМ НОС1/ОС1 фибриногена, не показали значительных различий в структуре. При концентрациях НОС1/ОС1 25 и 50 мкМ отчетливо видно уплотнение геля и меньший размер гелевых пор по сравнению с нативным образцом.

Для исследования распределения плазима при фибринолизе фибриновый гель получали из немеченого фибриногена. На первом этапе ФИТЦ-меченный плазмин(оген) связывается с волокнами фибрина, визуализируя структуру сети. С течением времени происходит гидролиз геля (Рисунок 7, столбцы 2-4). Нативный фибриноген и фибриноген, обработанный 10 мкМ НОС1/ОС1, демонстрируют схожую динамику: визуализация фибриновой сети начинается уже с конца первой

минуты, к 5 минутам сеть визуализирована полностью, и к 10 минутам наблюдается почти полный ее гидролиз. Для фибриногена, обработанного 25 и 50 мкМ окислителя, процессы визуализации геля и его гидролиза в существенной мере замедлены.

Угловые зависимости интенсивности упругого светорассеяния от  $\sin(\theta/2)$  для различных образцов фибрина свидетельствовали о наличии отличающихся по наклону прямых линий, проходящих через начало координат (Рисунок 8). В случае фибрина, который можно рассматривать как сеть очень длинных прямых волокон переменной длины, соединенных вместе в некоторых хаотически распределенных узловых точках, отношение Рэлея описывается как:

$$R(\theta) = cK\lambda_0\mu/4n_0\sin(\theta/2), \quad (1)$$

где  $c$  – концентрация белка;

$\mu = M/L$  – среднее отношение массы к длине волокна;

$n_0$  – показатель преломления растворителя;

$K$  – константа для вертикально поляризованного луча.

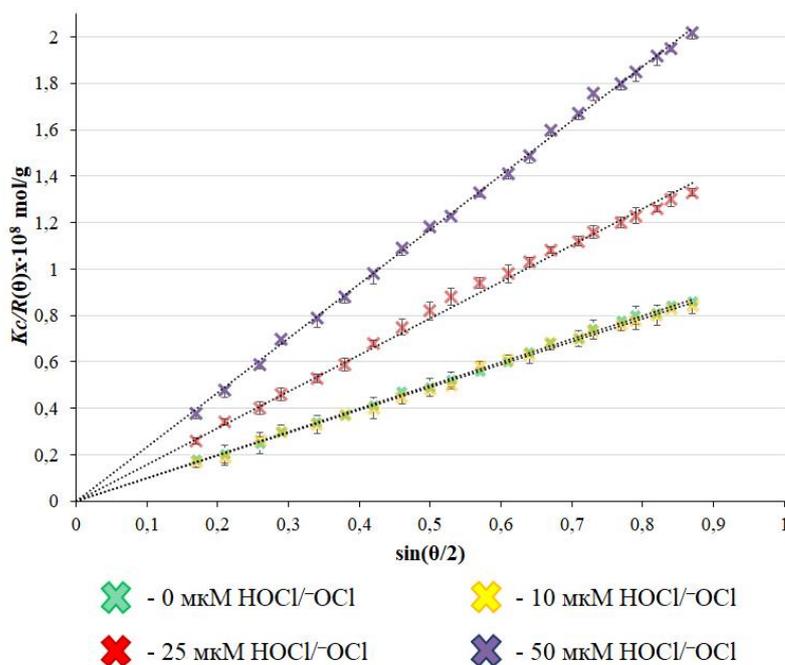


Рисунок 8 – Угловые зависимости интенсивности упругого светорассеяния образцов фибрина

Исходя из вышеприведенного уравнения (1), тангенс угла наклона прямых линий позволяет вычислить значения  $\mu$ . Для гелей фибрина, приготовленных либо из нативного фибриногена, либо окисленного 10 мкМ HOCl/OCl, величина отношения масса/длина составила  $(8,43 \pm 0,38) \times 10^{12}$  или  $(8,37 \pm 0,29) \times 10^{12}$  г/(моль·см), соответственно, что указывает на отсутствие влияния низкой концентрации окислителя на структуру фибриновой сетки при сравнении с контрольным образцом (Рисунок 8). Поскольку сильно вытянутая стержнеобразная

молекула фибриногена имеет длину около 45 нм и диаметр 2 – 5 нм, значение  $\mu$  для этого белка составляет  $\sim 7,55 \times 10^{10}$  г/(моль·см). Таким образом, среднее поперечное сечение волокон нативного и окисленного 10 мкМ HOCl/OCl фибрина более чем в сто раз превышает поперечное сечение молекулы фибриногена. Однако значение  $\mu$  для фибриновых волокон, сформированных из окисленного 25 и 50 мкМ HOCl/OCl фибриногена, оказалось равным  $(6,61 \pm 0,26) \times 10^{12}$  и  $(3,09 \pm 0,23) \times 10^{12}$  г/(моль·см) соответственно, т.е. такой фибрин характеризовался более тонкой фибриллярной структурой по сравнению с контролем. Принимая средний диаметр молекулы фибриногена, равным 3,5 нм, можно получить величины толщин фибрилл:  $\sim 37,0$ ,  $32,3$  и  $22,4$  нм для образцов фибрина, образованных из фибриногена, окисленного 10, 25 и 50 мкМ HOCl/OCl, соответственно.

Методом ВЭЖХ-МС/МС выявлено окисление 24 аминокислотных остатка в присутствии HOCl: A $\alpha$ Met91, A $\alpha$ Lys125, A $\alpha$ Lys129, A $\alpha$ Met207, A $\alpha$ Met240, A $\alpha$ Trp276, A $\alpha$ Met476, A $\alpha$ Pro511, A $\alpha$ Met517, A $\alpha$ Met584, B $\beta$ Met190, B $\beta$ Met224, B $\beta$ Pro235, B $\beta$ Met305, B $\beta$ Trp317, B $\beta$ Met367, B $\beta$ Met373, B $\beta$ Trp418, B $\beta$ Trp424, B $\beta$ Met426,  $\gamma$ Met78,  $\gamma$ Met89,  $\gamma$ Met94 и  $\gamma$ Met264. Среди ПТМ, обнаруженных в этих аминокислотных остатках, детектированы следующие типы модификаций: сульфоксид метионина, за счет присоединения одного (+15,99) атома кислорода к боковой цепи; отщепление CH<sub>2</sub>SOH (детиометила) из боковой цепи сульфоксида метионина (-48,00); окисление лизина до аминокадипинового полуальдегида (-1,03) и окисление пролина до пирролидона (-27,99).

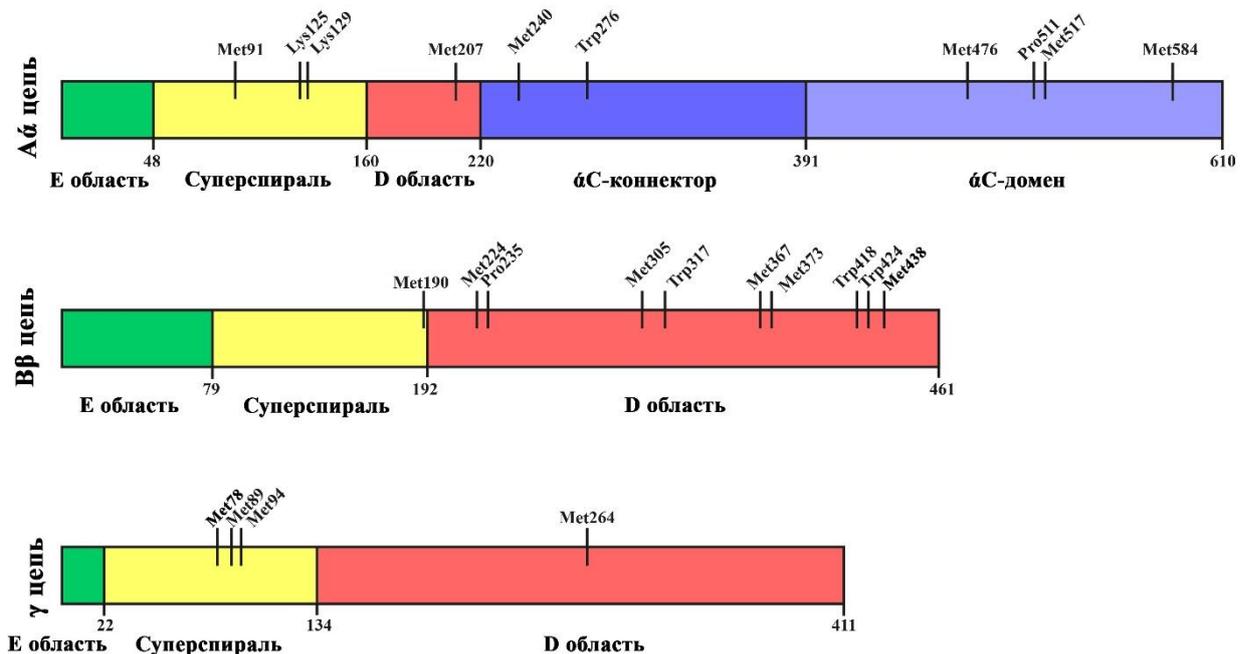


Рисунок 9 – Схематическое изображение полипептидных цепей фибриногена с детектированными окислительными модификациями

Присутствие окислительных модификаций аминокислотных остатков в контрольном образце можно объяснить окислением во время подготовки и хранения образца. Как видно из Рисунка 9, модифицированные аминокислотные

остатки присутствуют во всех трех полипептидных цепях фибриногена. При рассмотрении отдельных цепей фибриногена можно отметить, что наименьшее количество центров окисления выявлено в  $\gamma$ -цепи, а наиболее окисляемыми структурными участками оказались области D.

Данные ВЭЖХ-МС/МС показывают, что метионины (16 из 24) являются преобладающей мишенью для окислителя. Остатки триптофана ( $\text{A}\alpha\text{Trp}276$ ,  $\text{В}\beta\text{Trp}317$ ,  $\text{В}\beta\text{Trp}418$  и  $\text{В}\beta\text{Trp}424$ ), пролина ( $\text{A}\alpha\text{Pro}511$  и  $\text{В}\beta\text{Pro}235$ ) и лизина ( $\text{A}\alpha\text{Lys}125$  и  $\text{A}\alpha\text{Lys}129$ ) также участвовали в окислительной модификации. Участки окисления присутствовали во всех структурных элементах белка, за исключением области E. В суперспиральной структуре (участки  $\text{A}\alpha 50\text{--}160$ ,  $\text{В}\beta 81\text{--}192$ ,  $\gamma 24\text{--}134$ ) присутствуют остатки  $\text{A}\alpha\text{Met}91$ ,  $\text{A}\alpha\text{Lys}125$ ,  $\text{A}\alpha\text{Lys}129$ ,  $\text{В}\beta\text{Met}190$ ,  $\gamma\text{Met}78$ ,  $\gamma\text{Met}89$  и  $\gamma\text{Met}94$ , модифицированные в результате окисления до сульфоксида метионина и аминокадипинового полуальдегида. В пределах двух периферических областей D (участки  $\text{A}\alpha 161\text{--}220$ ,  $\text{В}\beta 193\text{--}461$  и  $\gamma 135\text{--}427$ ) остатки  $\text{A}\alpha\text{Met}207$ ,  $\text{В}\beta\text{Met}224$ ,  $\text{В}\beta\text{Pro}235$ ,  $\text{В}\beta\text{Met}305$ ,  $\text{В}\beta\text{Trp}317$ ,  $\text{В}\beta\text{Met}367$ ,  $\text{В}\beta\text{Met}373$ ,  $\text{В}\beta\text{Trp}418$ ,  $\text{В}\beta\text{Trp}424$  и  $\gamma\text{Met}264$  были окислены.  $\text{A}\alpha\text{Met}476$ ,  $\text{A}\alpha\text{Pro}511$ ,  $\text{A}\alpha\text{Met}517$  и  $\text{A}\alpha\text{Met}584$ , локализованные в  $\alpha\text{C}$ -домене (392–610), и остатки  $\text{A}\alpha\text{Met}240$ ,  $\text{A}\alpha\text{Trp}276$  в  $\alpha\text{C}$ -коннекторе (221–391) также являются мишенями для окислителя.

Среди обнаруженных окислительных модификаций в фибриногене, обработанным 10 мкМ  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$ , остатки  $\text{A}\alpha\text{Met}476$ ,  $\text{A}\alpha\text{Met}517$ ,  $\text{A}\alpha\text{Met}584$ ,  $\text{В}\beta\text{Met}367$ ,  $\gamma\text{Met}264$  и  $\gamma\text{Met}94$  были значительно модифицированы по сравнению с таковыми у нативного белка. Соответственно, так как их окисление не оказывало влияние на функциональную активность белка, можно предположить, что эти аминокислотные остатки метионина являются перехватчиками АФК, и, таким образом, играют важную роль в антиоксидантной защите фибриногена, защищая от окислительного повреждения его функционально значимые аминокислотные остатки. Тот факт, что остатки  $\text{A}\alpha\text{Met}476$ ,  $\text{A}\alpha\text{Met}517$ ,  $\text{A}\alpha\text{Met}584$ ,  $\text{В}\beta\text{Met}367$ ,  $\text{Met}264$  и  $\gamma\text{Met}94$  (Рисунок 10), идентифицированные в настоящем исследовании, проявляли высокую реакционную способность по отношению к окислителю, указывает, как упоминалось выше, на их пространственную локализацию, делающим их доступными растворителю. Это согласуется с данными, касающимися структуры и динамики нативного фибриногена в растворе, основанными на скоростях водород/дейтериевого обмена.

Поверхностно-локализованные остатки метионина, встроенные в первичную структуру белков, способны напрямую перехватывать АФК, тем самым, противодействуя или смягчая их вредное действие на другие функционально важные аминокислотные остатки. Поэтому поиск антиоксидантных метионинов в белках, очевидно, необходим для лучшего понимания механизма их функционирования в условиях окислительного стресса.

Что касается фибриногена, то на сегодняшний день остается неизвестной функция целого ряда остатков метионина в различных структурных участках молекулы фибриногена. Однако обнаруженные в настоящем исследовании антиоксидантные метионины,  $\text{A}\alpha\text{Met}476$ ,  $\text{A}\alpha\text{Met}517$ ,  $\text{A}\alpha\text{Met}584$ ,  $\text{В}\beta\text{Met}367$ ,  $\gamma\text{Met}264$  и  $\gamma\text{Met}94$  позволяют лучше понять природу сохранения функциональности фибриногена в кровотоке в условиях развития окислительного стресса.

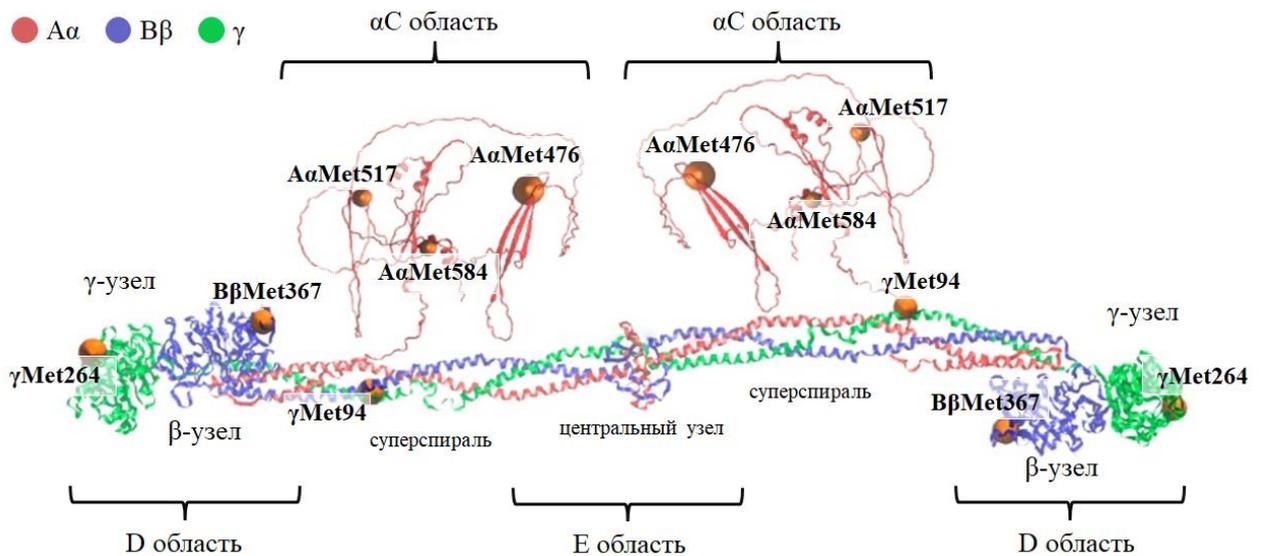


Рисунок 10 – 3D-структура молекулы фибриногена с отмеченными остатками метионинов – перехватчиков АФК. Для создания рисунка использована модель кристаллической структуры фибриногена PDB:3GHG и спрогнозированная AlphaFold структура αC-области P02671-F1

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Живые организмы постоянно подвергаются воздействию высокореакционных продуктов, являющихся производными кислорода, получивших обобщенное название - активные формы кислорода (АФК). В организме человека более 95% свободных радикалов относятся к свободным радикалам кислорода. Эти продукты могут продуцироваться экзогенно, как вредные вещества в атмосфере, и эндогенно, как побочные продукты ферментативных реакций клеточного метаболизма.

АФК могут вызывать химические модификации боковых цепей аминокислотных остатков, образование белок-белковых поперечных связей и фрагментацию белка, как следствие разрыва полипептидной цепи белка. Существуют убедительные доказательства того, что белки, подвергающиеся окислительным посттрансляционным модификациям, с измененной структурой и нарушением функций, накапливаются при старении и в результате развития различных заболеваний, сопровождающихся окислительным стрессом. В плазме, в отличие от внутриклеточной среды, отсутствует значительная часть антиоксидантов и других защитных систем, способных обеспечить адекватную защиту белков от вредного действия метаболитов кислорода.

Фибриноген, постоянно циркулирующий в плазме крови, является одним из наиболее изучаемых белков в отношении его окисления и функциональных изменений. Такой повышенный интерес к этому белку обусловлен его огромной значимостью в гемостазе и во многих других физиологических и патофизиологических процессах. В то время как некоторые патологические состояния характеризуются изменением уровня фибриногена, другие связаны с изменением структурно-функциональных особенностей молекулы, в т. ч. при ее

окислении.

Сопоставление данных, полученных при индуцированной окислительной модификации фибриногена, выявляет общие интересные закономерности. Во-первых, область E фибриногена является наименее уязвимой к действию окислителей по сравнению с другими структурными элементами белка, в том числе, областью D. Вторая повторяющаяся закономерность связана с сохранением при окислительной модификации структурной целостности целого ряда аминокислотных остатков и пептидных фрагментов, играющих ключевую роль в функционировании фибриногена и, прежде всего, относящихся к структурам ‘funnel-shaped’ домена, полимеризационных сайтов “knob A: hole a”, “knob B: hole b” и D:D интерфейса. Наконец, суперспиральная структура,  $\alpha$ C-домены и  $\alpha$ C-коннекторы, наряду с областью D, проявляли высокую чувствительность к воздействию окислителей. Окислительная модификация ряда аминокислотных остатков в этих структурных элементах приводит к ухудшению латеральной агрегации фибрилл.

Данные ВЭЖХ-МС/МС показывают, что аминокислотные остатки метионина (A $\alpha$ Met91, A $\alpha$ Met207, A $\alpha$ Met240, A $\alpha$ Met476, A $\alpha$ Met517, A $\alpha$ Met584, B $\beta$ Met190, B $\beta$ Met224, B $\beta$ Met305, B $\beta$ Met367, B $\beta$ Met373,  $\gamma$ Met89,  $\gamma$ Met91 и  $\gamma$ Met264) были преобладающей мишенью для окислителя. Окисление остатков A $\alpha$ Met476, A $\alpha$ Met517, A $\alpha$ Met584, B $\beta$ Met367,  $\gamma$ Met264 и  $\gamma$ Met94 не оказывало влияния на функциональную активность белка. Можно предположить, что эти аминокислотные остатки метионина являются перехватчиками АФК, и, таким образом, играют важную роль в антиоксидантной защите фибриногена, защищая от окислительного повреждения его функционально значимые аминокислотные остатки.

Комплексом физико-химических и биохимических методов исследовано влияние окислителей на функциональные свойства фибриногена. Методы УСР и КЛСМ продемонстрировали изменения структуры гелей фибрина в результате обработки фибриногена окислителями. Полученные фибриновые гели обладают более тонкими фибриллами по сравнению с нативным сгустком. Эти эффекты прямо коррелируют с увеличением концентрации окислителя. Методом ПААГ-электрофореза показано, что способность  $\gamma$  и  $\alpha$  полипептидных цепей окисленного фибрина образовывать в присутствии FXIIIa  $\gamma$ -димеры и  $\alpha$ - $\alpha$  полимеры снижалась. Чувствительность окисленного фибриногена к плазминовому гидролизу возрастала.

Исследование окислительной модификации фибриногена *in vitro* вносит вклад в понимание процессов адаптации плазменных белков к воздействию окислителей в условиях отсутствия в плазме крови систем антиоксидантной защиты. Полученные данные, касающиеся альтерации химической структуры белка и его функциональной активности, позволяют расширить понимание механизма нарушения структуры и функции фибриногена, в том числе, *in vivo*, при развитии патологических состояний, ассоциированных с окислительным стрессом.

## ВЫВОДЫ

1. Методом ВЭЖХ-МС/МС установлено, что окислительной

модификации наиболее подвержены остатки метионина, триптофана и гистидина. Самый высокий уровень окислительной модификации приходится на остатки метионинов. Наиболее распространенными типами модификаций являются: присоединение одного и двух атомов кислорода к боковой цепи; окисление триптофана до оксолактона и кинуренина; окисление гистидина до аспарагина и аспарагиновой кислоты.

2. Наиболее подверженными окислительной модификации структуры фибриногена являются  $\alpha$ C-области и D-области. Наименее уязвимой к окислению является E область, содержащая ключевые функциональные участки, такие как тромбин-связывающие сайты в 'funnel-shaped' домене. Аминокислотные остатки, входящие в известные структуры, ответственные за сборку протофибрилл, их латеральную агрегацию, а также участки взаимодействия фибриногена с плазмином и активированным FXIII, не затронуты окислением.

3. Комплексом физико-химических и биохимических методов выявлено, что полученные из окисленного фибриногена фибриновые гели обладают более тонкими фибриллами и высокой плотностью по сравнению с нативным сгустком. Способность окисленного фибрина образовывать в присутствии активированного FXIII  $\gamma$ -димеры и  $\alpha$ - $\alpha$  полимеры снижается. Чувствительность окисленного фибриногена к плазминовому гидролизу возрастает. Окисление фибриногена 10 мкМ HOCl/OCl<sup>-</sup> не оказывает влияния на функциональную активность белка.

4. Высокое содержание легко окисляемых аминокислотных остатков в составе  $\alpha$ C-области, а также ее пространственное расположение в молекуле фибриногена, ограничивающее доступ АФК к центральной E области, вносят вклад в резистентность исследуемого белка к окислительному стрессу. Окисленные остатки метионина (A $\alpha$ Met476, A $\alpha$ Met517, A $\alpha$ Met584, B $\beta$ Met367,  $\gamma$ Met264 и  $\gamma$ Met94), модификация которых не влияет на функциональные свойства фибриногена, могут являться внутримолекулярными перехватчиками АФК. Превращение этих метионинов в метионин сульфоксиды является, по всей видимости, преобладающим механизмом, способным защитить молекулу фибриногена от функционального повреждения в кровотоке при развитии окислительного стресса.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:**

1. Юрина, Л.В. Гипохлорит-индуцированная окислительная модификация фибриногена / Л.В. Юрина, А.Д. Васильева, А.Е. Бугрова, М.И. Индейкина, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Розенфельд // Доклады академии наук. – 2019. – Т. 484, № 3. – С. 367–371.

2. Yurina, L.V. Ozone-induced damage of fibrinogen molecules: identification of oxidation sites by high-resolution mass spectrometry / L.V. Yurina, A.D. Vasilyeva, M.I. Indeykina, A.E. Bugrova, M.I. Biryukova, A.S. Kononikhin, E.N. Nikolaev, M.A. Rosenfeld // Free Radical Research. – 2019. – V. 53, № 4. – P. 430-455.

3. Юрина, Л.В. Структурно-функциональные повреждения фибриногена

в результате пероксид-индуцированного окисления / Л.В. Юрина, А.Д. Васильева, В.Л. Кононенко, А.Е. Бугрова, М.И. Индейкина, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Розенфельд // Доклады российской академии наук. Науки о жизни. – 2020. – Т. 492, № 1. – С. 287–292.

4. Розенфельд, М.А. Функциональная роль окисления метионинов в белках: аргументы “за” и “против” / М.А. Розенфельд, Л.В. Юрина, А.Д. Васильева // Успехи современной биологии. – 2021. – Т. 141, № 4. – С. 315–335.

5. Юрина, Л.В. Влияние гипохлорит- и пероксид- индуцированного окисления фибриногена на структуру фибрина / Л.В. Юрина, А.Д. Васильева, Л.А. Вассерман, Н.А. Подоплелова, М.А. Пантелеев, М.А. Розенфельд // Доклады российской академии наук. Науки о жизни. – 2021. – Т. 499, № 1. – С. 364-369.

6. Yurina, L.V. The effect of hypochlorite-induced fibrinogen oxidation on the protein structure, fibrin self-assembly, and fibrinolysis / L.V. Yurina, A.D. Vasilyeva, E.G. Evtushenko, E.S. Gavrilina, S.I. Obydennyi, I.A. Chabin, M.I. Indeykina, A.S. Kononikhin, E.N. Nikolaev, M.A. Rosenfeld // Russian Journal of Physical Chemistry B. – 2024. – V. 18, № 2. – P. 521–526.

7. Yurina, L.V. A role of methionines in the functioning of oxidatively modified fibrinogen / L.V. Yurina, A.D. Vasilyeva, E.S. Gavrilina, V.S. Ivanov, S.I. Obydennyi, I.A. Chabin, M.I. Indeykina, A.S. Kononikhin, E.N. Nikolaev, M.A. Rosenfeld // BBA-Proteins&Proteomics. – 2024. – V. 1872, № 4. – 141013.

#### **Тезисы докладов на конференциях:**

1. Юрина, Л.В. Исследование влияния озон-индуцированного свободнорадикального окисления фибриногена методом масс-спектрометрии / Л.В. Юрина, А.Д. Васильева, А.В. Бычкова, А.Е. Бугрова, М.И. Индейкина, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Розенфельд // Тезисы XXIX зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – 2017 г. – С. 71.

2. Юрина, Л.В. Исследование влияния окислительной модификации на структуру и функции фибриногена методом масс-спектрометрии / Л.В. Юрина, А.Д. Васильева, А.Е. Бугрова, М.И. Индейкина, А.С. Кононихин. // XII Международная (XXI Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых. Сборник тезисов. – 2017 г. – С. 53–54.

3. Юрина, Л.В. Определение сайтов окислительных модификаций фибриногена методом масс-спектрометрии / Л.В. Юрина, А.Д. Васильева, А.В. Бычкова, А.Е. Бугрова, М.И. Индейкина, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Розенфельд // 21-я Международная Школа-конференция «Биология - наука XXI века». Сборник тезисов. – 2017 г. – С. 146.

4. Юрина, Л.В. Исследование влияния индуцированного окисления на структуру и функции фибриногена / Л. В. Юрина, А. Д. Васильева, А. В. Бычкова, А. Е. Бугрова, М. И. Индейкина, М.А. Розенфельд, А.В. Бычкова // X Всероссийский конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз – 2017». Сборник тезисов. – 2017. – С. 279 – 280.

5. Юрина, Л.В. Исследование влияния окислительных модификаций на структуру и функции фибриногена / Л.В. Юрина, А.Д. Васильева, А.В. Бычкова,

А.Е. Бугрова, М.И. Индейкина, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Розенфельд // Труды XVII Ежегодной международной молодежной конференции "Биохимическая физика" ИБХФ РАН-ВУЗы. – 2018. С. 1–4.

6. Юрина, Л.В. Исследование окислительных модификаций фибриногена при индуцированном окислении / Л.В. Юрина, А.Д. Васильева, М.И. Индейкина, А.Е. Бугрова, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Розенфельд // Четвертый междисциплинарный научный форум с международным участием "Новые материалы и перспективные технологии". – 2018 г – С. 217–220.

7. Юрина, Л.В. Свободнорадикальное окисление молекул фибриногена: их окислительная модификация и влияние на превращение в фибрин / Л.В. Юрина, А.Д. Васильева, М.И. Индейкина, А.Е. Бугрова, А.В. Бычкова, Н.А. Подоплелова, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Пантелеев, М.А. Розенфельд // 22-я Международная Школа-конференция «Биология - наука XXI века». Сборник тезисов. – 2018 г. – С. 208.

8. Yurina, L. The effects of oxidation on the fibrinogen molecule and its functional properties / L. Yurina, A. Vasilyeva, M. Indeykina, A. Bugrova, A. Bychkova, M. Biryukova, N. Podoplelova, A. Kononikhin, E. Nikolaev, M. Panteleev, M. Rosenfeld // FEBS Open Bio. – 2018. – 8(S1). – P. 412.

9. Юрина, Л.В. Гипохлорит-индуцированная окислительная модификация фибриногена: структурно-функциональные нарушения / Л.В. Юрина, А.Д. Васильева, А.Е. Бугрова, М.И. Индейкина, Д.Ю. Азарова, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Розенфельд // 23-я Международная Школа-конференция «Биология - наука XXI века». Сборник тезисов. – 2019. – С. 195.

10. Yurina, L. The investigation of hypochlorite-induced oxidative modification of fibrinogen by high-resolution mass spectrometry / L. Yurina, A. Vasilyeva, M. Indeykina, A. Bugrova, D. Azarova, V. Leonova, A. Kononikhin, E. Nikolaev, M. Panteleev, M. Rosenfeld // FEBS Open Bio. – 2019. – 9(S1). – P. 407.

11. Юрина, Л.В. Исследование влияния индуцированного окисления на молекулу фибриногена: окислительные модификации и их возможный вклад в нарушение функциональных свойств / Л.В. Юрина, А.Д. Васильева, В.С. Иванов, А.Е. Бугрова, М.И. Индейкина, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Розенфельд // Материалы X Международной конференции «Биоантиоксидант», посвященной 105-летию со дня рождения академика Н.М. Эмануэля. – 2020. – С. 112 – 113.

12. Азарова, Д.Ю. Окислительные модификации фибриногена, вызванные свободно-радикальным окислением / Д.Ю. Азарова, Е.С. Гаврилина, Л.В. Юрина, А.Д. Васильева, М.И. Индейкина, А.Е. Бугрова, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Розенфельд // Сборник тезисов докладов IX Всероссийской научной молодежной школы-конференции «Химия, физика, биология: пути интеграции». – 2022. – С. 6– 7.

13. Юрина, Л.В. Исследование влияния окисления на структуру фибринового сгустка / Л.В. Юрина, А.Д. Васильева, Е.Г. Евтушенко, Е.С. Гаврилина, С.И. Обыденный, И.А. Чабин, М.И. Индейкина, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Розенфельд // Труды XXII Ежегодной международной молодежной конференции "Биохимическая физика" ИБХФ РАН-ВУЗы. – 2023. С. 1–4.