

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ ИМ. Н.М. ЭМАНУЭЛЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Юрина Любовь Владимировна

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

1.5.2. Биофизика

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Розенфельд Марк Александрович

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Современные представления о структуре фибриногена.....	13
1.1.1. Структура молекулы фибриногена	13
1.1.2. Полимеризация фибрина, опосредованная тромбином	15
1.1.3. Продольная агрегация мономеров фибрина: роль D:D взаимодействий	17
1.1.4. Взаимодействия α C-областей при образовании волокон фибрина	18
1.1.4. Ветвление протофибрилл – образование трехмерной структуры фибринового геля.....	19
1.1.6. Взаимодействие фибрин(оген)а с клетками и плазменными белками....	21
1.2. Роль фибриногена в воспалительном процессе	22
1.2.1. Фибриноген – фактор свертывания крови с провоспалительной ролью	22
1.2.2. Фибриноген и воспаление.....	24
1.2.3. Фибриноген как фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний.....	25
1.2.4. Механизмы участия фибриногена в иницировании и развитии новообразований	26
1.2.5. Роль фибриногена в развитии неврологических заболеваний с нарушением ГЭБ	27
1.3. Активные формы кислорода и окисление белков	29
1.3.1. Окислительная модификация белковых молекул	29
1.3.2. Окислительные посттрансляционные модификации аминокислотных остатков.....	31
1.3.3. Роль остатков цистеина и метионина в поддержании стабильности внутриклеточных белков.....	34
1.3.4. Антиоксидантный потенциал белков плазмы крови.....	35
1.3.5. Нарушение структуры и функции фибриногена при окислении.....	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	41
2.1. Материалы	41
2.2. Методы	41
2.2.1. Спиртовое выделение фибриногена	41
2.2.2. Осаждение фибриногена из плазмы глицином.....	42
2.2.3. Выделение FXIII из плазмы крови человека.....	42

2.2.4. Выделение плазминогена из плазмы крови человека	43
2.2.5. Окисление фибриногена O_3	43
2.2.6. Окисление фибриногена H_2O_2	44
2.2.7. Окисление фибриногена $HOCl/OCl^-$	44
2.2.8. Измерение спектров поглощения образцов окисленного фибриногена .	44
2.2.9. Ковалентная сшивка полипептидных цепей фибрина, катализируемая FXIIIa	45
2.2.10. Накопление продуктов деградации молекул фибриногена под действием плазмина	45
2.2.11. Оценка скорости образования и плазминового гидролиза фибрина	45
2.2.12. Исследование изменений структуры фибринового геля методом упругого светорассеяния	46
2.2.13. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия	47
2.2.14. Подготовка образцов и анализ методом ВЭЖХ-МС/МС	47
2.2.15. Анализ результатов ВЭЖХ-МС/МС	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	50
3.1. Окисление фибриногена, индуцированное O_3	50
3.1.1. Влияние окисления на целостность полипептидных цепей фибриногена	50
3.1.2. Окисление остатков ароматических аминокислот фибриногена	50
3.1.3. Окислительная модификация фибриногена: общие аспекты, аминокислотные остатки и структурные участки	51
3.2. Окисление фибриногена, индуцированное H_2O_2	56
3.2.1. Влияние окисления на целостность полипептидных цепей фибриногена	56
3.2.2. Влияние окисления на ковалентную сшивку γ и α цепей фибрина	57
3.2.3. Влияние окисления на гидролиз молекул фибриногена плазмином	57
3.2.4. Изменение структуры фибрина, образованного из окисленного H_2O_2 фибриногена	57
3.2.5. Окислительные модификации фибриногена, индуцированные окислением H_2O_2	58
3.3. Индуцированное $HOCl/OCl^-$ окисление фибриногена: влияние на структуру и функционирование	61
3.3.1. Кинетика превращения фибриногена в фибрин и гидролиз фибрина плазмином	61

3.3.2 Влияние окисления фибриногена на морфологию фибрина.....	63
3.3.3. Влияние окисления на структуру окисленной фибриновой сети методом УСР	64
3.3.4. Масс-спектрометрический анализ окислительной модификации молекула фибриногена, индуцированной HOCl/OCl^-	66
3.4. Обсуждение результатов	71
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	85
ВЫВОДЫ	88
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	90
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	91

ВВЕДЕНИЕ

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) [1]. 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 [2, 3]. 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 [4, 5], так и его наиболее высокой уязвимостью к окислению среди других белков плазмы крови [6].

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 восстанавливать 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 [7, 8]. 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 [9]. 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, $\text{НОСл}^-/\text{ОСл}^-$ 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 , $HOCl/OC1$ 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 αC -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 нано-жидкостном хроматографе Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., Санта-Клара, США), совмещенном с tandemным 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 (ДСН).

Положения, выносимые на защиту

1. Окисление фибриногена, индуцированное озоном, HOCl/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, HOCl/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 α 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 α 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:

1. XXIX Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (г. Москва, 2017);
2. XII Международной (XXI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых учёных (г. Москва, 2017);
3. XXI Международной школы-конференции «Биология - наука XXI века» (г. Пущино, 2017);
4. X Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз – 2017» (г. Казань, 2017);

5. XVII Ежегодной международной молодежной конференции "Биохимическая физика" ИБХФ РАН-ВУЗы (г. Москва, 2017);
6. Междисциплинарном научном форуме с международным участием "Новые материалы и перспективные технологии" (г. Москва, 2018);
7. XXII Международной школы-конференция «Биология - наука XXI века» (г. Пущино, 2018);
8. Международном конгрессе The 43th FEBS Congress (Чехия, 2018);
9. Международной конференции The 25th International Fibrinogen Conference & 3rd Factor XIII Workshop (USA, 2018);
10. XXII Международной школы-конференция «Биология - наука XXI века» (г. Пущино, 2019);
11. Международном конгрессе The 44th FEBS Congress (Польша, 2019);
12. X Международной конференции «Биоантиоксидант» (г. Москва, 2020);
13. Российском форуме по тромбозу и гемостазу совместно с 10-й (юбилейной) конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии (г. Москва, 2020);
14. II Международной конференции «Systems biology and systems physiology: regulation of biological networks» (г. Москва, 2021);
15. IX Всероссийской научной молодежной школе-конференции «Химия, физика, биология: пути интеграции» (г. Москва, 2022);
16. XXII Ежегодная молодежная конференция с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы "БИОХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА" (г. Москва, 2022);
17. 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные представления о структуре фибриногена

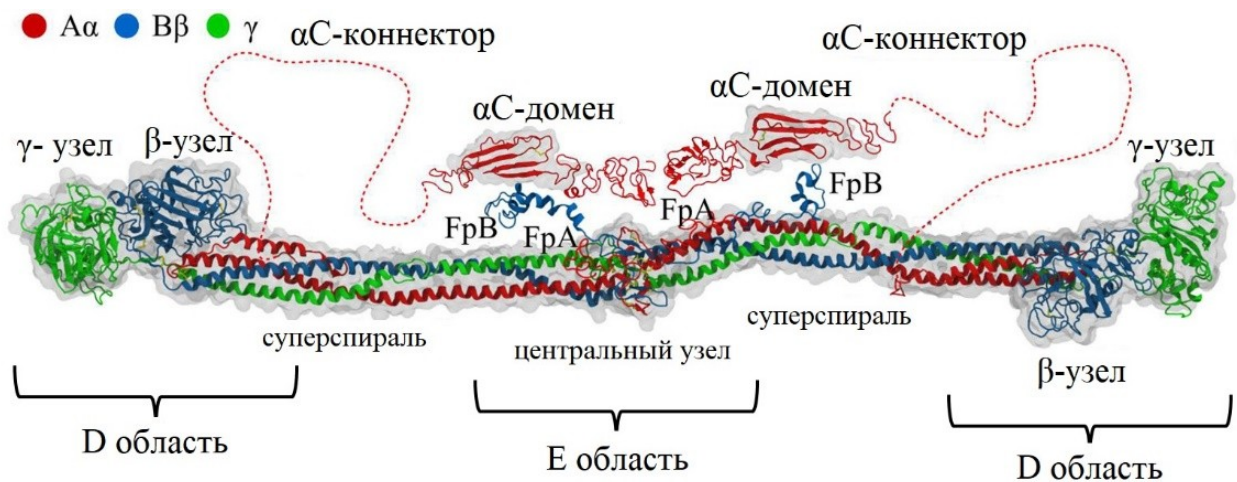
Фибриноген – белок плазмы крови, являющийся неотъемлемым компонентом системы гемостаза, задействованным в формировании фибриновых сгустков, предотвращающих кровопотерю при повреждении сосудов. Однако, учитывая тесную физиологическую взаимосвязь системы свертывания с системами воспаления, фибринолиза и комплемента, фибриноген также играет важную роль во всех этих процессах, может взаимодействовать с клетками, включая тромбоциты, лейкоциты, фибробласты и эндотелиальные клетки, а также является регулятором активности коагуляционного фактора XIII и факторов роста.

1.1.1. Структура молекулы фибриногена

Фибриноген характеризуется молекулярным весом 340 кДа. Молекула представляет собой палочковидную структуру длиной 45 нм и состоит из двух одинаковых частей, которые образованы тремя разными полипептидными цепями $A\alpha$, $B\beta$ и γ , состоящими из 610, 461 и 411 аминокислотных остатков, соответственно [10]. В результате альтернативного сплайсинга мРНК [11], может образовываться удлиненная цепь, называемая γ' цепью (427 аминокислотных остатков), в которой начиная с 408-го остатка. присутствует уникальная последовательность, содержащая два сульфатированных остатка тирозина [12, 13]. Молекулы фибриногена с γ' цепью составляют около 15% от их общего количества [14].

NH_2 -концевые участки всех шести полипептидных цепей формируют E область в центре молекулы, соединенную тройной суперспиральной структурой с двумя периферийными D областями, которые образованы $COOH$ -терминальными участками $B\beta$ и γ цепей (Рисунок 1). В $A\alpha$ полипептидной цепи $COOH$ -концевые участки ($A\alpha_{221-610}$) формируют αC -область, состоящую из глобулярного αC -домена ($A\alpha_{392-610}$), присоединенного к основной части молекулы гибким αC -

коннектором ($A\alpha 221-391$). Последние исследования рекомбинантных фрагментов сообщают, что αC -домен состоит из двух N- и C-концевых подобластей. N-концевая подобласть образована β -складчатой структурой, состоящий из двух β -спилек [15, 16, 17]. При протеолитической деградации молекулы фибриногена αC -область отщепляется на начальном этапе. Аналогично, у $B\beta$ цепи первым при протеолизе отщепляется NH_2 -концевой участок ($B\beta 1-53$), называемый $B\beta N$ областью [18].



Согласно кристаллографическим исследованиям, E и D области являются мультидоменными структурами [20, 21, 22, 23]. E область состоит из четырех структурно независимых доменов: каждая субъединица всеми тремя полипептидными цепями формирует E-доменную тройную суперспираль; NH_2 -концы обеих γ цепей образуют асимметричный γN -домен; а на противоположной стороне участки обеих $A\alpha$ и $B\beta$ цепей формируют воронкообразную структуру – ‘funnel-shaped’ домен [21]. Каждая D область состоит из семи доменных структур: участка тройной суперспирали и сформированных $COOH$ -терминальными участками $B\beta$ и γ цепей периферических β и γ модулей, каждый из которых включает в себя три структурных доменов (NH_2 -концевой A-домен, центральный B-домен и $COOH$ -концевой P-домен) [18].

В фибриногене присутствуют участки связывания кальция, необходимые для стабилизации молекулы и способствующие полимеризации. По два участка связывания расположены в каждом из γ ($\gamma 1$ и $\gamma 2$) и β ($\beta 1$ и $\beta 2$) модулей [24, 25, 26, 27]. Высоким сродством к связыванию кальция обладает $\gamma 1$, состоящий из $\gamma Asp318$, $\gamma Asp320$, $\gamma Phe322$ и $\gamma Gly324$. Сайт связывания $\gamma 2$ обладает меньшей степенью сродства и включает в себя $\gamma Gly296$ и $\gamma Asp298$ и боковые цепи $\gamma Asp294$ и $\gamma Asp301$. Участки связывания в β модуле характеризуются наиболее низкой аффинностью к ионам кальция, но сайт $\beta 2$ связывает β модуль с суперспиральной структурой через Ca^{2+} -мостик [25, 26].

При адсорбции на поверхностях фибриноген проявляет высокую конформационную гибкость [28, 29, 30], молекулярная основа которой пока не до конца понятна. Анализ первичной последовательности [31] и сравнение нескольких кристаллографических структур фибриногена [22, 23, 32] дали возможность предположить наличие «шарнира» ('hinge') в середине суперспиральной области. «Шарнир» расположен приблизительно в середине суперспиральной области и включает в себя разрыв в альфа-спиральной структуре γ цепи, формирующий гибкую петлю $\gamma 70-78$, и соседние остатки на цепях $A\alpha$ и $B\beta$. Возможность разрыва в указанной структуре облегчается за счет двух остатков пролина [33]. Подвижность «шарнира», может играть одну или несколько функциональных ролей: помимо обеспечения гибкости отдельных молекул фибриногена, а также волокон фибрина [32], изгиб в «шарнире» может увеличивать доступность сайтов расщепления плазмином, расположенных поблизости от суперспиральной области [31].

1.1.2. Полимеризация фибрина, опосредованная тромбином

На NH_2 -концевых участках $A\alpha$ и $B\beta$ полипептидных цепей находятся фибринопептиды А (FpA) и В (FpB), соответственно, которые, отщепляясь под воздействием тромбина, образуют мономер фибрина (desAB фибрин) (Рисунок 2). Тромбин, расщепляющий связи Arg16-Gly17 и Arg14-Gly15 на N-концевых участках $A\alpha$ и $B\beta$ цепей соответственно, связывается со своим субстратом,

фибриногеном, опосредованно через участок распознавания, называемый экзосайт 1 [34, 35]. Кроме него в молекуле фибриногена есть два вида сайтов несубстратного связывания тромбина [36]: сайты с низким сродством в E области и с более высокой аффинностью – в D-областях, содержащих γ' цепи. Обычно быстрее от молекулы фибрина отщепляется FpA (1-16), открывая участок полимеризации “knob A”, представленный последовательностью аминокислотных остатков Gly-Pro-Arg (GPR), который комплементарен участку “hole a”, расположенному в γ модуле. В результате взаимодействия мономеров фибрина конец-к-середине (DED) образуются двухцепочечные протофибриллы [18]. Отщепление FpA и взаимодействие участков полимеризации “knob A” и “hole a” являются достаточными условиями для формирования фибринового сгустка, называемого desA-фибрином. Например, при блокировке участка полимеризации пептидом GPRP [24] или при точечной мутации ключевого аминокислотного остатка γ Asp364 [37] полимеризация фибрина не происходит, что свидетельствует о том, что A:a взаимодействия являются основными для формирования фибринового сгустка [38]. В процессе образования протофибрилл, под воздействием тромбина отщепляются FpB (1-14), открывая участок полимеризации Gly-His-Arg-Pro (GHRP) – “knob B”, который связывается с участком β модуля “hole b” [18]. Несмотря на доказанные взаимодействия B:b [39], их физиологическая роль остается не вполне ясной. При отщеплении FpA без отщепления FpB образуются сгустки, состоящие из более тонких волокон, чем те, которые образуются при отщеплении обоих фибринопептидов. Это говорит о том, что B:b взаимодействия участвуют в латеральной агрегации протофибрилл, хотя боковая агрегация и формирование сгустка происходит без отщепления FpB [38].

Точные механизмы и конкретные структуры, ответственные за латеральную агрегацию протофибрилл, до сих пор остаются неизвестными. Помимо упомянутых выше B:b взаимодействий, в боковую агрегацию протофибрилл свой вклад могут вносить как C-концевые части γ цепей, так и смежные β модули [40], α C-область, суперспиральная структура [41] и N-гликозаминогликаны в остатках B β 364Asn и γ 52Asn [42].

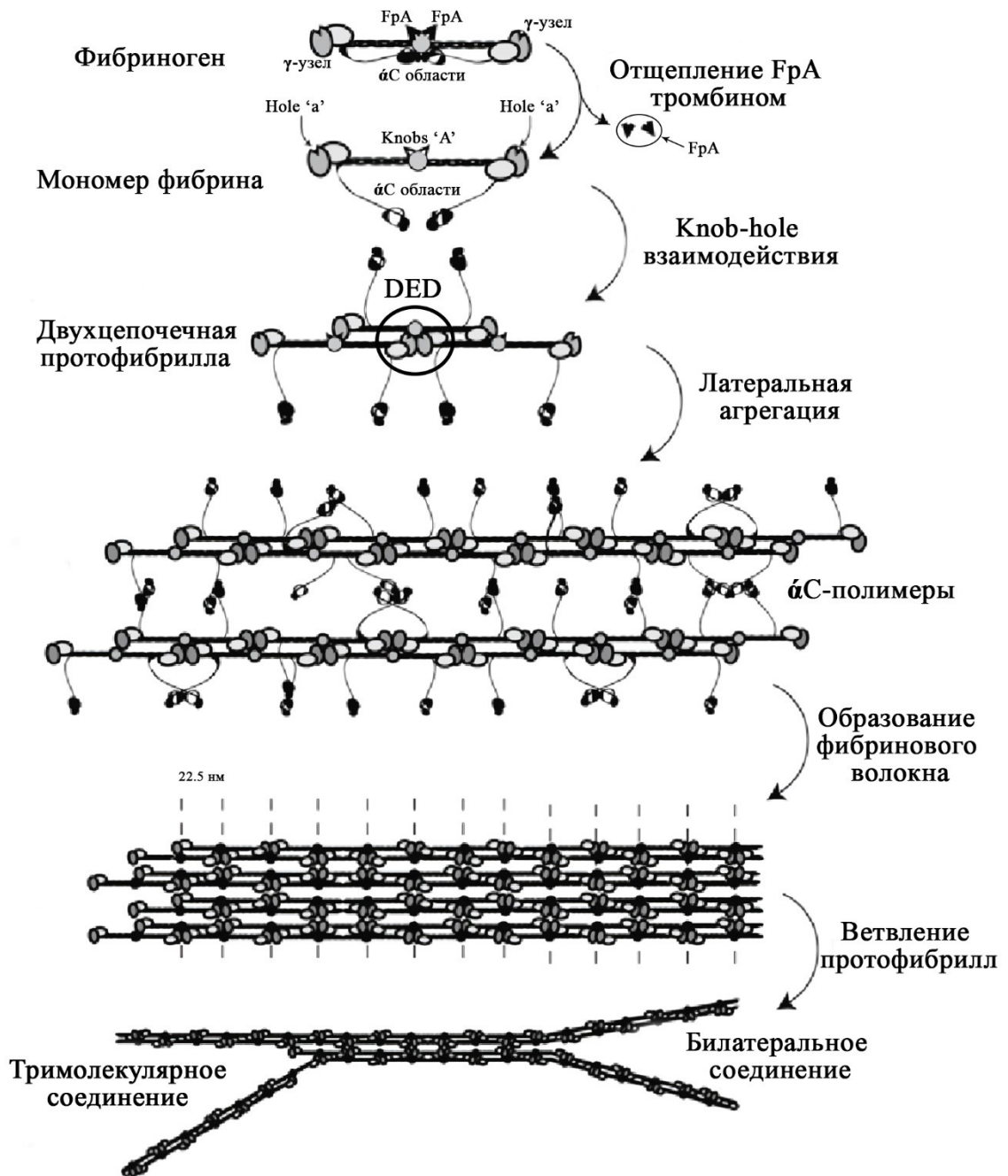


Рисунок 2 – Схема полимеризации фибрина [5]

1.1.3. Продольная агрегация мономеров фибрина: роль D:D взаимодействий

Если при взаимодействии “knob-hole” двух мономеров фибрина они располагаются в шахматном порядке, то при добавлении к ним третьей молекулы взаимодействие будет происходить между концевыми участками молекул. В образовавшемся D:D взаимодействии принимает участие фрагмент 275-300 γ цепи [38], в котором наиболее важное значение имеют остатки γ 275, γ 308 и γ 309 [43,

44, 45]. В результате D:D взаимодействия происходит удлинение нитей фибрина за счет прибавления дополнительных мономеров в продольном направлении, что обеспечивает образование крупных олигомеров, которые являются важным промежуточным продуктом полимеризации и способны к боковой агрегации, что приводит к образованию волокон [38, 46]. Список аминокислотных остатков, которые образуют контакты на поверхности D:D ($\gamma_1:\gamma_2$), включает в себя γ_1 Ala241-Pro243 с γ_2 Ala279-Tyr280; γ_1 Met264 с γ_2 Ala279; γ_1 Ala271-Asp272 с γ_2 Pro299-Ser300; γ_1 Ala279-Tyr280 с γ_2 Thr277 и γ_2 Asn308-Gly309; γ_1 Thr277 и γ_1 Gly309 с γ_2 Phe303. При помощи атомно-силовой микроскопии было установлено, что D:D контакты относительно гибкие, и в случае одноцепочечных олигомеров фибрина угол изгиба составляет 60° или более. Большие изменения угла изгиба, наблюдаемые методами атомно-силовой микроскопии и рентгеновской кристаллографии позволили предположить наличие гибкого шарнира, “hinge region”, в области D:D взаимодействия, к которому относятся четыре контакта: γ_1 Ala279- γ_2 Asn308; γ_1 Tyr280- γ_2 Asn308; γ_1 Ala279- γ_2 Gly309; и γ_1 Tyr280- γ_2 Gly309 [47].

Изгиб также может играть важную роль в полимеризации фибрина. В соответствии с недавно предложенной моделью [48], на ранних этапах процесса полимеризации, когда протофибрилла растет в виде одной нити, в которой каждый мономер соединен с соседним через “knob-hole”, взаимодействие между E и D областями двух молекул в цепи приводит к образованию структуры Y-лестницы. Эта структура далее преобразуется в двухцепочечную протофибриллу при помощи других “knob-hole” и D:D взаимодействий. Шарнирный изгиб, предположительно, может обеспечивать необходимую гибкость для встраивания новых молекул в растущем волокне [33].

1.1.4. Взаимодействия α C-областей при образовании волокон фибрина

α C-домены могут образовывать относительно слабые и неустойчивые гомомерные ассоциаты. В фибриногене усилены взаимодействия α C-доменов с центральной областью E через FpA и FpB. Взаимодействия α C-областей в одной

молекуле происходят в пределах α C-домена, а не α C-коннектора [49]. При отщеплении обоих фибринопептидов внутримолекулярные взаимодействия в молекуле фибриногена ослабляются, и α C-область может отделиться от центральной области и становится доступна для межмолекулярных взаимодействий [50]. Во время полимеризации фибрина, α C-области взаимодействуют друг с другом (внутри и между протофибриллами) и сшиваются с помощью плазменной трансклутаминазы (фактора XIIIa), что приводит к образованию α C-полимеров [17]. α C-домены принимают физиологически активную конформацию при самосборке, которая может включать изменения β -шпильки и взаимодействие C-концевого субдомена с α C коннектором [51]. Хотя α C-области не имеют существенного значения для боковой агрегации, они усиливают ее [49, 50, 52]. Сгустки, сформированные из фибриногена без α C-области, состоят из более тонких и более плотных волокон, с большим количеством точек ветвления [53].

1.1.4. Ветвление протофибрилл – образование трехмерной структуры фибринового геля

Ветвление способствует образованию трехмерной структуры фибринового геля. По результатам исследований структуры геля с помощью электронной микроскопии были обнаружены два способа ветвления: билатеральное соединение («bilateral junction»), когда две протофибриллы в результате латеральной агрегации образуют четырехнитевую структуру, а затем снова разделяется на две протофибриллы [54], и тримолекулярное соединение (“trimolecular junction” или “equilateral junction”), которое формируется при связывании двух молекул фибрина через γ модуль таким образом, что обе молекулы могут удлиняться как двунитчатые [55] (Рисунок 2). Предполагается, что ветвление и боковая агрегация являются конкурентными процессами; то есть условия, которые способствуют боковой агрегации способствуют формированию сгустка с толстыми волокнами и несколькими точками ветвления, а при условиях,

препятствующих боковой агрегации, как правило, образуются сгустки, состоящие из тонких волокон с большим количеством точек ветвления [38].

1.1.5. Ковалентная стабилизация фибрина под действием коагуляционного фактора XIII

Описанные выше механизмы формирования фибринового геля связаны с образованием нековалентных связей. Ковалентные ϵ/γ -глутамил-лизиновые изопептидные связи между соседними звеньями в полимере (межмолекулярные γ - γ димеры и α -полимеры) образуются под действием трансклутаминазы, фактора XIII [10, 56]. В плазме FXIII циркулирует в виде тетрамера, который связан с γ' -цепью фибриногена [57] или с участком α C-области [58]. C-концевые части γ цепей молекулы фибриногена содержат сайт связывания, через который две смежные молекулы образуют друг с другом ковалентную сшивку γ 406Lys- γ 398/399Gln [59, 60]. Те же межмолекулярные связи, более медленно образуются между C-концевыми участками α цепей (α C-область), тем самым создавая α -полимеры. Сшивание происходит также между α и γ цепями [61]. Ковалентные сшивки, внутри и между протофибриллами, делают процесс полимеризации необратимым и стабилизируют фибриновый сгусток, обеспечивая его механическую прочность и устойчивость к лизису [62].

Дискуссия о геометрии карбоксильных концевых участков сшитых γ - γ димеров в двухцепочечных протофибриллах продолжается уже более тридцати лет. Оставалось непонятным, протекает ли процесс сшивания мономеров фибрина в продольном направлении, т.е. конец-к-концу, в пределах одной нити протофибриллы [59, 63, 64, 65], или же сшивание происходит в поперечном направлении между γ цепями, принадлежащими к мономерным молекулам фибрина из разных нитей протофибриллы [60, 66, 67, 68]. Прояснение этого аспекта является важным для понимания структуры сгустка, его устойчивости и восприимчивости к фибринолизу. Последние исследования полностью подтвердили продольную ориентацию γ - γ димеров [46, 47].

1.1.6. Взаимодействие фибрин(оген)а с клетками и плазменными белками

Фибриноген и фибрин активно взаимодействуют с некоторыми белками плазмы, связываясь с ними нековалентно или с помощью FXIIIa. Ингибитор плазмина, α 2-антиплазмин, ковалентно пришитый с помощью FXIIIa к фибриногену или фибрину в A α 303 [69, 70, 71], повышает устойчивость молекулы к лизису [72], также, как и ингибитор активатора пламиногена 2, который может быть сшит с фибриногеном в нескольких участках α C-области [73]. Декорин, богатый лейцином протеогликан, регулирующий процесс сборки коллагена, связывается с D областью фибриногена [74]. Гепарин может связываться с фибрином в β 15-42 последовательности, которая оказывается открытой для взаимодействий после отщепления FpV [75, 76, 77]. Фибронектин сшит с α C-коннектором фибрина (A α 221-391) [78, 79], тромбоспондин связывается с α C-доменом [80], а также с серединой $B\beta$ и γ цепей [81]. Как правило, альбумин связан с фибриногеном нековалентно, но в некоторых аномальных молекулах фибриногена с восстановленной сульфгидрильной группой (SH), таких как фибриноген Caracas I [82], между ними может образовываться дисульфидная сшивка. Альбумин влияет на латеральную агрегацию, меняя толщину волокон фибриногена в зависимости от его концентрации.

Фибриноген и фибрин могут связывать эндотелиальные клетки, гладкомышечные клетки, фибробласты и лейкоциты через интегриновые или неинтегриновые рецепторы. Интегриновые рецепторы клеточной адгезии, которые опосредуют прикрепление клеток к внеклеточным матриксам, включают в себя α . и β цепи [83]. Фибриноген и фибрин может также связываться с этими клетками через неинтегриновые рецепторы, такие как VE-кадгерин (через β 15-42 последовательность фибриногена) [84], и ICAM-1 (через γ 117-133 последовательность фибриногена) [85, 86].

1.2. Роль фибриногена в воспалительном процессе

Циркулирующий в плазме крови фибриноген участвует в процессе гемостаза как растворимый предшественник фибрина, связывает активированные тромбоциты и обеспечивает правильное расположение эритроцитов, макрофагов и фибробластов у поврежденного участка [5]. Развитие и контроль этих процессов важны для остановки кровотечения, ускорения заживления ран и регенерации тканей. Кроме того, фибрин(оген) участвует в предотвращении микробной инвазии и пролиферации при травме [87], усиливая антибактериальную защиту организма за счет образования матрицы, которая улавливает антигены, а также рекрутируют и активируют иммунные клетки [88].

Действительно, образование стабильного сгустка крови, содержащего полимеризованный и сшитый фибрин, имеет решающее значение для предотвращения кровопотери и ускорения заживления ран при повреждении сосудов [5]. Однако, важен баланс между свертыванием крови, особенно превращением фибриногена в фибрин, и фибринолизом, протеолитической деградацией фибриновой сетки. Нарушение этого равновесия может вызвать патологические процессы, обусловленные различными механизмами. 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.

1.2.1. Фибриноген – фактор свертывания крови с провоспалительной ролью

В физиологических условиях концентрации фибриногена в плазме колеблются от 2 до 4 г/л, а период полураспада фибриногена составляет около 4 дней [89]. Однако при патологических состояниях, например, после травмы или заболевания, связанного с повреждением сосудов, инфекцией или воспалением, концентрация фибриногена в крови увеличивается в несколько раз [90]. Таким образом, фибриноген считается белком-маркером острой фазы. Формирование

типичного тромба требует участия тромбоцитов, а фибриноген действует как субстрат для образования тромбоцитарной пробки [91]. С-конец γ -цепи фибриногена связывается с участком рецептора интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ на поверхности тромбоцитов, тем самым опосредуя образование мостиков между тромбоцитами и способствуя их агрегации [92, 93, 94].

Хотя активация путей коагуляции необходима для предотвращения фатальной кровопотери, отложение фибрина в тканях тщательно регулируется. Фибрин считается временным матриксом, поскольку его быстрое удаление обычно предшествует и необходимо для заживления тканей. Это достигается за счет фибринолитической системы, которая уравнивает прокоагуляторные процессы. Протеаза плазмина является основным белком, ответственным за деградацию фибрина и растворение сгустка [95]. Локальная генерация плазмينا регулируется двумя сериновыми протеазами, называемыми активаторами плазминогена [96]. Протеолитическая деградация фибрина начинается со связывания плазмينا и его активатора с фибрином, что приводит к образованию растворимых фрагментов фибрина, таких как фрагменты D, E и D-димер [97].

В физиологических условиях образование и деградация фибрина уравновешены, в то время как нарушение регуляции любого процесса приводит к серьезным клиническим последствиям, которые наблюдаются при заболеваниях человека, связанных с геморрагическими или тромботическими нарушениями, а также фиброзом тканей [98]. Более того, многочисленные полиморфизмы или мутации фибриногена приводят либо к снижению уровня фибриногена (гипофибриногенемия), либо к структурным дефицитам, которые влияют на функцию фибриногена (дисфибриногенемия) [99]. Например, дефицит плазминогена у мышей приводит к устойчивому отложению фибрина в тканях и приводит к высокой смертности, истощению, спонтанному изъязвлению желудочно-кишечного тракта, выпадению прямой кишки, тяжелому тромбозу и задержке заживления ран [100]. Более того, дефицит плазминогена приводит к обострению воспалительных и травматических заболеваний, таких как коллаген-индуцированный артрит [101] и повреждение периферических нервов [102].

1.2.2. Фибриноген и воспаление

Постоянно растущее количество данных подтверждает важную роль фибрин(оген)а и продуктов его деградации в регуляции воспалительной реакции в некоторых тканях-мишенях [9]. Повышенное содержание фибриногена в крови считается индикатором провоспалительного состояния и маркером высокого риска развития сосудистых воспалительных заболеваний, таких как гипертония и атеросклероз. Аналогичным образом, повышенные уровни продуктов деградации фибрина, таких как D-димер, широко используются в клинической практике в качестве индикаторов воспаления, маркеров повышенной коагуляционной активности и предсказателей риска тромботических событий [103]. Кроме того, пептиды, высвобождаемые при образовании фибрина, такие как фибринопептид В, который отщепляется от фибриногена тромбином, могут действовать как хемоаттрактанты для лейкоцитов и, таким образом, независимо модулировать воспалительные реакции [104].

В большинстве случаев провоспалительные функции фибрина(огена) и его производных связаны с их способностью связываться и активировать широкий спектр иммунных клеток посредством различных лиганд-рецепторных взаимодействий [90]. Важно отметить, что эти провоспалительные функции являются результатом передачи сигналов через сайты связывания фибрин(оген)а, которые не перекрываются с теми, которые участвуют в каскаде свертывания крови. Репрезентативным примером является интегриновый рецептор CD11b/CD18 [105]. Этот рецептор экспрессируется лейкоцитами, в основном циркулирующими моноцитами, тканеспецифичными макрофагами и микроглией, находящейся в центральной нервной системе (ЦНС) [105]. Было показано, что передача сигнала фибрина(огена) через CD11b/CD18 активирует провоспалительные пути, такие как NF-κB, что приводит к локальной продукции воспалительных цитокинов, таких как TNF-α и IL-1β [106, 107, 108].

1.2.3. Фибриноген как фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний

Тромбоз встречается при основных сердечно-сосудистых заболеваниях: ишемической болезни сердца, инсульте, венозной тромбоэмболии [109]. Артериальный тромбоз связан с образованием и разрывом атеросклеротической бляшки, что приводит к накоплению тромбоцитов, тогда как венозный тромбоз связан с эндотелиальной дисфункцией и застоем крови, которые вызывают агрегацию фибрина и эритроцитов [110].

Повышенный интерес к исследованиям фибриногена как ключевого фактора сердечно-сосудистых заболеваний обусловлен его ролью как в тромбообразовании, так и в воспалительном процессе [111, 112]. Повышенные уровни фибриногена могут способствовать развитию сердечно-сосудистых патологий различными путями, которые, даже если они являются результатом ранее существовавшего воспалительного процесса, могут дополнительно способствовать ухудшению клинического состояния. Фибриноген может способствовать атерогенезу при превращении в фибрин или вызывать отложение липидов и местное воспаление, приводящее к образованию, дестабилизации и разрыву атеросклеротических бляшек. Еще одним возможным механизмом является стимулирование тромбообразования. Фибрин(оген) действует как каркас для тромбов, усиливая агрегацию тромбоцитов и образование фибрина, делая тромбы более устойчивыми к лизису [113]. Кроме того, фибрин(оген) может взаимодействовать с эритроцитами, опосредуя оседание эритроцитов, а также позволяя эритроцитам прикрепляться к тромбам. Фибриноген также является селективным ингибитором матриксной металлопротеиназы 2 (ММП-2). Высокие уровни фибриногена в плазме могут привести к недостаточности ММП-2 у людей. Поскольку этот фермент жизненно важен для здорового развития и восстановления органов, чрезмерное ингибирование ММП-2 может привести к артриту и сердечно-сосудистым заболеваниям, аналогичным тем, которые наблюдаются у пациентов с дефицитом гена ММП-2 [114].

Структурная изменчивость фибриногена может быть связана с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Повышенная концентрация фибриногена γ' в плазме связана с риском инфаркта миокарда и других тромботических состояний [115].

Посттрансляционные модификации фибриногена (например, окисление, фосфорилирование, гликозилирование и сиалирование) также могут играть роль в сердечно-сосудистых заболеваниях, влияя на архитектуру сгустка, скорость и форму фибриновой сети или взаимодействие с тромбоцитами и фибринолиз [116]. В соответствии с этим, у пациентов с хронической тромбоэмболической легочной гипертензией с относительно высокой распространенностью выявлялись дисфибриногенемические варианты, приводящие к чрезмерному сиалированию фибриногена, aberrантной полимеризации фибрина или гипофибринолизу [117]. Фибринолитическая резистентность и высокие доли моносиалированных цепей В β связаны с ангиогенезом и ростом фибробластов и эндотелиальных клеток, что приводит к хроническому воспалению и ремоделированию легочных клеток [118].

1.2.4. Механизмы участия фибриногена в иницировании и развитии новообразований

Факторы свертывания крови связывают со злокачественными новообразованиями уже более 100 лет, а высокие уровни фибриногена в плазме, в частности, связаны с развитием и прогрессированием рака. Фибриноген может продуцироваться некоторыми раковыми клетками, не происходящими из гепатоцитов, и присутствовать на периферии опухолей, например, при раке молочной железы [119].

Анализ исследований по выявлению прогностического эффекта циркулирующего фибриногена при онкологических заболеваниях, показал положительную корреляцию между повышенными уровнями фибриногена до лечения и сниженной степенью выживаемости [120, 121, 122, 123]. Мыши с дефицитом фибриногена были защищены от гематогенного метастазирования в легкие, но не от роста опухоли после внутривенной инъекции линий клеток карциномы легких и меланомы. Гирудин, ингибитор тромбина, дополнительно

снижал метастатический потенциал циркулирующих раковых клеток у мышей с дефицитом фибриногена, в то время как истощение плазмينا не имело никакого эффекта [124].

Можно сделать несколько предположений о молекулярных механизмах участия фибриногена в иницировании и развитии новообразований. Во-первых, фибриноген связывает факторы роста, включая фактор роста эндотелия сосудов и фактор роста фибробластов [5]. Таким образом, фибриноген, находящийся во внеклеточном матриксе, может служить их резервуаром, контролируя их доступность, а также влияя на пролиферацию раковых клеток, ингибирование апоптоза, ангиогенеза и метастазирования [122]. Во-вторых, фибриноген связывается с несколькими типами клеток. Фибриноген-опосредованное образование клеточных мостиков может создавать условия для адгезии раковых клеток, изменению формы, подвижности и инвазивному потенциалу [122]. Наконец, взаимодействие фибриногена с тромбоцитами через $\beta 3$ -интегрины облегчает защиту опухолевых клеток от цитотоксичности естественных клеток-киллеров, позволяя избежать иммунного ответа организма [125].

Эти исследования показывают, что модуляция уровня фибриногена у онкологических больных может иметь терапевтический потенциал. Снижение фибриногена в плазме с помощью лекарственной терапии или изменения образа жизни может способствовать повышению выживаемости.

1.2.5. Роль фибриногена в развитии неврологических заболеваний с нарушением ГЭБ

В нормальных условиях фибриноген циркулирует в сосудах головного и спинного мозга, не попадая в ЦНС, благодаря сложной архитектуре сосудистых стенок ЦНС, которые образуют гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). ГЭБ представляет собой физический барьер, обусловленный, прежде всего, плотными соединениями между эндотелиальными клетками сосудистой сети головного мозга [126, 127]. ГЭБ ограничивает поступление потенциально вредных веществ, белков плазмы и иммунных клеток из кровотока в ЦНС, одновременно снабжая ее

необходимыми питательными веществами для правильного функционирования [128]. Однако некоторые патологические состояния, которые включают либо острое кровоизлияние (например, повреждение головного или спинного мозга и геморрагический инсульт), либо хроническое нарушение ГЭБ (такие как, рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера, глиобластома головного мозга, ВИЧ-энцефалит и бактериальный менингит), приводят к отложению фибрина(огена) в ЦНС [9, 126, 127, 129]. Попав в мозг, фибрин(оген) может индуцировать сигнальные пути через связывание множества рецепторов и белков, действуя как медиатор нейродегенерации и активатор врожденного иммунитета [130].

Отложения фибрина обнаруживаются в ранних очагах рассеянного склероза и участках демиелинизации, связанных с воспалением и повреждением аксонов [131]. При болезни Альцгеймера отложения фибрина накапливаются в кровеносных сосудах ЦНС в сочетании с церебральной амилоидной ангиопатией [132]. В периваскулярной паренхиме головного мозга фибрин локализуется совместно с амилоидными бляшками [133], макрофагами [134], областями потери перицитов [135] и дистрофическими нейритами [136].

Таким образом, фибрин(оген) может вызывать дегенеративные изменения в ЦНС посредством различных механизмов, которые инициируют или усиливают нейродегенеративные процессы после разрушения сосудов. Хотя многие исследования показали, что фибрин(оген) способствует нейровоспалению посредством связывания с интегрином $\alpha_M\beta_2$ на макрофагах и микроглии, у мышей с дефицитом перицитов отсутствует значительная нейровоспалительная реакция до поздней стадии заболевания. Это говорит о том, что нейродегенерация, вызванная фибрин(оген)ом, также может быть независимой от воспаления [137].

1.3. Активные формы кислорода и окисление белков

Живые организмы постоянно подвергаются воздействию высокореакционных и токсических 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. К данным соединениям относят: перекись водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал ($HO\cdot$), супероксидный анион-радикал (O^{2-}), озон (O_3), синглетный кислород ($1O^2$) (Рисунок 3). В присутствии гем-содержащих пероксидаз происходит образование гипохлоридных кислот ($HOCl$, $HOBr$, HOI), которые являются мощными токсинами, обладающими чрезвычайно высокой химической реакционной способностью по отношению к органическим молекулам [138, 139, 140, 141]. В то время как небольшое количество АФК играет важную роль в процессах передачи сигналов в клетках [142], дисбаланс между высоким количеством генерируемых реактивных частиц в организме и их недостаточным разрушением антиоксидантной системой определяет окислительный стресс, ответственный за серьезные метаболические нарушения и повреждение структур биологических макромолекул [143].

Окислительный стресс имеет ассоциацию с патофизиологией широкого спектра заболеваний человека, включая рак [144], сердечно-сосудистые заболевания [145], хроническую обструктивную болезнь легких [146], сахарный диабет [147] и нейродегенеративные расстройства, такие как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера [148, 149] и др.

1.3.1. Окислительная модификация белковых молекул

Белки являются высокочувствительными мишенями для молекул АФК [1]. Окислители могут вызывать химические модификации боковых цепей

аминокислотных остатков, образование белок-белковых поперечных связей и фрагментацию белка, как следствие разрыва полипептидной цепи белка [2, 3].

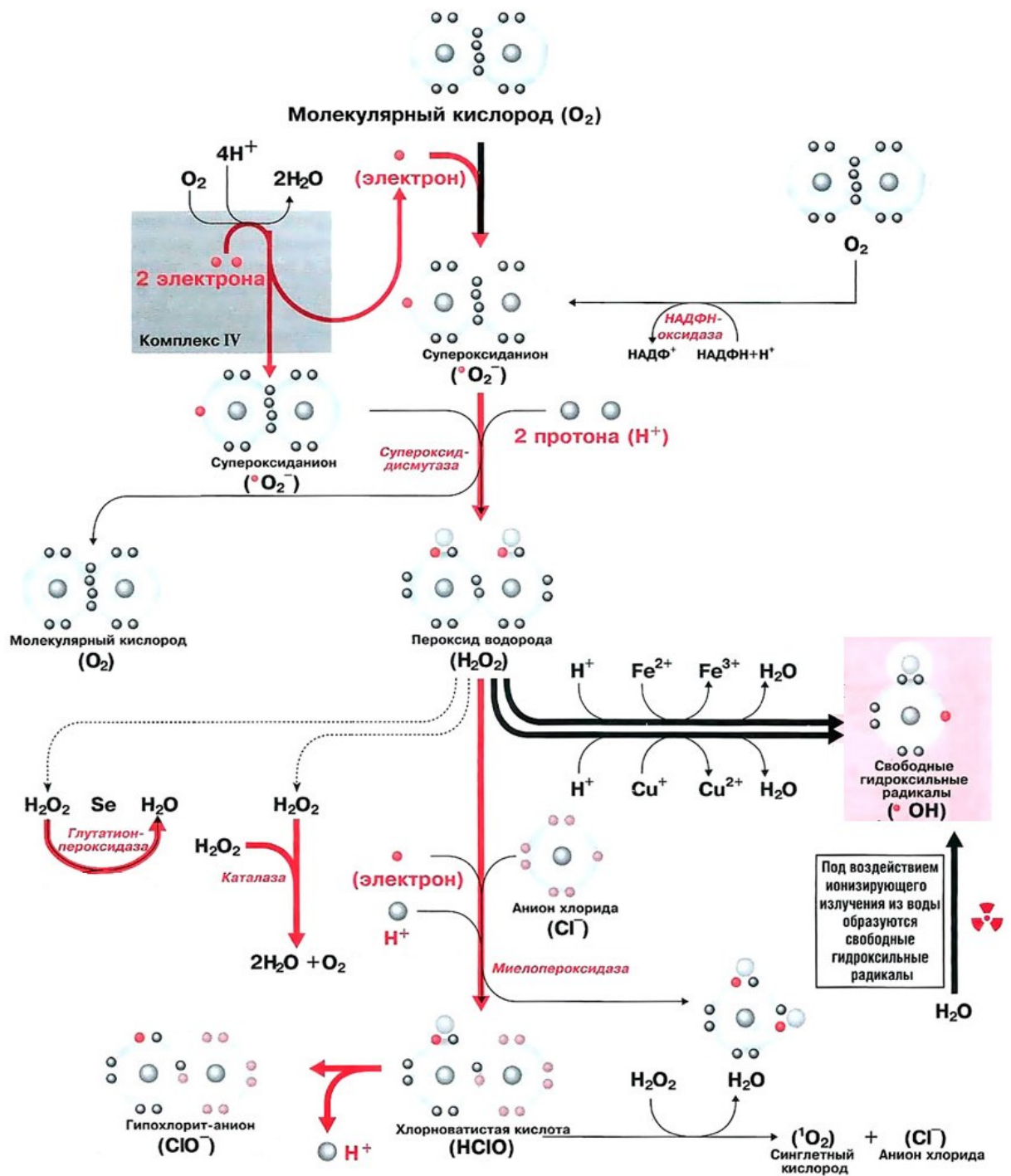


Рисунок 3 – Образование свободных радикалов и активных форм кислорода [150]

Существуют убедительные доказательства того, что белки, подвергающиеся окислительным посттрансляционным повреждениям с измененной

пространственной структурой и функцией, накапливаются при старении, окислительном стрессе и в результате различных заболеваний [151].

Особое значение имеет защита от АФК-опосредованного окислительного повреждения внутриклеточных белков, в которую вовлечены разнообразные системы антиоксидантной защиты. Наиболее эффективными ферментными антиоксидантами являются супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза и пероксиредоксины [152, 153]. К неферментативным антиоксидантам относятся глутатион (GSH), тиоредоксин, аскорбат, α -токоферол, мочевая кислота и др. [152, 153]. Антиоксиданты могут действовать синергично друг с другом против разных типов АФК, как для предотвращения образования новых молекул АФК, так и для превращения наиболее реактивных метаболитов в менее активные, либо для полной инактивации этих производных [151].

1.3.2. Окислительные посттрансляционные модификации аминокислотных остатков

Окислительный стресс вызывает различные модификации белков, включая карбонилирование [154, 155]. Прямое окисление остатков лизина, аргинина, пролина и треонина может являться обычным механизмом образования карбониллов в белках [155, 156]. Окисление остатка гистидина приводит к образованию 2-оксогистидина [157]; но также и к неустойчивым аспарагину и аспарагиновой кислоте [158]; окисление остатков триптофана вызывает его превращение в кинуренин или N-формилкинуренин [159]; продуктом окисления тирозина является образование дитирозина [160, 161].

Сульфосодержащие остатки цистеина и метионина в белках проявляют наиболее высокую чувствительность ко всем видам АФК по сравнению с другими аминокислотными остатками. Поэтому неудивительно, что их окисление относится к наиболее распространенным модификациям в белках при воздействии на них различных АФК. Остатки метионина превращаются в метионин сульфоксиды, MetO, способные участвовать в дальнейшем окислении,

ведущем к образованию метионин сульфона, MetO₂ [162] (Рисунок 4). Хотя окисление остатков метионина считается важным фактором в поддержании многих физиологических процессов в живых организмах [163, 164], до сих пор не найдено ферментов, в каталитическом центре которых присутствуют остатки метионина [165].

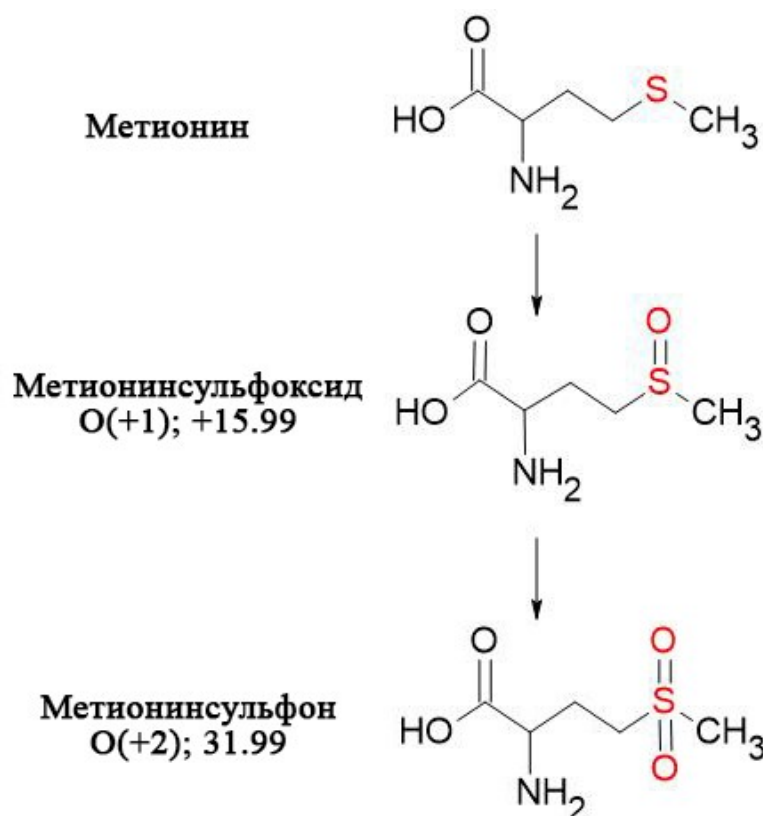


Рисунок 4 – Схема, иллюстрирующая модификации боковой цепи Met в результате окисления

Что касается остатков Cys, они участвуют в каталитическом цикле многих ферментов, образуют дисульфидные связи, которые вносят важный вклад в стабилизацию структуры белка, а также являются сайтами связывания металлов таких, как цинк или железо [166]. Действие АФК на остатки Cys в белках часто сопровождается необратимыми модификациями, приводящими к дисфункции белков [167]. Окисление белковых тиолов с помощью АФК первоначально приводит к образованию сульфеновой кислоты (R-SOH), которая затем может образовывать внутримолекулярные или межмолекулярные дисульфидные связи (Рисунок 5). Хотя сульфеновые кислоты могут временно сохранять стабильность в некоторых белковых средах [168], они чаще всего реагируют с другими тиолами

или вовлекаются в дальнейшее окисление, которое приводит к необратимому образованию сульфиновой (R-SOOH) или сульфоновой (R-SO₃H) кислот [160].

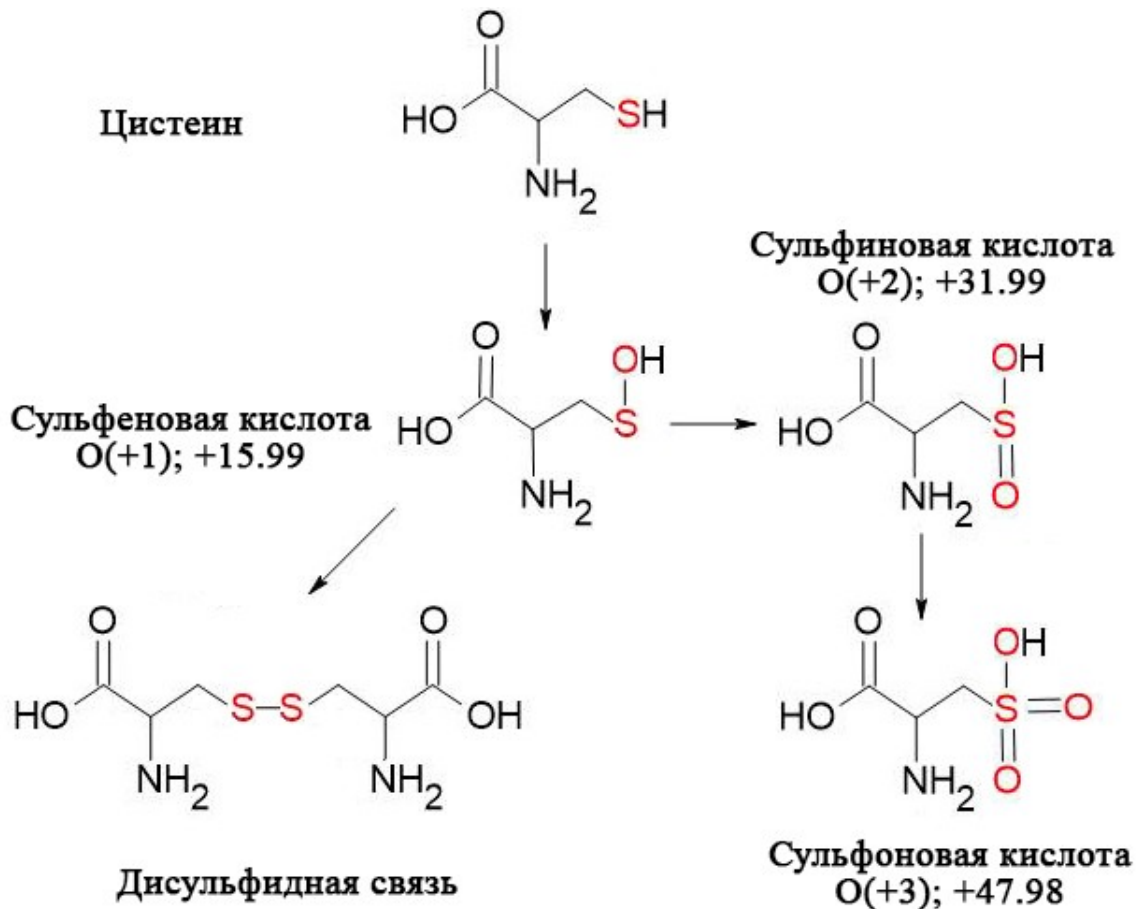


Рисунок 5 – Схема, иллюстрирующая модификации боковой цепи Cys в результате окисления

Основные продукты окисления аминокислот представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Основные виды продуктов окисления аминокислот [169]

Аминокислоты	Продукты окисления
Цистеин	Дисульфиды, сульфеновая, сульфиновая и сульфоновая кислоты
Метионин	Метионинсульфоксид, метионинсульфон
Триптофан	2-, 4-, 5-, 6-, и 7-гидрокситриптофан, кинуренин, 3-гидроксикинуренин, формилкинуренин

Фенилаланин	2,3-дигидроксифенилаланин, 2-, 3-, и 4-гидроксифенилаланин
Тирозин	3,4- дигидроксифенилаланин, дитирозиновые сшивки, Tyr-O-Tyr
Гистидин	2-оксогистидин, аспарагин, аспарагиновая кислота
Аргинин	Глутамил семиальдегид
Лизин	α -аминоадипиновый семиальдегид
Пролин	2-пирролидон, 4- и 5-гидроксипролин, пироглутаминовая кислота, глутамил семиальдегид
Треонин	2-амино-3-кетомасляная кислота

Решающая роль в системе антиоксидантной защиты клеток связана с наличием высоких концентрациях глутатиона, являющегося наиболее распространенным небелковым тиолом, способным защитить остатки Cys от окисления до сульфидных и сульфокислот [170].

1.3.3. Роль остатков цистеина и метионина в поддержании стабильности внутриклеточных белков

Все больше экспериментальных данных свидетельствует в поддержку концепции о том, что остатки цистеина и метионина во внутриклеточных белках являются важными антиоксидантами, которые играют роль в поддержании структуры и стабильности этих белков при окислении [171, 172]. Большинство биологических систем содержат дисульфид- и метионинсульфоксид редуктазы, которые восстанавливают окисленные остатки цистеина и метионина. Хотя функциональное значение специфических остатков метионина во многих белках остается в значительной степени неопределенным, для ряда белков было показано, что окисление некоторых экспонированных остатков метионина не оказывает существенного влияния на их биологическую функцию [173, 174].

Обратимое окисление остатков метионина во внутриклеточных белках обеспечивает механизм, способный удалять молекулы АФК, создавая тем самым эффективный каталитический цикл, снижающий воздействие АФК на другие функционально важные аминокислотные остатки.

Из-за отсутствия метионинсульфоксид редуктаз (MSRs) в плазме крови [175] окисление метионинов во внеклеточных белках является полностью необратимым и, следовательно, способность метионинов служить перехватчиками реактивных частиц без нарушения структуры и функции белков плазмы все еще остается дискуссионным [176]. Следует отметить, что в отличие от экспонированных метионинов, несильно значимых для активности белка, более значимые остатки Met, как правило, локализованы внутри белкового ядра и менее подвержены к окислению [177, 178, 179].

1.3.4. Антиоксидантный потенциал белков плазмы крови

Вне клеток уровни как глутатиона, так и антиоксидантных ферментов слишком низки, чтобы обеспечить адекватную защиту белков от вредоносного действия метаболитов кислорода [7, 8]. Поэтому антиоксидантный потенциал белков плазмы связан не только с наличием антиоксидантных Met, но также с сульфгидрильными группами цистеинов. Наиболее ярким примером является сывороточный альбумин, который рассматривается как важнейший белковый антиоксидант, главным образом, благодаря наличию единственной сульфгидрильной группы Cys34, способной выступить в качестве ловушки АФК [180].

Репарация повреждений в белках ограничивается восстановлением серосодержащих аминокислотных остатков цистеина и метионина, которые в первую очередь подвержены окислению. Это представляется вполне обоснованным с физиологической точки зрения, поскольку множество возможных продуктов окисления 20 аминокислот в совокупности, очевидно, превышает диапазон эффективной репарации [151]. К тому же, окислительное повреждение оставшегося большинства аминокислотных остатков (кроме Met и

Cys) носит необратимый характер и не выявлено ни одного способа их возможного восстановления в окисленных белках. Такие поврежденные белки являются мишенью для деградации различными внутриклеточными протеазами, включая катепсины, кальпаины и 20S-протеасому [181, 182]. Следовательно, накопление окисленных белков в циркулирующей крови *in vivo* может происходить не только из-за избыточного производства АФК, но также из-за крайне ограниченной возможности восстановления окислительных повреждений в белковых молекулах. Существует незначительное количество примеров репарации белков посредством восстановления дисульфидов, происходящего в жидкой фазе. Одним из таких ярких примеров репарации окисленных белков в плазме является регуляция активности тканевого фактора секретлируемым тиоредоксином-1 [183].

1.3.5. Нарушение структуры и функции фибриногена при окислении

Фибриноген является одним из наиболее изучаемых белков в отношении функциональных последствий его окисления. Такой повышенный интерес к этому белку может быть обусловлен как его огромной значимостью в гемостазе и во многих других физиологических и патофизиологических процессах [4, 5], так и его наиболее высокой окислительной уязвимостью среди других белков плазмы крови [6]. Было высказано предположение, что высокая уязвимость фибриногена к окислению играет важную роль в антиоксидантной защите [184, 185, 186]. Однако значимость чрезвычайно высокой чувствительности фибриногена к окислительной модификации остается в настоящее время, по-прежнему, неясной [187].

Окислительные модификации фибриногена под воздействием различных активных форм кислорода сходны между собой по общим нарушениям пространственной и химической структуры белка. Химическая модификация белка сопровождается повреждениями вторичной структуры фибриногена, которые главным образом связаны со снижением содержания α -спиралей [188, 189], химической трансформацией высокочувствительных S-содержащих [188,

190, 191] и циклических остатков [192, 193], повышением уровня карбонильных групп фибриногена, обусловленное вовлечением в окислительную модификацию ряда аминокислотных остатков, таких как гистидин, пролин, аргинин и лизин [194, 195], образованием дитиразиновых сшивок [192, 194] и распадом алифатических фрагментов CH_2 и CH_3 [188].

Масс-спектрометрические исследования, направленные на идентификацию ПТМ, возникающих в фибриногене как при его АФК-индуцированном окислении *in vitro*, так и в кровотоке *in vivo*, носят достаточно ограниченный характер. Было показано, что окисление фибриногена, индуцированное $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ приводит к модификации только остатков метионина [191]. Остатки $\text{A}\alpha\text{Met}476$, $\text{B}\beta\text{Met}367$ и $\gamma\text{Met}78$ были более подвержены окислению $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$, чем $\text{B}\beta\text{Met}305$, $\text{B}\beta\text{Met}190$ и $\text{A}\alpha\text{Met}91$. Количественная оценка степени окисления этих сайтов выявила $\text{A}\alpha\text{Met}476$, как наиболее уязвимый остаток к окислению, индуцированному $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ (73% при 150 мкМ $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$).

Другие авторы [196] показали, что сильное окисление фибриногена в присутствии 1,25 мМ $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ приводило к окислительным модификациям 84 аминокислотных остатков, 26 из которых были расположены на $\text{A}\alpha$ цепи. На $\text{B}\beta$ и γ цепях было обнаружено 35 и 23 модифицированных остатков, соответственно. Восприимчивость аминокислотных остатков к окислению была различной. Наиболее часто модификации встречались в лизине. За ним следовали тирозин и триптофан, в то время как химическая структура аланина, глицина, изолейцина, лейцина, метионина, глутамина, треонина и валина оставалась незатронутой. Таким образом, данные по метионинам находятся в очевидном противоречии с результатами, отмеченными выше [191]. Кроме того, остается непонятным, каким образом наиболее реакционные остатки метионина не подвергались окислительной альтерации; тем более, что целый ряд остатков метионина, в том числе $\text{A}\alpha\text{M}476$, располагаются на поверхности молекулы фибриногена [197] и являются наиболее легкодоступной мишенью для окислителей. В первом приближении можно допустить, что очень высокие дозы $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$, использованные авторами, могли вызвать такие крупномасштабные структурные

перестройки в молекуле, при которых изначально поверхностно локализованные метионины оказались запрятанными внутри белкового ядра.

При исследовании фибриногена у пациентов, перенесших тяжелую травму, приводящую к патологическому кровотечению, известному как травматическая коагулопатия [198], метод ВЭЖХ-МС/МС выявил метионинсульфоксиды в семи различных положениях, $A\alpha\text{Met}476$, $B\beta\text{Met}373$, $B\beta\text{Met}367$, $B\beta\text{Met}314$, $B\beta\text{Met}305$, $B\beta\text{Met}422$, $\gamma\text{Met}78$. Однако уровень окисления этих остатков был слегка повышен только в положениях $B\beta\text{Met}314$ и $A\alpha\text{Met}476$ по сравнению с контролем.

Нарушение структуры окисленного фибриногена при его взаимодействии с различными видами АФК оказывает влияние на процесс превращения фибриногена в фибрин. Окисление фибриногена HOCl/OCl^- уменьшало скорость образования фибрина и нарастания мутности его сгустка [191]. Сканирующие электронные микрофотографии, свидетельствовали, что плотность сетки резко возрастает с увеличивающейся концентрацией окислителя. В неокисленном фибриновом геле очень крупные волокна разделены на большие расстояния, что приводит к образованию больших пор в геле. В геле фибрина, сформированного из молекул фибриногена, который был обработан $50 \text{ мкМ HOCl}/\text{OCl}^-$, размеры волокон и пор были уменьшенными по сравнению с неокисленным гелем. Но наиболее значительная разница наблюдалась при окислении фибрина $150 \text{ мкМ HOCl}/\text{OCl}^-$, в результате чего полученный гель в основном содержал плотно упакованные и очень мелкие волокна. Высокая плотность волокон и пониженная пористость, наблюдаемые в гелях окисленного фибрина, увеличивают резистентность фибриновой сети к фибринолизу, катализируемому плазмином. Очевидно, что этот эффект обусловлен снижением коэффициента диффузии и препятствием транспорту ферментов, важных для плазминового гидролиза [191]. Было предположено, что ответственным в повреждении самосборки сети из окисленного фибриногена являются, главным образом, $A\alpha\text{Met}476$ и, в меньшей степени, $B\beta\text{Met}367$, находящиеся в структурированной части области αC -домена [53] и части структуры “hole b” области D [38]. Существует предположение, что окисление $A\alpha\text{Met}476$ производит конформационные изменения в αC -домене,

которые ингибируют взаимодействия между соседними доменами в процессе сборки волокон фибрина [190, 191]. С другой стороны, сканирующая электронная микроскопия образцов фибрина, полученного из окисленного НОСІ/ОСІ фибриногена [196], демонстрировала выраженную аномальную архитектуру, сильно отличающуюся от описанной в другой работе [191]. Фибриновая сеть обнаруживала очень мало прядей с видимыми выступами, образованными очень тонкими волокнами вокруг них. Авторы полагают, что изменения в структуре сгустка фибрина являются результатом индукции широкого ряда ПТМ в молекуле фибриногена.

Модификация структуры фибриногена перекисью водорода также оказывает воздействие на морфологию фибрина [199]. Данные атомно-силовой микроскопии гелей фибрина показали, что индуцированное окисление фибриногена 0,2 мМ H_2O_2 обуславливало, главным образом, нарушение регулярных разветвленной сети фибрина, характерных для неокисленного фибрина. Толщина фибрилл изменялась незначительно, находясь в пределах 0,12 – 0,24 мкм. Однако, обработка фибриногена 0,6 мМ H_2O_2 инициировала агрегацию фибрилл и образование крупных белковых блоков.

Накопленные данные указывают на то, что окислительный стресс способен вызывать нарушение структура фибрина у больных с различными тромбоэмболическими проявлениями, в частности инфарктом миокарда, ишемическим инсультом и венозной тромбоэмболией. У таких пациентов структура фибрина характеризовалась более тонкими фибриновыми волокнами по сравнению с контролем. Также наблюдалось замедление процесса гидролиза фибрина под действием плазмينا [200, 201, 202, 203].

Подводя итог всему изложенному в данной главе, хотелось бы отметить, что, обладая уникальной трехмерной структурной организацией по сравнению со всеми другими растворимыми глобулярными плазменными белками, будучи крайне уязвимым к окислению и, играя исключительную роль в гемостазе, фибриноген является объектом многочисленных исследований. Окислительная модификация фибриногена может нарушать как его структуру,

функционирование, так и поддержание баланса между коагуляционным и фибринолитическим звеньями плазменного гемостаза в целом. Приведенные выше данные свидетельствуют о том, роль многих окисленных участков фибриногена в аномальной сборке, в том числе многочисленных модифицированных остатков Met, является неизвестной. Хотя антиоксидантные метионины идентифицированы в различных белках [174, 204], в структуре фибриногена они пока не установлены. Поэтому, механизм антиоксидантной защиты фибриногеном других белков плазмы крови, по-прежнему, остается неясным.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

Объединенный пул образцов донорской плазмы крови был получен от ФГБУ “НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева” Минздрава России. Для проведения электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) использовали реактивы фирмы Amresco (USA). Остальные реагенты и соли для буферных растворов были приобретены в Sigma-Aldrich (USA). Анионообменный сорбент DEAE-ToyoPearl M650 (Tosoh Bioscience, USA) использовали для выделения FXIII. CNBr-Sepharose 4B (Amersham, UK), модифицированную лизином, применяли для выделения Glu-плазминогена из плазмы крови человека. Для осуществления превращения фибриногена в фибрин был использован тромбин человека ($\geq 2,000$ NIH ед./мг белка) (Sigma-Aldrich, USA). Для активации плазминогена использовали стрептокиназу (Bechringwerke, Germany). В качестве флуоресцентной метки для визуализации белков методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии использовали флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ) (Molecular Probes, USA). При пробоподготовке для ВЭЖХ-МС/МС анализа использовали дитиотреитол, йодацетамид (Merck, Darmstadt, Germany) и Trypsin Gold (mass spectrometry grade, V5280, Promega, USA).

2.2. Методы

2.2.1. Спиртовое выделение фибриногена

Фибриноген был выделен из цитратной плазмы человека модифицированным методом осаждения холодным этанолом по Дулитлу [205, 206]. К плазме при $+0$ °C постепенно добавляли 53% холодный (-20 °C) этанол, из расчета 0,18 мл спирта на 1 мл плазмы. Инкубировали 2 часа при $+4$ °C постоянно перемешивая, после чего осаждали 15 мин на 12000 g при $+4$ °C. Осадок трижды ресуспендировали в десятикратном объеме промывочного буфера (1 М глицин, 55 мМ цитрат натрия, 6,5% этанол, pH 6,0) и осаждали центрифугированием при

14000g. Полученный осадок растворяли в буфере (50 мМ Трис-НСl с 0,15 М NaCl 7,4), добавляли сульфат аммония до насыщения раствора 25% и белковый осадок переосаждали центрифугированием при 14000g.

2.2.2. Осаждение фибриногена из плазмы глицином

При использовании метода глицинового осаждения [198], к 0,1 мл плазмы добавляли 15,6 мг глицина и инкубировали в течение одного часа на льду, после чего осадок собирали микроцентрифугированием в течение 10 мин при +4 °С и ресуспендировали его в 50 мМ фосфатном буфере с рН 6,4, содержащем 0,15 М NaCl. Переосаждение повторяли еще 3 раза.

2.2.3. Выделение FXIII из плазмы крови человека

FXIII выделяли из плазмы крови человека методом фракционного осаждения сульфатом аммония с последующей ионообменной хроматографией на DEAE-ToyoPearl M650 [207]. К цитратной плазме крови при +0 °С постепенно добавляли насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, содержащего 1 мМ EDTA, рН 7,0 (1/5 от объема плазмы). Смесь инкубировали 2 часа при +0 °С постоянно перемешивая, после чего центрифугировали при 2°С на 14000 g 20мин. Осадок отмывали 25% раствором $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, содержащем 1 мМ EDTA рН 7,0 при 0° С и центрифугировали при 2° С на 14000 g, 10мин. Осадок растворили в 0,15 М KCl, содержащем 1 мМ EDTA; рН 7,0 (1/10 от исходного объема плазмы). рН полученного раствора довели до 5,4, медленно добавляя 1N HCl. При 0° и постоянном перемешивании осадили фракцию фибриногена 36 мл насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, содержащем 1 мМ EDTA, рН 5,5 на 100 мл раствора и центрифугировали на 14000 g 20 мин при 2°С. Далее осадок перерастворили в 0,5 М KCl, 1 мМ EDTA, рН 7,0 (1/20 исходного объема плазмы) и центрифугировали 20 мин на 14000 g при 0°С. При 0° и постоянном перемешивании осадили фракцию фибриногена насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 мМ EDTA рН 7,0. Центрифугировали на 14000 g 20 мин. Осадок растворили в 0,15 KCl 1 мМ EDTA, рН 7,0 (1/20 исходного объема плазмы). Для отделения фибриногена полученный

раствор термостатировали 5 мин при 56°C, затем сразу охладили до 0°C.

Для дальнейшей очистки и концентрирования FXIII полученный осадок центрифугировали на 14000 g при 0°C в течение 40 мин. В супернатант осадили $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ из расчета 20,8 г соли на 100 мл надосадка и центрифугировали на 14000 g 40 минут при 2°C. Осадок растворили в 3,5 мл 0,05 М Tris-HCl, 1 мМ EDTA; pH 7,5 и нанесли раствор белка на колонку с DEAE-650M Toyopearl. Градиент для элюции белков: основной буфер – 0,05 М Tris-HCl 1 мМ EDTA pH 7,5 (110 мл); элюирующий – 0,05 М Tris-HCl, 1 мМ EDTA, 0,2 М NaCl; pH 7,5 (110 мл). Полученный препарат хранили при +4°C в 50 мМ Трис-HCl, pH 7,4, содержащем 0,15 М NaCl и 5 мМ ЭДТА.

2.2.4. Выделение плазминогена из плазмы крови человека

Glu-плазминоген выделяли из плазмы крови человека методом аффинной хроматографии на Lys-Sepharose 4B (Amersham, Англия) при +4°C и pH 8,0 [208]. 340 мл плазмы разбавляли водой до 640 мл и пропускали через колонку с лизин-сефарозой со скоростью 75 мл/час, затем колонку промывали 0,3 М фосфатным буфером (pH 7,4) со скоростью 175 мл/час. до тех пор, пока оптическая плотность элюата при 280 нм не стала меньше 0,01. Затем плазминоген элюировали с помощью 0,2 М ϵ -аминокапроновой кислоты (pH 7,4) со скоростью 100 мл/час. Все этапы процедуры выполнялись при комнатной температуре. ϵ -аминокапроновую кислоту удаляли из раствора плазминогена с использованием центрифужных фильтров Amicon Ultra-4 10K (Millipore, США). Концентрацию плазминогена измеряли спектрофотометрически при 280 нм. Препарат плазминогена хранили при -20°C.

2.2.5. Окисление фибриногена O_3

Окисление фибриногена озоном проводили, как описано ранее [188, 206]. В кварцевый реактор, заполненный озоно-кислородной смесью, вносили раствор фибриногена 2 мг/мл в 50 мМ Трис-HCl с pH 7,4, содержащем 0,15 М NaCl. Полное истощение озона в каждом эксперименте подтверждалось

спектрофотометрически по полосе поглощения при 254 нм. Количество озона варьировали в диапазоне 75–300 мкМ.

2.2.6. Окисление фибриногена H_2O_2

Обработку образцов H_2O_2 осуществляли в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7.4), содержащем 0,15 М NaCl. Количество окислителя варьировали в диапазоне 150–1000 мкМ [209, 210]. Образцы фибриногена (1 мг/мл) обрабатывали окислителем в течение 60 минут при температуре +37°C. Реакцию окисления останавливали 10-молярным избытком L-метионина. Неокисленному образцу придавали тот же состав, что и окисленным, путем добавления предварительно смешанных H_2O_2 и метионина.

2.2.7. Окисление фибриногена HOCl/OCl^-

Обработку образцов HOCl/OCl^- осуществляли в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7.4), содержащем 0,15 М NaCl. Окисление фибриногена индуцировали HOCl/OCl^- , как описано ранее [191, 211, 212]. Концентрации HOCl/OCl^- стандартизировали при длине волны 292 нм и коэффициентом экстинкции $350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [213]. Количество окислителя варьировали в диапазоне 10–100 мкМ. Образцы фибриногена (1 мг/мл) обрабатывали окислителем в течение 60 минут при температуре +37°C. Реакцию окисления останавливали 10-молярным избытком L-метионина. Неокисленный образец имел тот же состав, что и окисленный, за счет добавления, предварительно прореагировавшего с метионином HOCl/OCl^- .

2.2.8. Измерение спектров поглощения образцов окисленного фибриногена

Измерения оптической плотности образцов фибриногена проводили на UV/VIS-спектрофотометре СФ-2000 (Россия). Спектры поглощения всех образцов до и после окисления регистрировали с помощью кварцевых кювет с длиной оптического пути 1 см.

2.2.9. Ковалентная сшивка полипептидных цепей фибрина, катализируемая FXIIIa

Ковалентную сшивку цепей фибриногена катализирует активированный FXIII. К 1 мл раствора фибриногена 2 мг/мл добавляли 0,05 мл раствора тромбина (0,25 ед. NIH) и 0,01 мл активированного FXIII. Через 45 мин реакцию останавливали добавлением электрофорезного буфера для образцов с ДСН и нагреванием при 90°C в течение 5 мин [209]. Образование ковалентных сшивок оценивали методом денатурирующего электрофореза в ПААГ (4% концентрирующий гель, 8% разделительный гель) восстановленных образцов в присутствии 1% β-меркаптоэтанола.

2.2.10. Накопление продуктов деградации молекул фибриногена под действием плазмينا

Для оценки влияния окисления молекулы фибриногена на образование продуктов плазминового гидролиза к 200 мкл раствора фибриногена (1 мг/мл) добавляли 50 мкл раствора тромбина (0,5 ед./мл) и 15 мкл плазмينا (0,1 мг/мл) и инкубировали 15 минут. Реакцию останавливали добавлением электрофорезного буфера для образцов с ДСН без β-меркаптоэтанола и нагреванием при 90°C в течение 5 мин. Плазмин предварительно получали в результате реакции плазминогена со стрептокиназой (Bachringwerke, Германия) в течение 40 мин при +37°C, в молярном соотношении 100/1, соответственно [214]. Образование продуктов деградации фибрина в результате гидролиза плазмином проверяли с помощью электрофореза в ПААГ (4% - концентрирующий гель, 8% - разделяющий гель) в присутствии ДСН.

2.2.11. Оценка скорости образования и плазминового гидролиза фибрина

Скорость полимеризации фибрина и изменения мутности сгустка при

гидролизе оценивали спектрофотометрически при 350 нм, в течение часа. Полимеризацию фибрина инициировали добавлением к 200 мкл раствора фибриногена (1 мг/мл) 50 мкл раствора тромбина (0,5 ед./мл) [212, 215]. Кривые полимеризации фибрина были охарактеризованы по максимальной оптической плотности и максимальному наклону. Максимальная оптическая плотность растущих сгустков фибрина, регистрировалась через 60 минут после начала полимеризации. Эта величина связана с диаметром фибриновых волокон и количеством протофибрилл в одном волокне. Максимальный наклон ($V_{\text{макс}}$) представляет собой наклон самой крутой части кривой полимеризации и отражает скорость латеральной ассоциации протофибрилл.

При измерении скорости гидролиза к смеси фибриногена и тромбина добавляли 30 мкл плазминогена (0,1 мг/мл) и 2,5 мкл стрептокиназы (0,05 мг/мл) [212, 216]. Кривые полимеризации фибрина были охарактеризованы по время полулизиса сгустка и $V_{\text{макс}}$ деградации сгустков. Время полулизиса соответствует периоду времени от достижения максимальной концентрации фибрина до 50% лизиса сгустка. $V_{\text{макс}}$ представляет собой наклон самой крутой части кривой гидролиза сгустков фибрина.

2.2.12. Исследование изменений структуры фибринового геля методом упругого светорассеяния

Влияние окисления на структуру фибриновой сети оценивали методом упругого светорассеяния (УСР) с помощью спектрометра Malvern (Великобритания) с гелий-неоновым лазером ($\lambda=632,8$ нм), по методике, описанной ранее [188, 212]. Величину μ (среднее отношение массы к длине волокон фибрина) оценивали методом рэлеевского светорассеяния на спектрометре Malvern 4400 в цилиндрических ячейках в интервале углов рассеяния θ 20–120°. Экспериментальные данные анализировали согласно уравнению Касасса [217], основанное на асимптотическом поведении рассеяния для очень длинных и тонких стержней. Для всех образцов процедуры измерения включали три биологические повторности.

2.2.13. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

Визуализацию статичной структуры фибринового сгустка, а также кинетики плазминового гидролиза гелей проводили методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с использованием флуоресцентной метки флуоресцеин изотиоционата (ФИТЦ). В первом типе экспериментов использовали фибриноген с добавкой ФИТЦ-фибриногена, во втором – не меченый фибриноген и ФИТЦ-плазминоген. Получение конъюгатов белков с ФИТЦ проводили в 0,1 М бикарбонатном буфере (pH 9,0) в течение 2 часов (+4°C) при постоянном перемешивании. Реакцию останавливали получасовой инкубацией с 30 мМ гидроксилламин гидрохлоридом (pH 8,5). Для очистки конъюгата от непрореагировавшей метки смесь центрифугировали в течение 1 минуты при 16000 g на микроцентрифужных колонках с Sephadex G-25. Степень мечения и концентрацию белка контролировали спектрофотометрически [218].

Для изучения статичной структуры фибринового геля к смеси немеченого и ФИТЦ-меченого фибриногена (9:1) добавляли тромбин (5 нМ) и CaCl₂ (5 мМ), общий объем образца доводили до 60 мкл 20 мМ HEPES (pH 7,4), содержащим 140 мМ NaCl, и инкубировали в течение часа при +37°C во влажной камере. Для получения микрофотографий использовали микроскоп Zeiss Axio Observer Z1 с конфокальным модулем CSU-X1M 5000 (Carl Zeiss, Jena, Germany) с масляным объективом 100×.

Для визуализации кинетики гидролиза фибринового геля и распределения плазмينا в сгустке смешивали 3 мкМ фибриногена, 5 мМ CaCl₂, 5 нМ тромбина, 0,3 мкМ ФИТЦ-плазминогена и стрептокиназу (соотношение стрептокиназы к плазминогену 1:50 в финальном разведении) [219]. Общий объем образца доводили до 60 мкл 20 мМ HEPES (pH 7,4), содержащим 140 мМ NaCl. Съемку сгустка проводили с интервалом в 30 секунд от времени добавления тромбина.

2.2.14. Подготовка образцов и анализ методом ВЭЖХ-МС/МС

Восстановление дисульфидных связей осуществляли с использованием

5 мМ дитиотреитола, алкилирование проводили 10 мМ йодацетамидом с последующим расщеплением образцов трипсином в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, белок разбавляли 50 мМ трис-НСl-буфером с 0,15 М NaCl (рН 8,0) и гидролизовали трипсином при соотношении 2 мкг трипсина / 100 мкг фибриногена в течение ночи при +37°C. Реакцию останавливали добавлением муравьиной кислоты до конечной концентрации 0,1%.

Эксперименты ВЭЖХ-МС/МС проводили на нано-ЖХ Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., Санта-Клара, США), совмещенном с масс-спектрометром высокого разрешения 7Т LTQ-FT Ultra (Thermo, Бремен, Германия). Для хроматографического разделения 1 мкл каждого образца вводили в колонку C18 (75 мкм × 12 см, Reprosil-Pur Basic C18, 3 мкм; Dr. Maisch HPLC GmbH, Аммербух-Энтринген, Германия), изготовленную по опубликованному ранее методу [220]. Для подвижной фазы использовали смесь двух растворов: 0,1% муравьиной кислоты в Н₂О (раствора А) и ацетонитрила (раствора Б). Хроматографию проводили в линейном градиенте путем увеличения относительного содержания раствора Б от 3% до 50% в течение 60 мин. Напряжение ионного распыления было равно 2,3 кВ. Масс-спектрометрический (МС) анализ пептидных фракций проводили с использованием программного обеспечения Xcalibur (Thermo Electron, Бремен, Германия) с автоматическим измерением спектров в 2-этапном режиме. На первом этапе в ячейке ICR измерялись точные массы пептидов в диапазоне $m/z = 300-1600$ с разрешением $R = 50\ 000$ при $m/z = 400$ (количество ионов в ячейке ионно-циклотронного резонанса ('ion cyclotron resonance', ICR) задавали 5×10^6). На втором этапе пять наиболее интенсивных пиков первого этапа подвергались столкновительной диссоциации ('collision induced dissociation', CID) и регистрировались спектры фрагментации в линейной ионной ловушке (количество ионов было установлено равным 3×10^4). После фрагментации соответствующие родительские массы динамически исключались из рассмотрения в течение следующих 30 с [221]. Чтобы оценить воспроизводимость полученных данных и повысить их достоверность, для каждого типа образцов проводили три биологических повтора,

каждый из которых анализировали в трех повторностях.

2.2.15. Анализ результатов ВЭЖХ-МС/МС

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. Точность определения массы иона-предшественника была установлена на уровне 15 ppm, а точность определения массы фрагментов МС/МС составляла 0,05 Да. Пороговый уровень ложного обнаружения ('false discovery rate', FDR) для пептидов составил <0,1%. Для поиска модификаций устанавливали ограничение на поиск трех допустимых переменных посттрансляционных модификаций (ПТМ) в пептиде, согласно ранее опубликованным рекомендациям [222, 223, 224]. 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. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Окисление фибриногена, индуцированное O_3

В этой главе будет рассмотрено окисление фибриногена, инициированное озоном. Принадлежащий к семейству АФК озон можно рассматривать как чрезвычайно удобный окислитель для моделирования АФК, возникающих *in vivo* [188, 225]. 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 [188, 226]. Таким образом, химия повреждения белков озоном считается во многих отношениях схожей с воздействием других АФК [188, 227, 228].

3.1.1. Влияние окисления на целостность полипептидных цепей фибриногена

Результаты электрофореза показывают, что все три полипептидные цепи $A\alpha$, $B\beta$ и γ окисленного фибриногена сохраняют свою целостность, что подразумевает отсутствие внутримолекулярного расщепления, даже при концентрации окислителя 300 мкМ (Рисунок 6А). На полученной электрофореграмме отсутствуют полосы высокомолекулярных белковых агрегатов, свидетельствуя об отсутствии межмолекулярных ковалентных сшивок в результате окисления [206].

3.1.2. Окисление остатков ароматических аминокислот фибриногена

Изменения УФ-спектров образцов в области 240–360 нм (Рисунок 6Б) показывают, что озон активно взаимодействует с ароматическими аминокислотными остатками триптофана, тирозина и фенилаланина, присутствующими в молекуле фибриногена [206]. Смещение максимума поглощения в коротковолновую область и уменьшение его интенсивности

обусловлены образованием хиноидных структур из феноксильных и имидазольных ядер аминокислотных остатков под действием окислителя [229]. Эти эффекты коррелируют с увеличением концентрации озона.

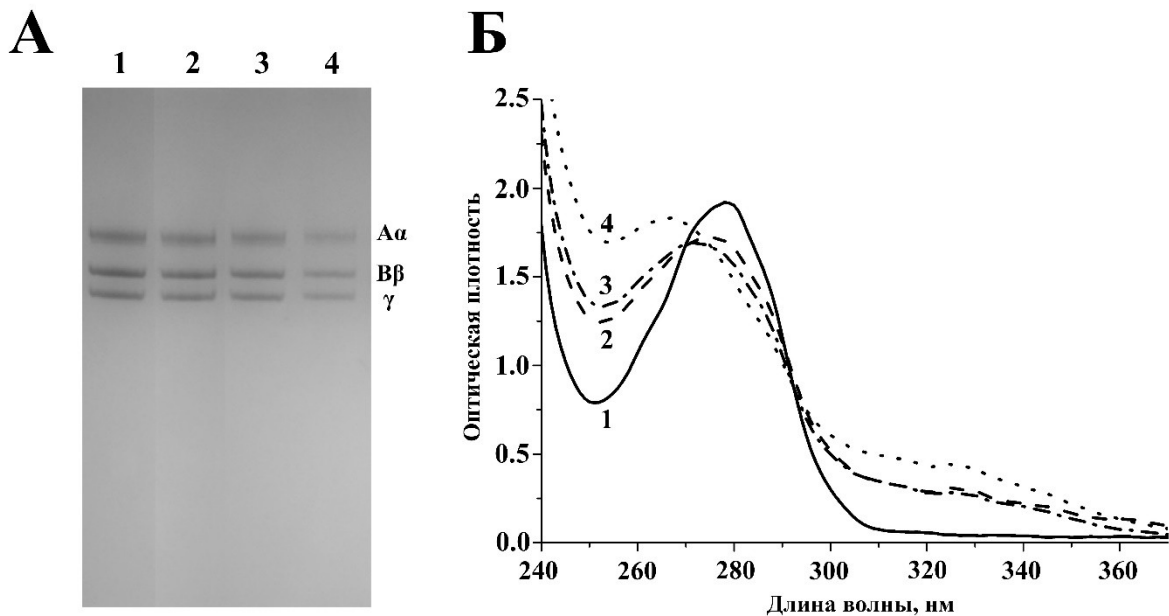


Рисунок 6 – Оценка возможного изменения размера молекул фибриногена, а также окисления его ароматических аминокислотных остатков под воздействием озона. (А) Результаты денатурирующего электрофореза в ПААГ. (Б) Анализ спектров оптического поглощения в диапазоне λ 240-360 нм. 1 - неокисленный фибриноген; 2-4 - фибриноген, окисленный 75 мкМ (2), 150 мкМ (3) и 300 мкМ озона

3.1.3. Окислительная модификация фибриногена: общие аспекты, аминокислотные остатки и структурные участки

Детектированные окислительные модификации молекулы фибриногена представлены на Рисунке 7 и в Таблице 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: Met>His>Trp>Tyr>Pro>Lys [206].

Таблица 2 – Список детектированных окислительных модификаций и их количество для образцов неокисленного и окисленного озоном фибриногена

Изменение моноизотопной массы	Тип окислительной модификации	Процент модифицированных аминокислотных остатков		
		Контроль	150 мкМ	300 мкМ
Аα цепь				
-22.031969	Окисление His до Asp H(-1) C(-2) N(-1) O	3	10	11
-23.015984	Окисление His до Asn H(-2) C(-2) N(-2) O(2)	-	8	9
+15.994915	Окисление (+O)	16	20	21
+31.989828	Диокисление (+2O)	5	10	15
+47.984744	Триокисление (+3O)	1	1	-
+27.994915	Формилирование (+CO)	1	-	-
-27.994915	Окисление Pro до пирролидона C(-1) O(-1)	-	-	1
-30.010565	Окисление Pro до пирролидинона H(-2) C(-1) O(-1)	1	-	-
+3.994915	Окисление Trp до кинуренина C(-1) O	1	6	7
-94.04186	Дегидроаланин H(-6) C(-6) O(-1)	-	1	1
+43.989829	Карбоксилирование C O(2)	-	4	1
+13.979265	Окисление Trp до оксолактона H(-2) O	-	2	3
+44.985077	Окисление Trp до нитро H(-1) N O(2)	-	1	-
+19.989829	Окисление Trp до гидрокскинуренина C(-1) O(2)	-	1	3
+33.961028	Хлорирование остатков Trp H(-1) Cl	-	1	1
Вβ цепь				
-22.031969	Окисление His до Asp H(-1) C(-2) N(-1) O	-	4	5
-23.015984	Окисление His до Asn H(-2) C(-2) N(-2) O(2)	-	1	1

+15.994915	Окисление (+O)	12	19	22
+31.989828	Диокисление (+2O)	3	11	12
-30.010565	Окисление Pro до пирролидинона H(-2) C(-1) O(-1)	1	1	1
+3.994915	Окисление Trp до кинуренина C(-1) O	-	7	10
+43.989829	Карбоксилирование C O(2)	-	-	1
+44.985077	Окисление Trp до нитро H(-1) N O(2)	-	1	1
+19.989829	Окисление Trp до гидрокскинуренина C(-1) O(2)	-	2	3
+15.010899	Окисление Tyr до 2-аминотирозина H N	-	-	1
γ цепь				
-22.031969	Окисление His до Asp H(-1) C(-2) N(-1) O	-	6	6
-23.015984	Окисление His до Asp H(-2) C(-2) N(-2) O(2)	2	6	5
+15.994915	Окисление (+O)	9	12	12
+31.989828	Диокисление (+2O)	-	4	3
+27.994915	Формилирование (+CO)	1	2	2
+3.994915	Окисление Trp до кинуренина C(-1) O	-	2	2
+13.979265	Окисление Trp до оксолактона H(-2) O	-	1	-

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 [206]. 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 7 и 8).

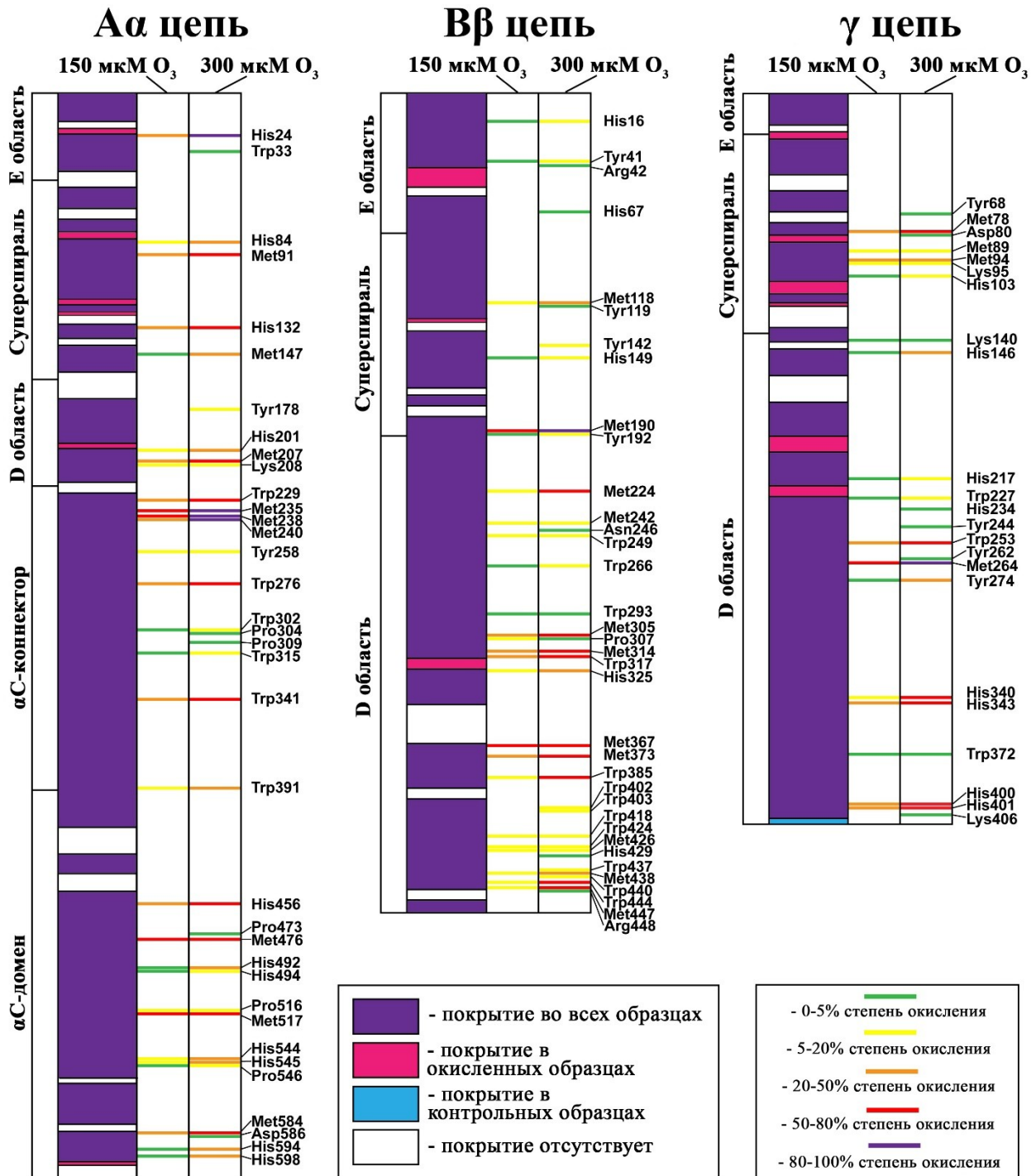


Рисунок 7 – Схематическое изображение полипептидных цепей фибриногена с отмеченными детектированными участками молекулы (покрытие) и окисленными аминокислотными остатками

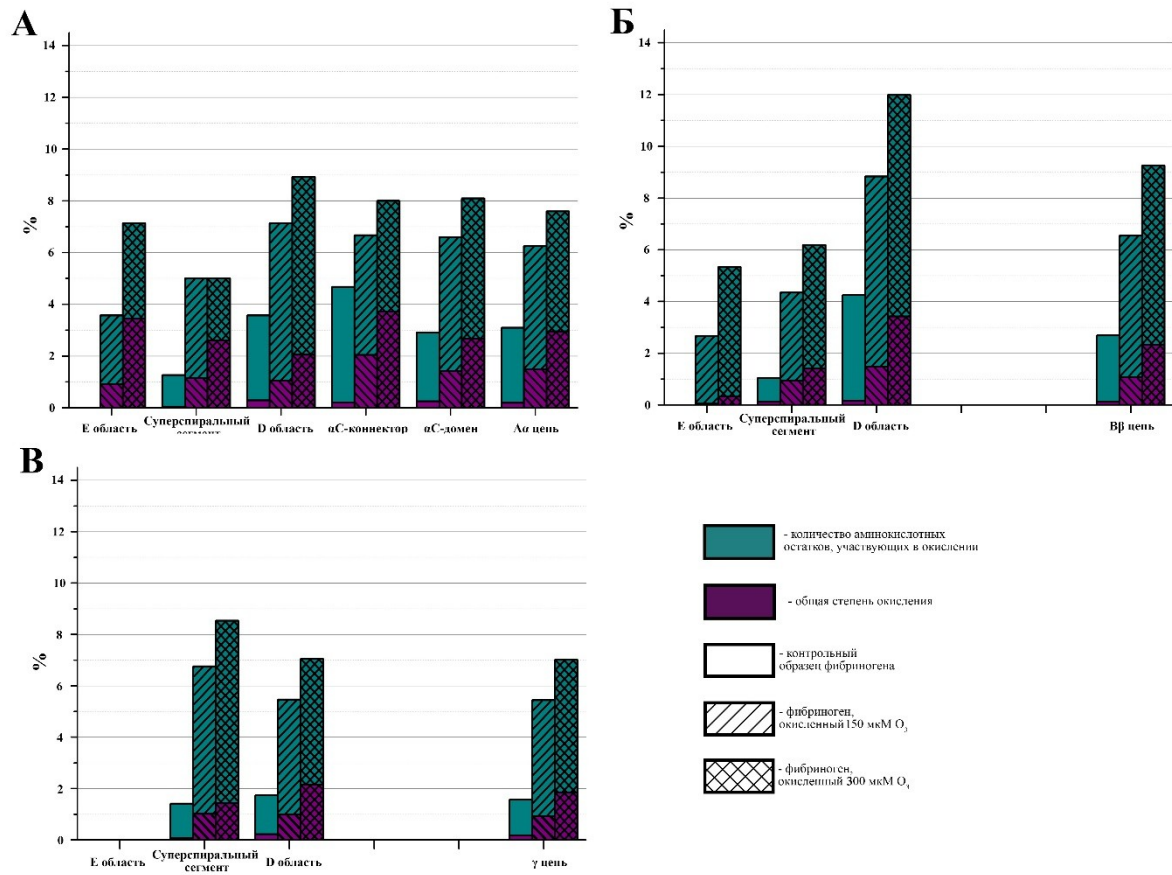


Рисунок 8 – Данные о распределении окислительных модификаций (количество аминокислотных остатков, участвующих в окислении, и общая степень окислительных изменений) по структурным участкам Аα (А), Вβ (Б) и γ (В) цепей фибриногена

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 [206]. 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 8).

3.2. Окисление фибриногена, индуцированное H_2O_2

В главе описаны результаты окислительной модификации, полученные при обработке фибриногена перекисью водорода, 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 [230], 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 [231].

3.2.1. Влияние окисления на целостность полипептидных цепей фибриногена

На Рисунке 9А 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 [209].

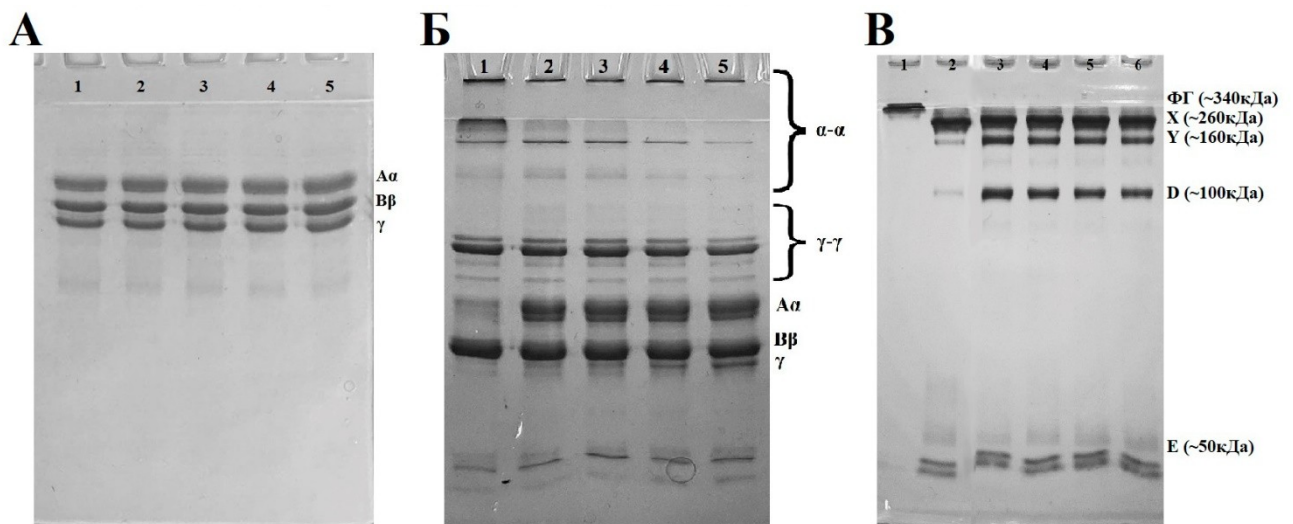


Рисунок 9 – Оценка влияния окисления фибриногена H_2O_2 на размер его молекул (А), продуктов реакции с FXIIIa (Б) и продуктов гидролиза плазмином (В) методом SDS-электрофореза в ПААГ. (А) Результаты для полипептидных цепей (12% гель): 1 – неокисленный фибриноген, 2-5 – фибриноген, окисленный 150 мкМ, 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 – негидролизированный 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

3.2.2. Влияние окисления на ковалентную сшивку γ и α цепей фибрина

В присутствии FXIIIa полипептидные цепи фибрина участвуют в ковалентном сшивании, что проявляется в образовании γ - γ -димеров и α - α полимеров [232]. С повышением концентрации окислителя количество образующихся α - α полимеров и γ - γ -димеров снижается, о чем свидетельствует также увеличение содержания исходных $\text{A}\alpha$ - и γ цепей (Рисунок 9Б). Очевидно, что это является следствием окислительной модификации структуры молекулы фибриногена [209].

3.2.3. Влияние окисления на гидролиз молекул фибриногена плазмином

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 9В) [209].

3.2.4. Изменение структуры фибрина, образованного из окисленного H_2O_2 фибриногена

Методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) были получены изображения фибринового геля, образованного из нативного и окисленного фибриногена. (Рисунок 10). Как свидетельствуют результаты данной работы, воздействие исследуемых количеств H_2O_2 (50 и 300 мкМ) на образцы фибриногена не сопровождается значимым эффектом на структуру образованного фибрина [210].

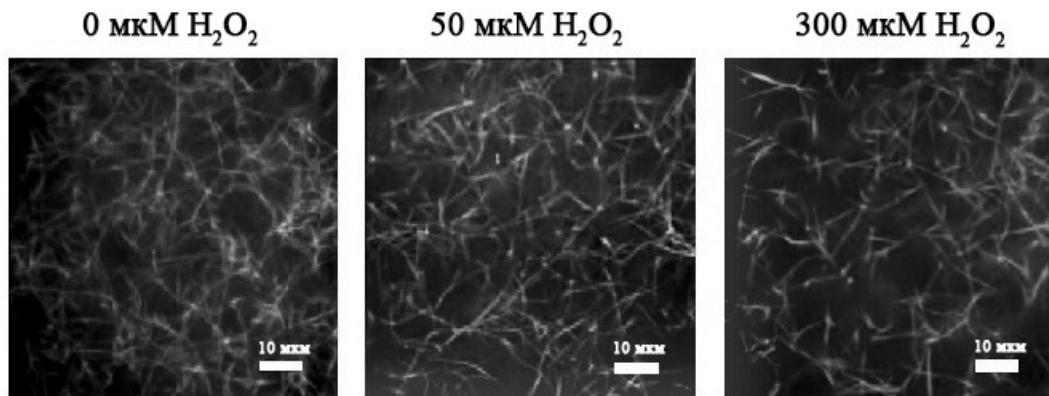


Рисунок 10 – Влияние окисления фибриногена H_2O_2 на структуру фибринового сгустка

3.2.5. Окислительные модификации фибриногена, индуцированные окислением H_2O_2

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) [209]. Как видно из Рисунка 11, 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 α Met91, A α Met207, A α Met240, A α Trp276, A α Met476, A α Met517, A α Met584, B β Met118, B β Met190, B β Met305, B β Met314, B β Met367, γ Met78 и γ 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.

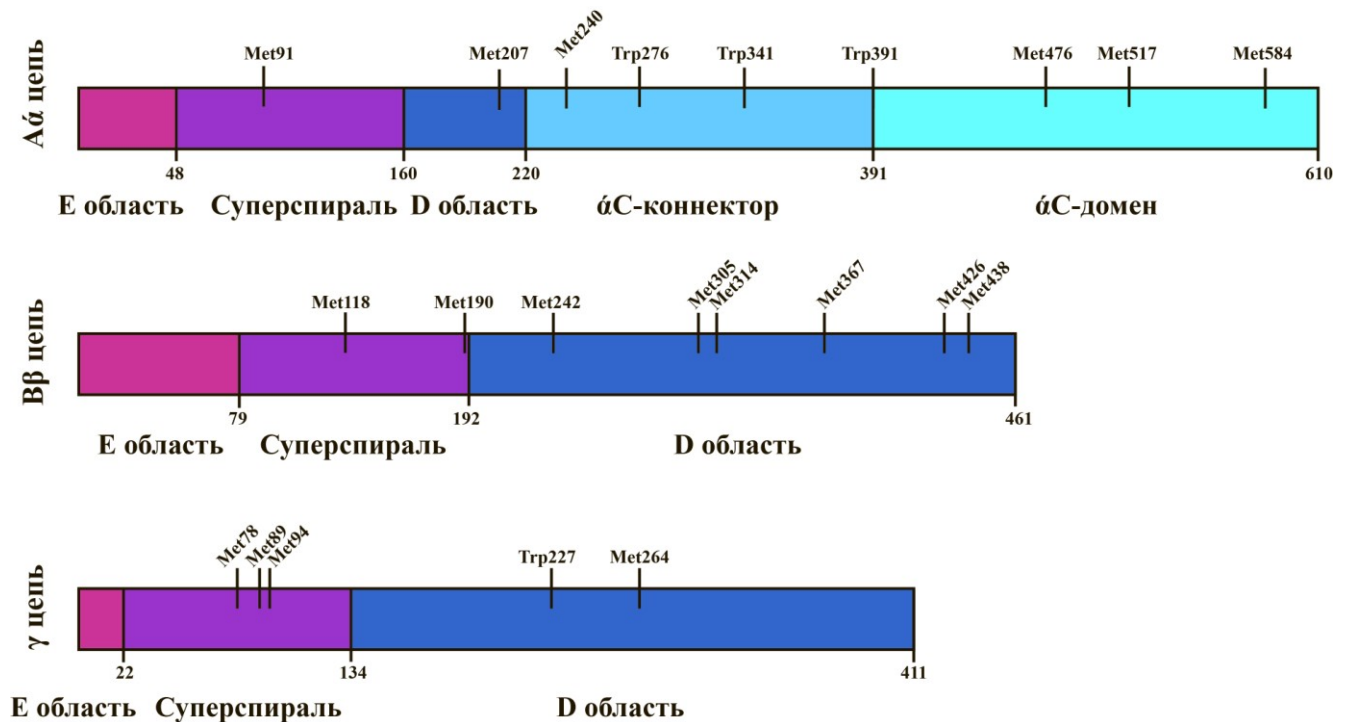


Рисунок 11 – Схематическое изображение полипептидных цепей фибриногена с детектированными окислительными модификациями

Локализованные в Е области аминокислотные остатки, которые участвуют в связывании тромбина ($\text{A}\alpha\text{Trp33}$, $\text{A}\alpha\text{Phe35}$, $\text{A}\alpha\text{Asp38}$, $\text{A}\alpha\text{Glu39}$, $\text{B}\beta\text{Ala68}$, $\text{B}\beta\text{Asp69}$, γAsp27 и γSer30 [233]), не были подвержены окислительной модификации, что указывает на сохранение тромбин-связывающих сайтов ФГ при окислении. Содержащей наибольшее количество окислительных сайтов является αС-область ($\text{A}\alpha\text{Met240}$, $\text{A}\alpha\text{Trp276}$, $\text{A}\alpha\text{Trp341}$, $\text{A}\alpha\text{Trp391}$, $\text{A}\alpha\text{Met476}$, $\text{A}\alpha\text{Met517}$, $\text{A}\alpha\text{Met584}$) [209].

Для окисленного белка наблюдается замедление накопления α-α полимеров и γ-γ димеров, о чем свидетельствует также увеличение количества исходных Аα и γ цепей (Рисунок 9Б). FXIIIa образует ковалентные сшивки между $\gamma\text{Gin398/399}$ и γLys406 [234], продуцируя γ-γ димеры и, с более медленной скоростью, α-α полимеры между Аα-цепями в нескольких сайтах: $\text{A}\alpha\text{Gin328}$, $\text{A}\alpha\text{Gin336}$, $\text{A}\alpha\text{Lys508}$, $\text{A}\alpha\text{Lys556}$ и $\text{A}\alpha\text{Lys562}$ [235]. Все детектированные остатки $\gamma\text{Gin398/399}$ и γLys406 , $\text{A}\alpha\text{Gin336}$, $\text{A}\alpha\text{Lys508}$ 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 [209].

3.3. Индуцированное $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ окисление фибриногена: влияние на структуру и функционирование

Хлорноватистая кислота ($\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$) — основной сильный окислитель, вырабатываемый нейтрофилами, и мощный бактерицидный агент. *In vitro* один миллион стимулированных нейтрофилов может производить 0,1 мкМ $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$, и эта концентрация может убить 15 миллионов бактерий *Escherichia coli* менее чем за 5 минут [236]. Хотя $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ обладает мощными бактерицидными свойствами и играет важную роль в иммунной системе человека, этот окислитель также вызывает повреждение тканей, особенно при воспалительных состояниях. Концентрации $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ *in vivo* оцениваются в диапазоне 12–250 мкМ [237]. В данной главе описаны результаты исследования окисления фибриногена, индуцированного $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$.

3.3.1. Кинетика превращения фибриногена в фибрин и гидролиз фибрина плазмином

Для мониторинга кинетики катализируемого тромбином превращения фибриногена в фибрин измеряли изменение поглощения фибриновых гелей при длине волны 350 нм во времени (Рисунок 12А). При повышении концентрации $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ наблюдается уменьшение максимального наклона полимеризационной кривой, что свидетельствует о замедлении процесса гелеобразования. Также значительно снижается показатель максимальной оптической плотности (на 9% при концентрации $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ 25 мкМ, 46% - при 50 мкМ, и на 92% при 100 мкМ $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$), 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 12А, Б) [211, 212, 238].

Кинетика плазминового гидролиза фибриновой сети, образованной из окисленного 10 мкМ $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ фибриногена, не отличалась от таковой в контрольном образце (Рисунок 12Г). Начиная с концентрации окислителя 25 мкМ,

в образцах наблюдается увеличение времени полулизиса, что свидетельствует о значительном замедлении гидролиза фибрина (Рисунок 12Д). При 25 мкМ окислителе максимальный наклон кривой деградации сгустков фибрина (V_{\max}) снижается в 1,2 раза по сравнению с контролем, а при обработке 100 мкМ – в 3,2 раза (Рисунок 12Е) [212, 238]. Эти эффекты напрямую связаны с более высокой плотностью волокон окисленной фибриновой сети, состоящей из более тонких волокон, более устойчивых к фибринолизу [191].

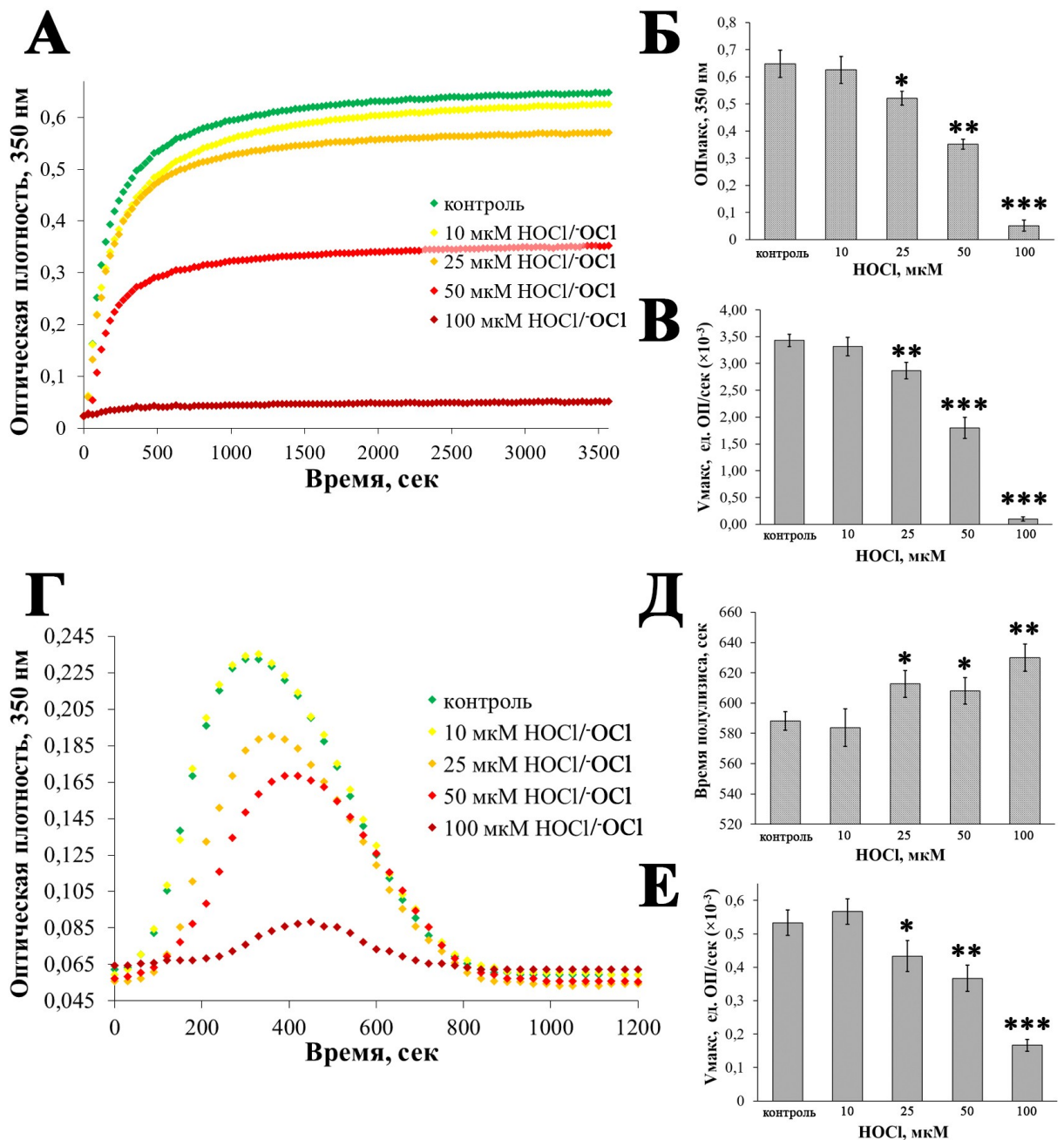


Рисунок 12 – Анализ влияния окисления $\text{НОСІ}^-/\text{ОСІ}$ на формирование фибринового сгустка и фибринолиз. (А) Кривые полимеризации фибрина,

образованного из неокисленного фибриногена и фибриногена, окисленного $\text{НОСл}^-/\text{ОСл}$ 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

3.3.2 Влияние окисления фибриногена на морфологию фибрина

Полученные методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) изображения фибринового геля из ФИТЦ-меченного фибриногена позволяют визуализировать изменения в статической структуре сгустка (Рисунок 13, столбец 1). Образцы гелей, полученных из нативного и обработанного 10 мкМ $\text{НОСл}^-/\text{ОСл}$ фибриногена, не показали значительных различий в структуре. При концентрациях $\text{НОСл}^-/\text{ОСл}$ 25 и 50 мкМ отчетливо видно уплотнение геля и меньший размер гелевых пор по сравнению с нативным образцом. При повышении концентрации $\text{НОСл}^-/\text{ОСл}$ до 100 мкМ не удалось получить фибриновые гели с выраженной структурой [212, 238].

Для исследования распределения пламина при фибринолизе фибриновый гель получали из немеченого фибриногена. На первом этапе ФИТЦ-меченный пламин(оген) связывается с волокнами фибрина, визуализируя структуру сети. С течением времени происходит гидролиз геля (Рисунок 13, столбцы 2-4). Нативный фибриноген и фибриноген, обработанный 10 мкМ $\text{НОСл}^-/\text{ОСл}$, 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 [212, 238].

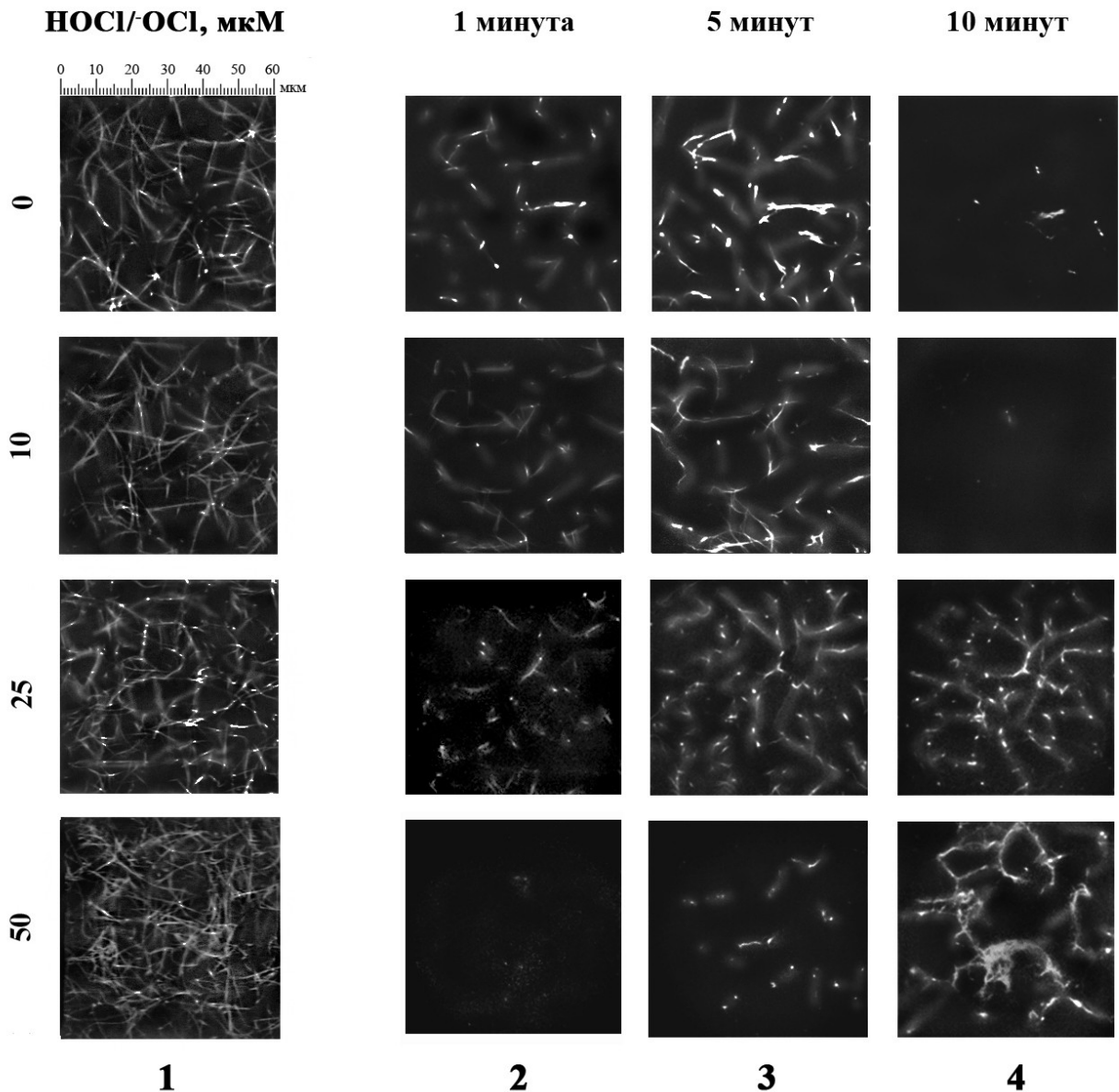


Рисунок 13 – Архитектура фибринового сгустка, образованного из нативного фибриногена и окисленного HOCl/OCl фибриногена (столбец 1) и динамика распределения пламина(огена) при фибринолизе (столбцы 2-4)

3.3.3. Влияние окисления на структуру окисленной фибриновой сети методом УСР

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 14). 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 [217].

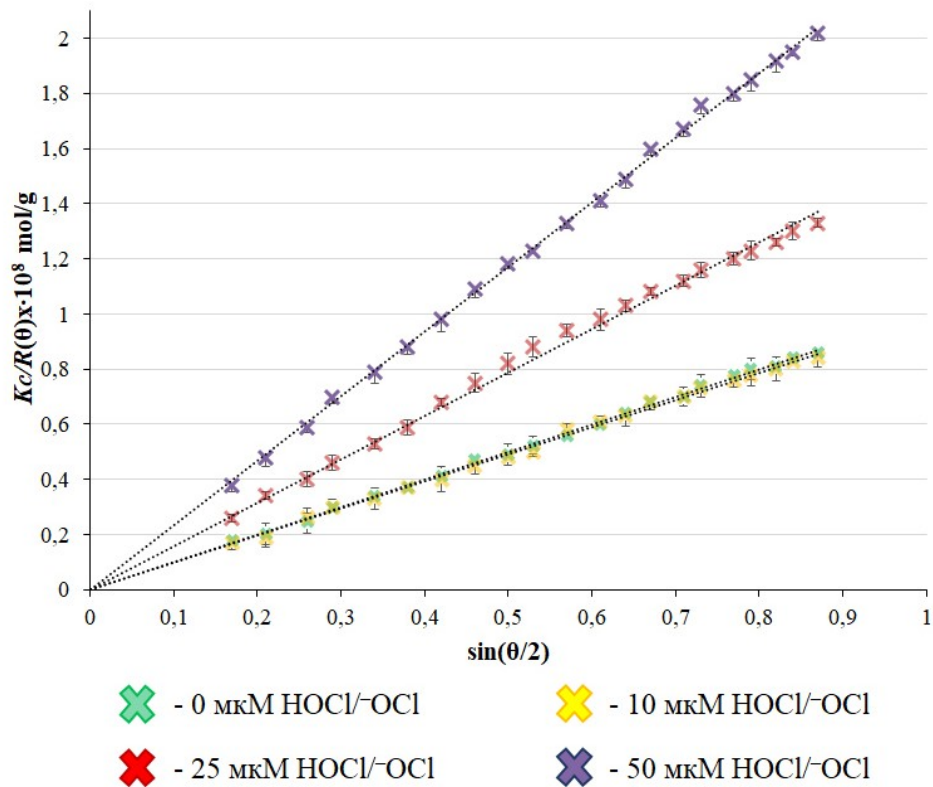


Рисунок 14 – Угловые зависимости интенсивности упругого светорассеяния образцов фибрина

Исходя из вышеприведенного уравнения (1), тангенс угла наклона прямых линий позволяет вычислить значения μ . 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 14). Поскольку сильно вытянутая

стержнеобразная молекула фибриногена имеет длину около 45 нм и диаметр 2 – 5 нм [239], значение μ 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 μ 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 [212, 238].

3.3.4. Масс-спектрометрический анализ окислительной модификации молекула фибриногена, индуцированной HOCl/OCl.

Методом ВЭЖХ-МС/МС выявлено окисление 24 аминокислотных остатка в присутствии HOCl: A α Met91, A α Lys125, A α Lys129, A α Met207, A α Met240, A α Trp276, A α Met476, A α Pro511, A α Met517, A α Met584, B β Met190, B β Met224, B β Pro235, B β Met305, B β Trp317, B β Met367, B β Met373, B β Trp418, B β Trp424, B β Met426, γ Met78, γ Met89, γ Met94 и γ 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 CHSOH (детиометила) из боковой цепи сульфоксида метионина (-48,00); окисление лизина до аминокадипинового полуальдегида (-1,03) и окисление пролина до пирролидона (-27,99) (Таблица 3) [212, 238].

Таблица 3 – Список детектированных модификаций аминокислотных остатков молекулы фибриногена

Аминокислотный остаток	Количество пептидов, содержащих модифицированный аминокислотный остаток, %					Тип модификации
	Контроль	10μM НОСІ/ -ОСІ	25μM НОСІ/ -ОСІ	50μM НОСІ/ -ОСІ	100μM НОСІ/ -ОСІ	
Аα цепь						
Met91	7,5	9,6	12,1	15,9	46,5	Окисление (+15.99); отщепление метантиола от боковой цепи Met (-48.00)
Lys125	0,0	2,6	8,0	9,7	2,8	Окисление Lys до аминокадипинового полуальдегида (-1.03)
Lys129	0,0	<1	2,0	2,2	<1	Окисление Lys до аминокадипинового полуальдегида (-1.03)
Met207	8,7	14,7	17,1	20,4	54,2	Окисление (+15.99); отщепление метантиола от боковой цепи Met (-48.00)
Met240	17,9	22,9	23,6	27,8	56,1	Окисление (+15.99); отщепление метантиола от боковой цепи Met (-48.00)
Trp276	<1	<1	1,9	4,4	3,2	Окисление (+15.99); окисление Trp до оксолактона (+13.98)
Met476	<1	8,8	14,4	41,6	52,9	Окисление (+15.99)
Pro511	12,3	19,1	18,0	22,2	23,6	Окисление (+15.99)
Met517	18,2	34,4	40,1	59,3	66,0	Окисление (+15.99)
Met584	<1	10,4	22,3	70,2	82,9	Окисление (+15.99)
Вβ цепь						

Met190	4,9	5,8	7,3	17,2	32,4	Окисление (+15,99); отщепление метантиола от боковой цепи Met (-48.00)
Met224	1,5	1,6	2,8	2,7	1,9	Окисление (+15,99)
Pro235	8,8	10,5	10,0	12,0	9,1	Окисление Pro до пирролидона (-27.99)
Trp249	<1	1,9	1,5	1,6	1,3	Окисление (+15,99)
Met305	4,1	6,3	9,2	15,0	33,7	Окисление (+15,99); отщепление метантиола от боковой цепи Met (-48.00)
Met314	1,5	3,7	1,6	1,3	1,0	Окисление (+15,99)
Trp317	2,0	4,2	6,0	6,6	1,0	Окисление (+15,99)
Met361	90,9	90,2	92,5	94,4	99,6	Окисление (+15,99), диокисление (+31.99)
Met367	7,7	24,6	22,5	46,9	78,0	Окисление (+15,99)
Trp370	<1	<1	<1	<1	1,3	Окисление (+15,99)
Met373	2,9	6,7	7,5	15,3	8,1	Окисление (+15,99)
Trp418	<1	2,5	4,4	2,4	2,2	Окисление (+15,99)
Trp424	<1	2,1	4,9	4,3	2,3	Окисление (+15,99)
Met426	2,5	2,9	2,8	8,8	14,2	Окисление (+15,99)
Met438	2,9	3,5	3,4	3,2	3,7	Окисление (+15,99)
γ цепь						
Met78	6,9	5,9	5,6	9,6	26,1	Окисление (+15,99)
Met89	2,1	3,0	3,6	9,2	13,8	Окисление (+15,99)
Met94	3,5	32,6	47,0	67,0	74,9	Окисление (+15,99)
Met264	1,2	13,2	29,1	28,1	28,2	Окисление (+15,99)

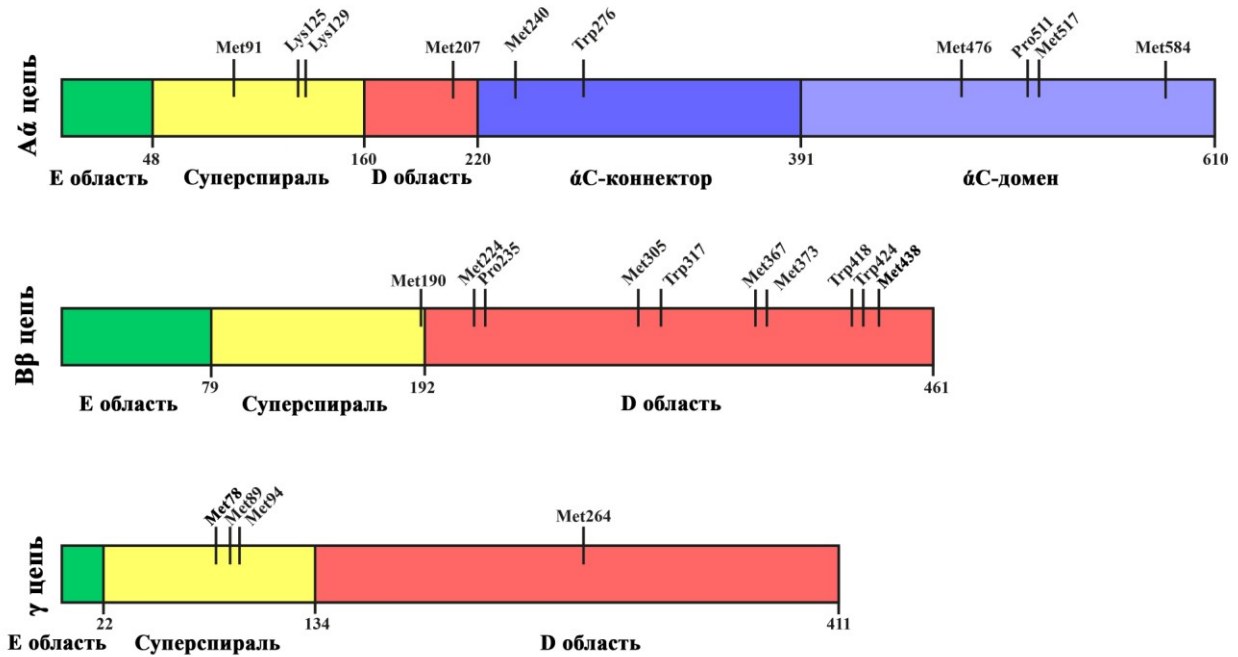


Рисунок 15 – Схематическое изображение полипептидных цепей фибриногена с детектированными окислительными модификациями

Присутствие окислительных модификаций аминокислотных остатков в контрольном образце можно объяснить окислением во время подготовки и хранения образца. Как видно из Рисунка 15, модифицированные аминокислотные остатки присутствуют во всех трех полипептидных цепях фибриногена. При рассмотрении отдельных цепей фибриногена можно отметить, что наименьшее количество центров окисления выявлено в γ -цепи, а наиболее окисляемыми структурными участками оказались области D [212, 238].

Данные ВЭЖХ-МС/МС показывают, что метионины (16 из 24) являются преобладающей мишенью для окислителя [212, 240]. 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 Е. 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 аминокетонального полуальдегида. В пределах двух

периферических областей D (участки A α 161–220, B β 193–461 и γ 135–427) остатки A α Met207, B β Met224, B β Pro235, B β Met305, B β Trp317, B β Met367, B β Met373, B β Trp418, B β Trp424 и γ Met264 были окислены. A α Met476, A α Pro511, A α Met517 и A α Met584, локализованные в α C-доме (392–610), и остатки A α Met240, A α Trp276 в α C-коннекторе (221–391) также являются мишенями для окислителя.

При обработке молекулы фибриногена 25 мкМ окислителя 10 аминокислотных остатков показали умеренную степень окисления (до 10%): A α Lys125, A α Lys129, A α Trp276, B β Met190, B β Met224, B β Trp317, B β Met373, B β Trp418, B β Trp424 и γ Met89. Среди них аминокислотные остатки в положениях A α Lys129, A α Trp276, B β Met190, B β Met224 и γ Met89 не подверглись существенному влиянию при обработке фибриногена 10 мкМ HOCl/OCl⁻ [212, 238].

Среди модифицированных аминокислотных остатков все остатки лизина и триптофана демонстрировали процент окисления менее 10% при обработке 25 мкМ HOCl/OCl⁻. Большинство модифицированных остатков метионина имели максимальную степень окислительных изменений в диапазоне от 12,1 до 47,0%, и только B β Met190, B β Met224, B β Met305, B β Met373 и γ Met89 составляли менее 10%. Модифицированные остатки пролина Pro511 и Pro235 показали высокий процент окислительной модификации (18,0 и 10% соответственно). Однако высокие степени окислительных изменений в контрольном образце (12,3 и 8,8%) делают дозозависимое увеличение окисления пролина менее значимым [212].

3.4. Обсуждение результатов

В данной работе был исследован эффект трех различных окислителей, озона, $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ и перекиси водорода на химическую модификацию структуры фибриногена.

Озон, принадлежащий к семейству АФК, можно рассматривать как удобный окислитель для моделирования окислительного стресса, возникающего *in vivo* [188, 225, 226]. Химия повреждения белков озоном считается во многих отношениях схожей с химией повреждения другими АФК [188, 227, 228]. Озон способен окислять большинство аминокислот в белке за исключением алифатических групп, в то время как генерируемые им высоко реакционноспособные и неселективные гидроксильные радикалы HO^\bullet , окисляют также и алифатические аминокислотные остатки.

Проведенная ранее оценка генерации озоном гидроксильных радикалов [188] указывает на относительное сходство концентраций оксидантов, используемых в наших модельных системах окисления фибриногена, и тех концентраций АФК, которые существуют в плазме крови в физиологических условиях [241].

$\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ является основной реактивной формой, образуемой миелопероксидазой (МПО) в физиологических условиях [237]. $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ образуется *in vivo* нейтрофилами при их активации по механизму, включающему МПО-опосредованную утилизацию H_2O_2 и Cl^- [242]. Концентрации $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ *in vivo* оцениваются в 12–250 мкМ [243]. Сообщается, что в местах воспаления количество МПО, генерируемое накопленными нейтрофилами, достигает концентрации 1–5 мМ [8]. Нейтрофилы, накапливающиеся в интерстициальной жидкости воспаленных тканей, продуцируют $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ в концентрациях до 25–50 мМ/ч [244]. Таким образом, предполагается, что уровни $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ *in vivo* могут достигать мМ концентраций [245]. Образующийся $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$, не накапливается до высоких концентраций, поскольку он быстро реагирует с различными биологическими молекулами [246].

Перекись водорода, H_2O_2 , представляет собой нерадикальную активную форму кислорода, являющуюся одним из основных членов семейства АФК. Перекись водорода вырабатывается большинством клеток человеческого организма. Вклад H_2O_2 , генерирующейся внутри клеток крови, в значение концентрации H_2O_2 в плазме незначителен по сравнению с вкладом в H_2O_2 плазмы от источников в самой плазме или ее генерации на внешней поверхности клеток [247]. Уровень плазменной H_2O_2 примерно в 100-5000 раз превышает её внутриклеточный уровень [247]. Помимо НАДФН-оксидаз плазматической мембраны фагоцитов, эндотелиальных клеток и тромбоцитов, которые вносят наибольший вклад в образование H_2O_2 в плазме [230, 248, 249], было подтверждено, что еще один фермент является важным источником. Ксантинооксидаза высвобождается из клеток, в первую очередь гепатоцитов, в кровотоке, где связывается с поверхностью эндотелиальных клеток. Хотя высвобождение ксантинооксидазы может быть вызвано высоким уровнем холестерина, существует базальная активность, которая способствует выработке H_2O_2 [250]. Данные о концентрации перекиси водорода в плазме крови весьма противоречивы. По данным большинства исследований [248], значения концентрации H_2O_2 в плазме могут находиться в диапазоне от нескольких мкМ до сотен мкМ, тогда как некоторые авторы [251] сообщают, что концентрация H_2O_2 в плазме человека может достигать ~ 100 мМ.

Данные масс-спектрометрии, полученные для модифицированного озоном фибриногена, свидетельствуют о том, что ряд пептидных фрагментов, ответственных за превращение фибриногена в фибрин, остается в нативной форме [206]. Действительно, при окислении молекул фибриногена их способность связываться с тромбином, по-видимому, либо полностью сохраняется, либо изменяется мало. Взаимодействие тромбина с областью E фибриногена происходит посредством связывания низкоаффинных участков с комплементарными участками экзосайта I тромбина [36].

Набор модификаций, выявленных с помощью масс-спектрометрии, показывает, что ни один из восьми основных остатков фибриногена,

участвующих в связывании тромбина, т. е., $\text{A}\alpha\text{Trp33}$, $\text{A}\alpha\text{Phe35}$, $\text{A}\alpha\text{Asp38}$, $\text{A}\alpha\text{Glu39}$, $\text{B}\beta68$, $\text{B}\beta\text{Asp69}$, γAsp27 и γSer30 не подвергся химическим изменениям при обработке образца 150 мкМ озона. Все эти остатки, за исключением γAsp27 и γSer30 , локализованы внутри так называемого ‘funnel-shaped’ домена [233]. Когда фибриноген был окислен 300 мкМ O_3 , данные масс-спектрометрии выявили лишь слабо окисляемый остаток Trp33 (<3%). Все остальные остатки, участвующие в связывании тромбина, не были поврежденными [206]. Помимо упомянутых выше восьми остатков, остатки $\text{A}\alpha\text{Ser37}$, $\text{A}\alpha\text{Asp40}$ и $\text{B}\beta\text{Asp71}$, относящиеся к ‘funnel-shaped’ домену, могут участвовать во взаимодействии с тромбином [36]. Эти остатки также не подверглись окислительной модификации.

Показано, что область $\text{B}\beta\text{Gly15–Val55}$ способна образовывать интерфейс между фибриногеном и тромбином, поскольку фибрин, лишенный остатков $\text{B}\beta\text{Gly15–Arg42}$, демонстрирует пониженное связывание тромбина [36, 252]. Однако точный вклад этой области во взаимодействие с тромбином еще остается не исследованным [36]. Как свидетельствуют данные ВЭЖХ-МС/МС, весь участок последовательности $\text{B}\beta\text{Gly15–Lys53}$ оказался доступным для анализа. Для фибриногена, обработанного 150 мкМ озоном, только два остатка $\text{B}\beta\text{His16}$ и $\text{B}\beta\text{Tyr41}$ претерпели химическую модификацию с чрезвычайно низкой степенью окисления, 1,8% и 2%, соответственно. При обработке фибриногена 300 мкМ озоном степень окисления этих остатков умеренно выросла, кроме того, был обнаружен дополнительный слабо окисленный остаток $\text{B}\beta\text{Arg42}$ (<3%) [206].

Таким образом, ключевые сайты связывания тромбина при окислении фибриногена остаются неповрежденными. Полученные нами масс-спектрометрические данные согласуются с экспериментальными данными по отщеплению тромбином фибринопептидов от окислительно-модифицированного фибриногена [253, 254]. Не было обнаружено никаких различий между фибриногеном, подвергнутым нитрованию, и контрольным белком в высвобождении фибринопептидов А или фибринопептидов В [254]. Кроме того, катализируемое тромбином высвобождение фибринопептидов было нормальным в фибриногене при воздействии на него ионизирующей радиации и лишь

незначительно уменьшалось в фибриногене, вовлекаемым в металл-зависимое окисление, что указывало на то, что ингибирование свертывания крови было связано с нарушением самосборки фибрина [253].

Важно отметить, что при умеренном окислении фибриногена озоном, его центральная область E не подвергалась окислительному повреждению (за исключением крайне низкой степени окисления остатков β His16 и β Tyr41).

Сохранение структурной целостности области E полностью подтверждается также, для окисления фибриногена, индуцированного как HOCl/OCl, так и H₂O₂ [209, 212, 238]. В этой области белка не было обнаружено ни одного модифицированного остатка (Рисунок 16).

Крайне важным для функционирования окисленного фибриногена является тот факт, что взаимодействия полимеризационных сайтов “knob A: hole a”, которые считаются основными для сборки фибрина [74], могут быть толерантными к окислению. В нашем исследовании трипептид “knob A”, α Gly17-Pro18-Arg19 оставался неокисленным во всех образцах фибриногена, обработанного озоном, HOCl/OCl и перекисью водорода [206, 209, 212].

Известно, что центр “hole a” включает три петли, γ Trp315–Trp331, γ Trp335–Asn365, γ Phe295–Thr305 [5]. При окислении озоном, HOCl/OCl и перекисью водорода не было выявлено ни одного окисленного аминокислотного остатка в петле γ Trp315–Trp331 [206, 209, 212], которая является одной из основных структурных детерминант полимеризационного сайта “hole a” [255]. Этот факт играет важную роль в сохранении полимеризационной активности молекулы фибриногена, так как петля γ Trp315–Trp331 и, в частности, жизненно важные остатки γ Gln329 и γ Asp330 участвуют в образовании связи “knob A : hole a” посредством взаимодействия с остатком α Arg17, локализованного в структуре “knob A” [255].

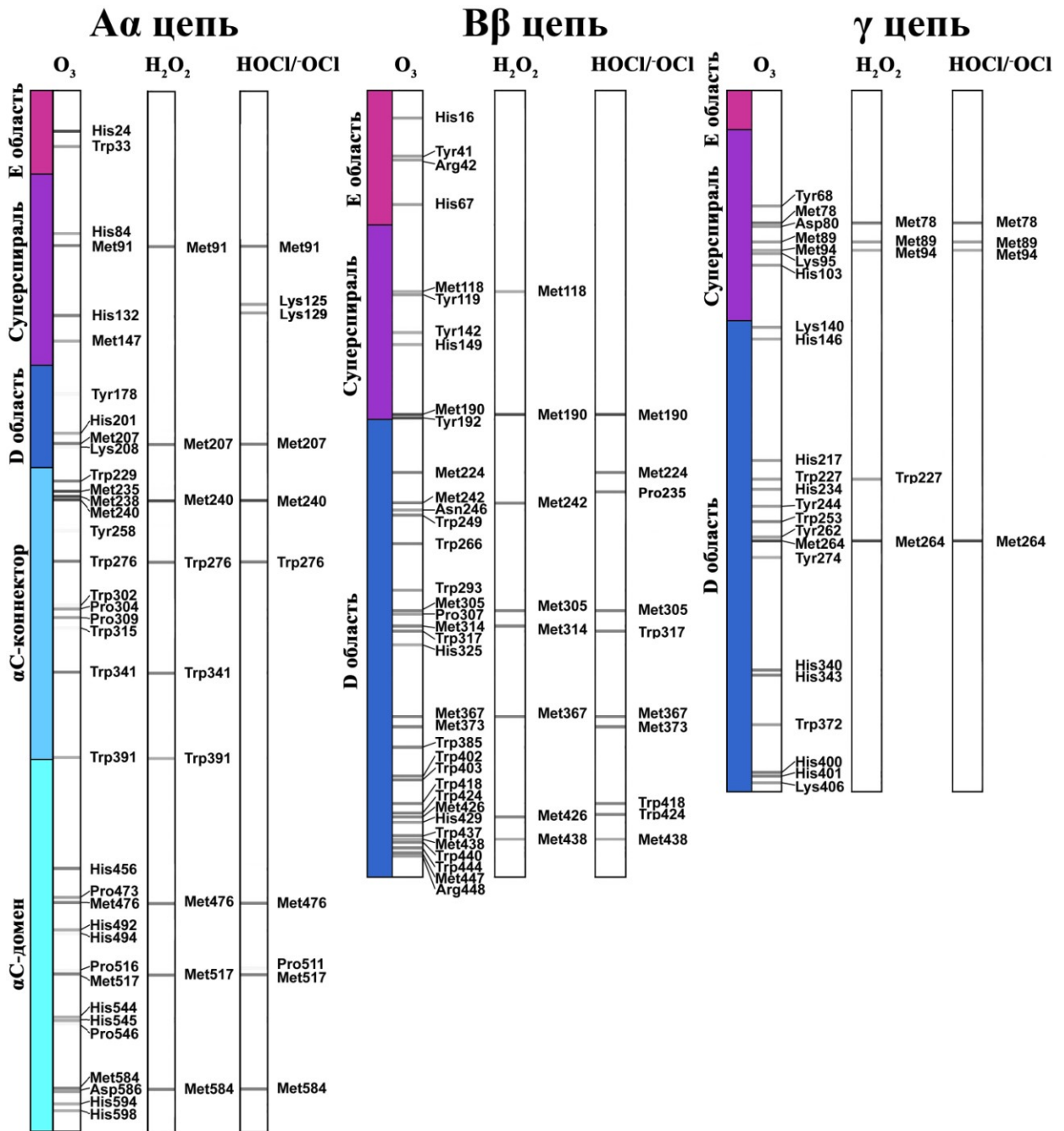


Рисунок 16 – Схематическое изображение полипептидных цепей фибриногена, окисленного O₃, H₂O₂ и HOCl/OCl⁻, с детектированными окислительными модификациями

По данным масс-спектрометрии, в петле γTrp335–Asn365, которая также важна для D-E-взаимодействий из-за образования контактов с остатками в структурах “кноб А” и суперспиралях [47], только два остатка при озон-индуцированном окислении, γHis340 и γHis343, подверглись модификациям (Рисунок 16). В петле γPhe295–Thr305 все остатки не имели окислительных модификаций при обработке белка различными окислителями. Было показано

[37], что полимеризация фибрина, обусловленная взаимодействиями «А»–«а», может быть нарушена заменой единственного остатка – γ Asp364. Этот ключевой остаток оказался незатронутым в условиях окисления. Сохранение высокоаффинного связывания “knob A: hole a” за счет сохранения структурной целостности основных сайтов связывания, составляющих “hole a”, хорошо согласуется с данными, полученными ранее методами упругого светорассеяния и ультрацентрифугирования [229]. Никаких признаков повреждающего действия окисления на процесс сборки двухцепочечных фибриновых протофибрилл, образующихся из обработанных озоном мономерных молекул дезА-фибрина, не было выявлено [229]. Все вышеизложенное свидетельствует о высокой резистентности полимеризационного сайта “hole a” к действию различных окислительных агентов.

Роль “knob B: hole b” взаимодействий в нормальном образовании фибрина в значительной степени является неопределенной. Предполагается, что они усиливают латеральную агрегацию протофибрилл [5]. Аминокислотные остатки, относящиеся к структуре “knob A” (β Gly15–Pro18), идентифицированные как в контрольном образце фибриногена, так и во всех окисленных образцах фибриногена оказались неокисленными [206, 209, 212].

Как известно, участки β Asp383– β Asp398, β Tyr404– β Gly434 и β Gln359– β Ile369, составляющие структуру “hole b”, участвуют в связывании “knob B” [255]. Оказалось, что при умеренном и сильном окислении фибриногена озоном масс-спектрометрический анализ выявил идентичный набор пептидов в структуре “hole b” (β Thr366– β Ile369, β Asp383– β Arg391, β Glu397– β Asp398 и β Tyr404– β Gly434). Остатки β Met367, β Trp385, β Trp418, β Trp424, β Met426, β His429, принадлежащие различным участкам связывания “hole b”, подверглись окислительной модификации, в то время как оставшаяся основная часть остатков сохраняла структурную целостность [206]. При обработке фибриногена HOCl^- или перекисью водорода единственным модифицированным остатком в структуре “hole b” оказался остаток β Met367 [238].

Тот факт, что остатки β Glu397, β Asp398 и β Asp432, которые, как полагают,

имеют ключевую роль в связывании центра “hole b” с комплементарным центром “knob B” [256], не вовлекаются в окислительную альтерацию, предполагает слабое влияние окисления на латеральную агрегацию протофибрилл посредством “knob B: hole b” взаимодействий.

Важную роль в продольном росте протофибрилл играют взаимодействия между контактирующими друг с другом областями соседних молекул мономерного фибрина. Интерфейс D:D состоит из остатков γ Arg275– γ Gly309 [24]. Известно, что остатки γ Arg275, γ Asn308 и γ Gly309, участвующие во взаимодействиях D:D, являются необходимыми для удлинения фибриновых нитей [44, 257]. Однако ни один из этих остатков не подвергался окислению во всех образцах фибриногена, обработанного различными окислителями. В свою очередь, [47] описали ряд других сайтов, ответственных за формирование межфазных контактов D:D, включая γ Ala241– γ Pro243 и γ Met264. В связи с этим, обнаруженное ранее [229] усиление взаимодействий между областями D фибриногена, обработанного озоном, вероятно, обусловлено как окислительными модификациями остатка γ Met264, непосредственно вовлеченного в контакты D:D, так и дополнительными окислительными модификациями остатков γ Tyr244 и γ Tyr274, расположенных в непосредственной близости от интерфейса D:D. В свою очередь, индуцированное HOCl/OCl^- или перекисью водорода окисление фибриногена не вызывало химической модификации остатков γ Tyr244 и γ Tyr274, делая окисленный γ Met264 единственным остатком, способным оказывать влияние на контакты D:D (Рисунок 16) [206, 209, 212].

Консолидированные данные, касающиеся латеральной агрегации протофибрилл, поддерживают точку зрения о том, что не только взаимодействия “knob B: hole b”, но и другие структуры, такие как области α C благодаря взаимодействиям между их N-концевыми субдоменами (фрагменты A α 392-503) [37], суперспираль [40], C-концевые участки γ -цепей (остатки γ Gln350–Pro360 и γ Ala370–Lys380), а также остатки β Thr330–Phe375, принадлежащие структуре так называемых β -модулей [17], могут участвовать в латеральном связывании протофибрилл.

Было показано, что для всех образцов в идентифицированных С-концевых участках γ цепей ни один из остатков не подвергался окислительным модификациям (если пренебречь крайне незначительным окислением остатка γ Trp372). В последовательности β Thr330–Phe375, остаток β Met367 был окислен всеми окислителями, в то время как β Met373 вовлекался в окисление только под действием озона [206]. Кроме того, результаты масс-спектрометрического анализа показали, что окисление приводит к химическим трансформациям многочисленных аминокислотных остатков, локализованных в суперспиральных структурах, α С доменах и α С-коннекторах, включая ряд остатков метионина.

Ранее было показано [191], что обработка фибриногена HOCl/OCl^- в физиологически значимых концентрациях окисляет преимущественно специфические остатки метионина, включая три остатка метионина, $\text{A}\alpha\text{Met476}$, $\text{V}\beta\text{Met367}$ и γMet78 . Среди всех различных модификаций, детектированных нами во всех образцах фибриногена, окисленного любым из трех окисляющих агентов, эти три остатка метионина также присутствовали. Метод масс-спектрометрии также был использован для распознавания сульфоксидов метионина в фибриногене плазмы крови пациентов с травмами и коагулопатией [198]. Семь различных окисленных метионинов были идентифицированы в этом исследовании, но только два остатка, $\text{V}\beta\text{Met314}$ и $\text{A}\alpha\text{Met476}$ демонстрировали слегка повышенную степень окисления у субъектов с коагулопатией по сравнению с контролем [198].

Важным фактором в ослаблении латеральной агрегации фибрилл рассматривается окисление остатка $\text{A}\alpha\text{Met476}$ [191], который оказался окисленным во всех исследованных нами образцах фибриногена. Предполагается, что окислительная модификация $\text{A}\alpha\text{Met476}$ опосредует ослабление латеральной агрегации протофибрилл фибрина за счет модификации ключевой структуры β -шпильки в α С-доменах [191, 198]. Однако исключительную важность ингибирования латеральной агрегации протофибрилл, приписываемую окислению вышеупомянутого остатка, не следует переоценивать по следующим соображениям. Склонность к окислению метионинов, встроенных в первичную

структуру белков, обычно напрямую связана с их пространственным расположением в белковой глобуле. Повышенная окислительная способность остатка $\text{A}\alpha\text{Met}476$ по сравнению с некоторыми другими остатками метионина в молекуле фибриногена (например, $\text{A}\alpha\text{Met}235$, $\text{B}\beta\text{Met}242$, $\gamma\text{Met}89$ и др.) является признаком его поверхностной локализации, делающий $\text{A}\alpha\text{Met}476$ доступной мишенью для АФК. Экспонированные на поверхности белковой глобулы остатки метионинов в белках являются доступной мишенью для молекул окислителей. Окисление таких метионинов, как постулируется [204, 240, 258], не влияет или влияет незначительно на биологическую активность белка, в то время как остатки метионинов, локализованные внутри белкового ядра, являются более устойчивыми к окислению и их окисление может вызывать функциональные нарушения белка [174, 259]. Предполагается, что структура αC -доменов в основном является неупорядоченной [17, 260]. Внутренне неупорядоченные белки и их домены очень склонны к окислению [197]. В связи с этим неудивительно, что $\text{A}\alpha\text{Met}476$, $\text{A}\alpha\text{Met}517$ и $\text{A}\alpha\text{Met}584$ представляют собой легко окисляемые остатки для всех видов выбранных окислителей.

Окислительные модификации других остатков в С-концевой части $\text{A}\alpha$ цепи, в частности остатков $\text{His}456$, $\text{His}492$ и $\text{His}494$ в αC -домене и αC -коннекторе, также могут быть ответственными за ослабление αC – αC -взаимодействий. Кроме того, нам удалось обнаружить большое количество аминокислотных остатков, локализованных в β -модулях и суперспиральных структурах (обе структуры влияют на латеральную агрегацию протофибрилл [5]). Многие из этих аминокислотных остатков подверглись окислительным модификациям (Рисунок 16). Следовательно, можно предположить, что существует, по крайней мере, несколько возможных механизмов ингибирования латеральной агрегации протофибрилл. Однако отсутствие прямых экспериментальных данных в настоящее время не позволяет утверждать, какой из перечисленных механизмов окисления может быть преобладающим.

Таким образом, сопоставление данных, полученных для окисления, индуцированного O_3 , HOCl/OCl^- и H_2O_2 , выявляет общие интересные

закономерности, заключающиеся в том, что 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 структурной целостности целого ряда аминокислотных остатков и пептидных фрагментов при окислении, 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. И, наконец, наряду с областью D, суперспиральные структуры, α C-домены и α C-коннекторы проявляли высокую чувствительность к окислителям, имеющее следствием химическое повреждение набора аминокислотных остатков [206, 209, 212].

Как показали результаты электрофореза, турбидиметрии, упругого светорассеяния и конфокальной микроскопии, окисление фибриногена вызывало ингибирование самосборки фибрина, снижение его мутности благодаря тому, что структура такого фибрина характеризуется более тонкими индивидуальными фибриллами, низкой пористостью и повышенной резистентностью к гидролизу плазмином по сравнению с фибрином, образованным из неокисленного фибриногена [212]. Все эти аномальные функциональные свойства фибриногена/фибрина, как упоминалось выше, обусловлены, главным образом, окислительным повреждением участков, ответственных за латеральную агрегацию молекулы фибриногена. В нашем исследовании были детектированы модификации значительного числа аминокислотных остатков, которые могли бы влиять на процесс агрегации протофибрилл. Однако, какие из этих модификаций вносят наибольший вклад в нарушение агрегации протофибрилл, остается предметом дальнейших исследований.

Таким образом, результаты исследований указывают на то, что выявленные нами окислительные повреждения в молекуле фибриногена, возникающие при окислении, вызываемыми различными окислителями, неотвратимо ведут к нарушению структуры и функциональности окисленного белка, а также аномальной структуры фибриновой сети, полученной из окисленных молекул

фибриногена. В этой связи возникает крайне важный вопрос: способен ли фибриноген противостоять окислительному стрессу без потери своей биологической активности, и какой возможный механизм такой предполагаемой окислительной резистентности? Чтобы выяснить это, нами были проведены исследования по окислению белка очень низкими и умеренно низкими дозами $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$, 10 и 25 мкМ, соответственно [212].

Как свидетельствовали результаты измерения скорости самосборки фибрина и его гидролиза плазмином, интенсивности упругого светорассеяния гелей фибрина, морфологии образцов фибрина и динамики распределения при лизисе сгустка плазмينا(огена) визуализированного с помощью метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, никаких достоверных различий между образцами фибрина, образованного из неокисленного фибриногена и окисленного 10 мкМ $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ не наблюдалось. В свою очередь, это свидетельствует о том, что окислительные модификации в белке не оказывают эффекта на функциональность фибриногена. В противоположность этому, окисление фибриногена 25 мкМ $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ сопровождалось функциональным повреждением фибриногена, коррелирующим с результатами, детально описанными в разделе Результаты.

Данные ВЭЖХ-МС/МС показывают, что идентифицированные метионины ($\text{A}\alpha\text{Met}91$, $\text{A}\alpha\text{Met}207$, $\text{A}\alpha\text{Met}240$, $\text{A}\alpha\text{Met}476$, $\text{A}\alpha\text{Met}517$, $\text{A}\alpha\text{Met}584$, $\text{V}\beta\text{Met}190$, $\text{V}\beta\text{Met}224$, $\text{V}\beta\text{Met}305$, $\text{V}\beta\text{Met}367$, $\text{V}\beta\text{Met}373$, $\gamma\text{Met}89$, $\text{Met}91$ и $\text{Met}264$) были преобладающей мишенью для окислителя. Среди обнаруженных окислительных модификаций в фибриногене, обработанным 10 мкМ $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$, остатки $\text{A}\alpha\text{Met}476$, $\text{A}\alpha\text{Met}517$, $\text{A}\alpha\text{Met}584$, $\text{V}\beta\text{Met}367$, $\gamma\text{Met}264$ и $\gamma\text{Met}94$ были значительно модифицированы по сравнению с таковыми у нативного белка [212]. 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 $A\alpha$ Met476, $A\alpha$ Met517, $A\alpha$ Met584, $B\beta$ Met367, Met264 и γ Met94 (Рисунок 17), 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 [197].

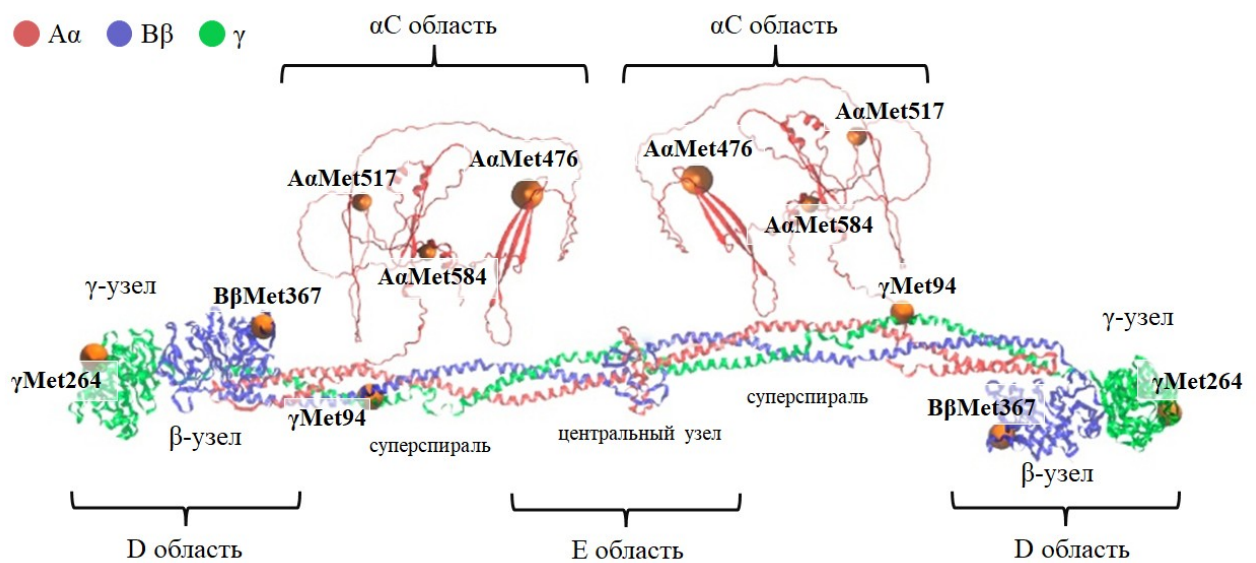


Рисунок 17 – 3D-структура молекулы фибриногена с отмеченными остатками метионинов – перехватчиков АФК. Для создания рисунка использована модель кристаллической структуры фибриногена PDB:3GHG и спрогнозированная AlphaFold структура α C-области P02671-F1

Сравнение модифицированных аминокислотных остатков, полученных в результате окисления фибриногена 10 или 25 мкМ $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$, выявило интересную особенность. В обоих случаях, как видно из данных Таблицы 3, сайты модификации различаются преимущественно уровнем окисления. Из выявленных 22 сайтов, 11 остатков метионина, 1 лизин, 3 триптофана и 2 пролина были общими в обоих индуцированно-окисленных образцах фибриногена. Только три дополнительных модифицированных метионина ($B\beta$ Met190, $B\beta$ Met224, γ Met89), $A\alpha$ Lys129 и $A\alpha$ Trp276 были обнаружены в фибриногене, окисленного 25 мкМ $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$. Функциональная роль этих остатков в альтернативной самосборке фибриновой сети остается пока неясной.

Большинство модифицированных остатков метионина имели максимальную степень окисления в диапазоне от 12, 0 до 47,0%, и только ВβMet190, ВβMet224, ВβMet305, ВβMet373 и γMet89 составляли менее 10%, что свидетельствует об их труднодоступном положении в структуре фибриногена [212].

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 [174, 204, 240, 258, 261, 262]. Поэтому поиск антиоксидантных метионинов в белках, очевидно, необходим для лучшего понимания механизма их функционирования в условиях окислительного стресса. Антиоксидантные метионины были обнаружены в ряде белков плазмы, таких как альбумин [7, 263, 264], α2-макроглобулин [265], антитромбин [266], плазминоген [267] и коагуляционный фактор XIII [268], а также некоторых других [204].

Что касается фибриногена, то на сегодняшний день остается неизвестной функция целого ряда остатков метионина, расположенных в различных структурных участках молекулы фибриногена. Однако обнаруженные в настоящем исследовании антиоксидантные метионины, АαMet476, АαMet517, АαMet584, ВβMet367, γMet264 и γMet94 позволяют лучше понять природу сохранения функциональности фибриногена в кровотоке в условиях развития окислительного стресса [212].

Благодаря полной обратимости процесса превращения MetO в исходную структуру Met во внутриклеточных белках, катализируемого метионин сульфоксид редуктазами (MSRs), предполагается, что Met-связанный антиоксидантный ресурс белков обусловлен активностью редуктаз, скорее, чем количеством антиоксидантных Met [204]. Из-за отсутствия MSRs в плазме крови [175] окисление Met во внеклеточных белках является фактически необратимым. Более того, поскольку в структуре фибриногена нет свободных остатков цистеина, окислительное повреждение фибриногена носит полностью необратимый характер. Таким образом, превращение фибриноген-связанных

метионинов, наделенных антиоксидантной активностью, в сульфоксид метионина (выявленное в настоящем исследовании) становится основным, если не единственным, эффективным механизмом, способным защитить структуру белка от повреждения при окислительной атаке.

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 [2, 3]. 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 [151]. 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 [7, 8].

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 [4, 5]. 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, α C-домены и α 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 [206, 209, 238].

Данные ВЭЖХ-МС/МС показывают, что аминокислотные остатки метионина ($\text{A}\alpha\text{Met}91$, $\text{A}\alpha\text{Met}207$, $\text{A}\alpha\text{Met}240$, $\text{A}\alpha\text{Met}476$, $\text{A}\alpha\text{Met}517$, $\text{A}\alpha\text{Met}584$, $\text{B}\beta\text{Met}190$, $\text{B}\beta\text{Met}224$, $\text{B}\beta\text{Met}305$, $\text{B}\beta\text{Met}367$, $\text{B}\beta\text{Met}373$, $\gamma\text{Met}89$, $\gamma\text{Met}91$ и $\gamma\text{Met}264$) были преобладающей мишенью для окислителя. Окисление остатков $\text{A}\alpha\text{Met}476$, $\text{A}\alpha\text{Met}517$, $\text{A}\alpha\text{Met}584$, $\text{B}\beta\text{Met}367$, $\gamma\text{Met}264$ и $\gamma\text{Met}94$ 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 [212].

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 γ и α полипептидных цепей окисленного фибрина образовывать в присутствии FXIIIa γ -димеры и α - α 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 α 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 γ -димеры и α - α полимеры снижается. Чувствительность окисленного фибриногена к плазминовому гидролизу возрастает. Окисление фибриногена 10 мкМ HOCl/OCl^- не оказывает влияния на функциональную активность белка.

4. Высокое содержание легко окисляемых аминокислотных остатков в составе α 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 ($\text{A}\alpha\text{Met}476$, $\text{A}\alpha\text{Met}517$, $\text{A}\alpha\text{Met}584$, $\text{B}\beta\text{Met}367$, $\gamma\text{Met}264$ и $\gamma\text{Met}94$), 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

FrA – фибринопептид А

FrB – фибринопептид В

FXIII – коагуляционный фактор XIII

GSH – глутатион

HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

MSRs – метионин сульфоксид редуктазы

АФК – активные формы кислорода

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с тандемной масс-спектрометрией

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДСН – додецилсульфат натрия

КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

ММП-2 – матриксная металлопротеиназа 2

МПО –миелопероксидаза

ПААГ – полиакриламидный гель

ПТМ – посттрансляционные модификации

УСР – упругое светорассеяние

ФИТЦ – флуоресцеин изотиоционат

ЦНС – центральная нервная система

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Davies, M. J. Protein oxidation and peroxidation / M. J. Davies // *Biochemical Journal*. – 2016. – Vol. 473. – № 7. – P. 805-825.
2. Hawkins, C. L. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins / C. L. Hawkins, D. I. Pattison, M. J. Davies // *Amino Acids*. – 2003. – Vol. 25. – № 3-4. – P. 259-274.
3. Stadtman, E. R. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins / E. R. Stadtman, R. L. Levine // *Amino Acids*. – 2003. – Vol. 25. – № 3-4. – P. 207-218.
4. Kattula, S. Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis / S. Kattula, J. R. Byrnes, A. S. Wolberg. – Text: electronic // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2017. – Vol. 37. – № 3. – URL: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.117.308564> (date accessed: 18.03.2024).
5. Weisel, J. W. Fibrin Formation, Structure and Properties / J. W. Weisel, R. I. Litvinov. – Text: electronic // *Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms: Subcellular Biochemistry* / ред. D. A. D. Parry, J. M. Squire. – Cham: Springer International Publishing, 2017. – Vol. 82. – P. 405-456. – URL: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-49674-0_13 (дата обращения: 10.01.2023).
6. Shacter, E. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: Examination by western blot immunoassay / E. Shacter, J. A. Williams, M. Lim, R. L. Levine // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1994. – Vol. 17. — № 5. – P. 429-437.
7. Bruschi, M. Oxidized albumin. The long way of a protein of uncertain function / M. Bruschi, G. Candiano, L. Santucci, G. M. Ghiggeri // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 2013. – Vol. 1830. – № 12. – P. 5473-5479.
8. Hampton, M. B. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing / M. B. Hampton, A. J. Kettle, C. C. Winterbourn

// Blood. – 1998. – T. 92. – № 9. – C. 3007-3017.

9. Adams, R. Fibrinogen Signal Transduction as a Mediator and Therapeutic Target in Inflammation: Lessons from Multiple Sclerosis / R. Adams, C. Schachtrup, D. Davalos [et al.] // Current Medicinal Chemistry. – 2007. – Vol. 14. – № 27. – P. 2925-2936.

10. Blombäck, B. Fibrinogen and fibrin-proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis / B. Blombäck // Thrombosis Research. – 1996. – Vol. 83. – № 1. – P. 1-75.

11. Chung, D. W. Gamma and gamma' chains of human fibrinogen are produced by alternative mRNA processing / D. W. Chung, E. W. Davie // Biochemistry. – 1984. – Vol. 23. – № 18. – P. 4232-4236.

12. Wolfenstein-Todel, C. Carboxy-terminal amino acid sequence of a human fibrinogen gamma-chain variant (gamma') / C. Wolfenstein-Todel, M. W. Mosesson // Biochemistry. – 1981. – Vol. 20. – № 21. – P. 6146-6149.

13. Meh, The D. A. amino acid sequence in fibrin responsible for high affinity thrombin binding / D. A. Meh, K. R. Siebenlist, S. O. Brennan [et al.] // Thrombosis and Haemostasis. – 2001. – Vol. 85. – № 3. – P. 470-474.

14. Mosesson, M. W. Human fibrinogen heterogeneities. 3. Identification of chain variants / M. W. Mosesson, J. S. Finlayson, R. A. Umfleet // The Journal of Biological Chemistry. – 1972. – Vol. 247. – № 16. – P. 5223-5227.

15. Burton, R. A. Identification of an Ordered Compact Structure within the Recombinant Bovine Fibrinogen α C-Domain Fragment by NMR / R. A. Burton, G. Tsurupa, L. Medved, N. Tjandra // Biochemistry. – 2006. – Vol. 45. – № 7. – P. 2257-2266.

16. Burton, R. A. NMR Solution Structure, Stability, and Interaction of the Recombinant Bovine Fibrinogen α C-Domain Fragment / R. A. Burton, G. Tsurupa, R. R. Hantgan [et al.] // Biochemistry. – 2007. – Vol. 46. – № 29. – P. 8550-8560.

17. Tsurupa, G. Structure, Stability, and Interaction of the Fibrin(ogen) α C-Domains / G. Tsurupa, R. R. Hantgan, R. A. Burton [et al.] // Biochemistry. – 2009. – Vol. 48. – № 51. – P. 12191-12201.

18. Medved, L. Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin / L. Medved, J. W. Weisel // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2009. – Vol. 7. – № 2. – P. 355-359.
19. Zuev, Y. F. Conformational Flexibility and Self-Association of Fibrinogen in Concentrated Solutions / Y. F. Zuev, R. I. Litvinov, A. E. Sitnitsky [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2017. – Vol. 121. – № 33. – P. 7833-7843.
20. Spraggon, G. Crystal structures of fragment D from human fibrinogen and its crosslinked counterpart from fibrin / G. Spraggon, S. J. Everse, R. F. Doolittle // *Nature*. – 1997. – Vol. 389. – № 6650. – P. 455-462.
21. Madrazo, J. Crystal structure of the central region of bovine fibrinogen (E5 fragment) at 1.4-Å resolution / J. Madrazo, J. H. Brown, S. Litvinovich [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2001. – Vol. 98. – № 21. – P. 11967-11972.
22. Brown, J. H. The crystal structure of modified bovine fibrinogen / J. H. Brown, N. Volkmann, G. Jun [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2000. – Vol. 97. – № 1. – P. 85-90.
23. Yang, Z. Crystal Structure of Native Chicken Fibrinogen at 2.7 Å Resolution / J. M. Kollman, L. Pandi, R. F. Doolittle // *Biochemistry*. – 2001. – Vol. 40. – № 42. – P. 12515-12523.
24. Everse, S. J. Crystal Structure of Fragment Double-D from Human Fibrin with Two Different Bound Ligands / S. J. Everse, G. Spraggon, L. Veerapandian [et al.] // *Biochemistry*. – 1998. – Vol. 37. – № 24. – P. 8637-8642.
25. Kostelansky, M. S. 2.8 Å Crystal Structures of Recombinant Fibrinogen Fragment D with and without Two Peptide Ligands: GHRP Binding to the “b” Site Disrupts Its Nearby Calcium-binding Site / M. S. Kostelansky, L. Betts, O. V. Gorkun, S. T. Lord // *Biochemistry*. – 2002. – Vol. 41. – № 40. – P. 12124-12132.
26. Kostelansky, M. S. Calcium-Binding Site β 2, Adjacent to the “b” Polymerization Site, Modulates Lateral Aggregation of Protofibrils during Fibrin Polymerization / M. S. Kostelansky, K. C. Lounes, L. F. Ping [et al.] // *Biochemistry*. – 2004. – Vol. 43. – № 9. – P. 2475-2483.

27. Kostelansky, M. S. Probing the γ 2 Calcium-Binding Site: Studies with γ D298,301A Fibrinogen Reveal Changes in the γ 294-301 Loop that Alter the Integrity of the “a” Polymerization Site / M. S. Kostelansky, K. C. Lounes, L. F. Ping [et al.] // *Biochemistry*. – 2007. – Vol. 46. – № 17. – P. 5114-5123.
28. Soman, P. Measuring the Time-Dependent Functional Activity of Adsorbed Fibrinogen by Atomic Force Microscopy / P. Soman, Z. Rice, C. A. Siedlecki // *Langmuir*. – 2008. – Vol. 24. – № 16. – P. 8801-8806.
29. Yermolenko, I. S. High-Resolution Visualization of Fibrinogen Molecules and Fibrin Fibers with Atomic Force Microscopy / I. S. Yermolenko, V. K. Lishko, T. P. Ugarova, S. N. Magonov // *Biomacromolecules*. – 2011. – Vol. 12. – № 2. – P. 370-379.
30. Protopopova, A. D. Visualization of fibrinogen α C regions and their arrangement during fibrin network formation by high-resolution AFM / A. D. Protopopova, N. A. Barinov, E. G. Zavyalova [et al.] // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2015. – Vol. 13. – № 4. – P. 570-579.
31. Doolittle, R. F. Designation of sequences involved in the “coiled-coil” interdomainal connections in fibrinogen: Construction of an atomic scale model / R. F. Doolittle, D. M. Goldbaum, L. R. Doolittle // *Journal of Molecular Biology*. – 1978. – Vol. 120. – № 2. – P. 311-325.
32. Kollman, J. M. Crystal Structure of Human Fibrinogen / J. M. Kollman, L. Pandi, M. R. Sawaya [et al.] // *Biochemistry*. – 2009. – Vol. 48. – № 18. – P. 3877-3886.
33. Köhler, S. The Internal Dynamics of Fibrinogen and Its Implications for Coagulation and Adsorption / S. Köhler, F. Schmid, G. Settanni // *PLOS Computational Biology*. – 2015. – Vol. 11. – № 9. – P. e1004346.
34. Fenton, J. W. Anion-binding exosite of human alpha-thrombin and fibrin(ogen) recognition / J. W. Fenton, T. A. Olson, M. P. Zabranski, G. D. Wilner // *Biochemistry*. – 1988. – Vol. 27. – № 18. – P. 7106-7112.
35. Stubbs, M. T. A player of many parts: The spotlight falls on thrombin’s structure / M. T. Stubbs, W. Bode // *Thrombosis Research*. – 1993. – Vol. 69. – A

player of many parts. – № 1. – P. 1-58.

36. Meh, D. A. Identification and Characterization of the Thrombin Binding Sites on Fibrin / D. A. Meh, K. R. Siebenlist, M. W. Mosesson // *Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – Vol. 271. – № 38. – P. 23121-23125.

37. Okumura, N. Severely Impaired Polymerization of Recombinant Fibrinogen γ -364 Asp \rightarrow His, the Substitution Discovered in a Heterozygous Individual / N. Okumura, O. V. Gorkun, S. T. Lord // *Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 272. – № 47. – P. 29596-29601.

38. Weisel, J. W. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications / J. W. Weisel, R. I. Litvinov // *Blood*. – 2013. – Vol. 121. – № 10. – P. 1712-1719.

39. Litvinov, R. I. Polymerization of fibrin: direct observation and quantification of individual B:b knob-hole interactions / R. I. Litvinov, O. V. Gorkun, D. K. Galanakis [et al.] // *Blood*. – 2007. – Vol. 109. – № 1. – P. 130-138.

40. Yang, Z. A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides / Z. Yang, I. Mochalkin, R. F. Doolittle // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2000. – Vol. 97. – № 26. – P. 14156-14161.

41. Okumura, N. A novel variant fibrinogen, deletion of B β 111Ser in coiled-coil region, affecting fibrin lateral aggregation / N. Okumura, F. Terasawa, M. Hirota-Kawadobora [et al.] // *Clinica Chimica Acta*. – 2006. – Vol. 365. – № 1-2. – P. 160-167.

42. Langer, B. G. Deglycosylation of fibrinogen accelerates polymerization and increases lateral aggregation of fibrin fibers / B. G. Langer, J. W. Weisel, P. A. Dinauer [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1988. – Vol. 263. – № 29. – P. 15056-15063.

43. Fibrinogen Hillsborough: a novel γ Gly309Asp dysfibrinogen with impaired clotting / J. L. Mullin, S. O. Brennan, P. S. Ganly, P. M. George // *Blood*. – 2002. – Vol. 99. – № 10. – P. 3597-3601.

44. Marchi, R. C. Functional characterization of fibrinogen Bicêtre II: a γ 308 Asn \rightarrow Lys mutation located near the fibrin D:D interaction sites / R. C. Marchi,

Z. Carvajal, C. Boyer-Neumann [et al.] // *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. – 2006. – Vol. 17. – № 3. – P. 193-201.

45. Bowley, S. R. Impaired Protofibril Formation in Fibrinogen γ N308K Is Due to Altered D:D and “A:a” Interactions / S. R. Bowley, N. Okumura, S. T. Lord // *Biochemistry*. – 2009. – Vol. 48. – № 36. – P. 8656-8663.

46. Rosenfeld, M. A. Covalent structure of single-stranded fibrin oligomers cross-linked by FXIIIa / M. A. Rosenfeld, V. B. Leonova, A. N. Shchegolikhin [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2015. – Vol. 461. – № 2. – P. 408-412.

47. Zhmurov, A. Structural Basis of Interfacial Flexibility in Fibrin Oligomers / A. Zhmurov, A. D. Protopopova, R. I. Litvinov [et al.] // *Structure*. – 2016. – Vol. 24. – № 11. – P. 1907-1917.

48. Rocco, M. A Comprehensive Mechanism of Fibrin Network Formation Involving Early Branching and Delayed Single- to Double-Strand Transition from Coupled Time-Resolved X-ray/Light-Scattering Detection / M. Rocco, M. Molteni, M. Ponassi [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2014. – Vol. 136. – № 14. – P. 5376-5384.

49. Litvinov, R. I. Direct Evidence for Specific Interactions of the Fibrinogen α C-Domains with the Central E Region and with Each Other / R. I. Litvinov, S. Yakovlev, G. Tsurupa [et al.] // *Biochemistry*. – 2007. – Vol. 46. – № 31. – P. 9133-9142.

50. Weisel, J. W. The Structure and Function of the α C Domains of Fibrinogen / J. W. Weisel, L. Medved // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2001. – Vol. 936. – № 1. – P. 312-327.

51. Tsurupa, G. On the Mechanism of α C Polymer Formation in Fibrin / G. Tsurupa, I. Pechik, R. I. Litvinov [et al.] // *Biochemistry*. – 2012. – Vol. 51. – № 12. – P. 2526-2538.

52. Structure, Stability, and Interaction of Fibrin α C-Domain Polymers / G. Tsurupa, A. Mahid, Y. Veklich [et al.] // *Biochemistry*. – 2011. – Vol. 50. – № 37. – P. 8028-8037.

53. Tsurupa, G. The α C domains of fibrinogen affect the structure of the fibrin clot, its physical properties, and its susceptibility to fibrinolysis / J.-P. Collet, J. L. Moen, Y. I. Veklich [et al.] // *Blood*. – 2005. – Vol. 106. – № 12. – P. 3824-3830.

54. Mosesson, M. W. Evidence for a second type of fibril branch point in fibrin polymer networks, the trimolecular junction / M. W. Mosesson, J. P. DiOrio, K. R. Siebenlist [et al.] // *Blood*. – 1993. – T. 82. – № 5. – C. 1517-1521.

55. Fogelson, A. L. Toward an understanding of fibrin branching structure / A. L. Fogelson, J. P. Keener // *Physical Review E*. – 2010. – Vol. 81. – № 5. – P. 051922.

56. Mosesson, M. W. Fibrinogen and fibrin structure and functions / M. W. Mosesson // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2005. – Vol. 3. – № 8. – P. 1894-1904.

57. Siebenlist, K. R. Plasma Factor XIII Binds Specifically to Fibrinogen Molecules Containing γ' Chains / K. R. Siebenlist, D. A. Meh, M. W. Mosesson // *Biochemistry*. – 1996. – Vol. 35. – № 32. – P. 10448-10453.

58. Schroeder, V. Factor XIII: Structure and Function / V. Schroeder, H. Kohler // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. – 2016. – Vol. 42. – № 4. – P. 422-428.

59. Weisel, J. W. Cross-linked γ -chains in fibrin fibrils bridge transversely between strands: no / J. W. Weisel // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2004. – Vol. 2. – № 3. – P. 394-399.

60. Mosesson, M. W. The fibrin cross-linking debate: cross-linked γ -chains in fibrin fibrils bridge 'transversely' between strands: yes / M. W. Mosesson // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2004. – Vol. 2. – № 3. – P. 388-393.

61. Standeven, K. F. Functional analysis of fibrin γ -chain cross-linking by activated factor XIII: determination of a cross-linking pattern that maximizes clot stiffness / K. F. Standeven, A. M. Carter, P. J. Grant [et al.] // *Blood*. – 2007. – Vol. 110. – № 3. – P. 902-907.

62. Doolittle, R. F. Fibrinogen and Fibrin / R. F. Doolittle. – Text : electronic // *Encyclopedia of Life Sciences*. – Wiley, 2010. – URL:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0001409.pub2> (date accessed: 20.02.2024).

63. Weisel, J. W. Determination of the topology of factor XIIIa-induced fibrin gamma-chain cross-links by electron microscopy of ligated fragments. / J. W. Weisel, C. W. Francis, C. Nagaswami, V. J. Marder // *Journal of Biological Chemistry*. – 1993. – Vol. 268. – № 35. – P. 26618-26624.

64. Veklich, Y. The complementary aggregation sites of fibrin investigated through examination of polymers of fibrinogen with fragment E / Y. Veklich, E. K. Ang, L. Lorand, J. W. Weisel // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – Vol. 95. – № 4. – P. 1438-1442.

65. Doolittle, R. F. X-ray crystallographic studies on fibrinogen and fibrin / R. F. Doolittle // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2003. – Vol. 1. – № 7. – P. 1559-1565.

66. Selmayr, E. Chromatography and electron microscopy of cross-linked fibrin polymers—a new model describing the cross-linking at the DD-*trans* contact of the fibrin molecules / E. Selmayr, M. Deffner, L. Bachmann, G. Müller-Berghaus // *Biopolymers*. – 1988. – Vol. 27. – № 11. – P. 1733-1748.

67. Siebenlist, K. R. Position of γ -Chain Carboxy-Terminal Regions in Fibrinogen/Fibrin Cross-Linking Mixtures / K. R. Siebenlist, D. A. Meh, M. W. Mosesson // *Biochemistry*. – 2000. – Vol. 39. – № 46. – P. 14171-14175.

68. Mosesson, M. W. The Structure and Biological Features of Fibrinogen and Fibrin / M. W. Mosesson, K. R. Siebenlist, D. A. Meh // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2001. – Vol. 936. – № 1. – P. 11-30.

69. Ichinose, A. Reversible cross-linking of α 2-plasmin inhibitor to fibrinogen by fibrin-stabilizing factor / A. Ichinose, N. Aoki // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. – 1982. – Vol. 706. – № 2. – P. 158-164.

70. Tamaki, T. Cross-linking of α 2-plasmin inhibitor and fibronectin to fibrin by fibrin-stabilizing factor / T. Tamaki, N. Aoki // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*. – 1981. – Vol. 661. – № 2. – P. 280-286.

71. Kimura, S. Cross-linking site in fibrinogen for alpha 2-plasmin inhibitor / S. Kimura, N. Aoki // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1986. – Vol. 261. – № 33. – P. 15591-15595.
72. Sakata, Y. Significance of Cross-Linking of α 2-Plasmin Inhibitor to Fibrin in Inhibition of Fibrinolysis and in Hemostasis / Y. Sakata, N. Aoki // *Journal of Clinical Investigation*. – 1982. – Vol. 69. – № 3. – P. 536-542.
73. Ritchie, H. Cross-linking of Plasminogen Activator Inhibitor 2 and α 2-Antiplasmin to Fibrin(ogen) / H. Ritchie, L. C. Lawrie, P. W. Crombie [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 275. – № 32. – P. 24915-24920.
74. Lord, S. T. Fibrinogen and fibrin: scaffold proteins in hemostasis: / S. T. Lord // *Current Opinion in Hematology*. – 2007. – Vol. 14. – № 3. – P. 236-241.
75. Odrlic, T. M. Thrombin cleavage enhances exposure of a heparin binding domain in the N-terminus of the fibrin beta chain / T. M. Odrlic, J. R. Shainoff, S. O. Lawrence, P. J. Simpson-Haidaris // *Blood*. – 1996. – Vol. 88. – № 6. – P. 2050-2061.
76. Odrlic, T. M. Heparin-Binding Domain of Fibrin Mediates Its Binding to Endothelial Cells / T. M. Odrlic, C. W. Francis, L. A. Sporn [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 1996. – Vol. 16. – № 12. – P. 1544-1551.
77. Yakovlev, S. Interaction of Fibrin(ogen) with Heparin: Further Characterization and Localization of the Heparin-Binding Site / S. Yakovlev, S. Gorlatov, K. Ingham, L. Medved // *Biochemistry*. – 2003. – Vol. 42. – № 25. – P. 7709-7716.
78. E. Makogonenko, E. Interaction of Fibrin(ogen) with Fibronectin: Further Characterization and Localization of the Fibronectin-Binding Site / E. Makogonenko, G. Tsurupa, K. Ingham, L. Medved // *Biochemistry*. – 2002. – Vol. 41. – № 25. – P. 7907-7913.
79. Makogonenko, E. Interaction of the Fibronectin COOH-Terminal Fib-2 Regions with Fibrin: Further Characterization and Localization of the Fib-2-Binding Sites / E. Makogonenko, K. C. Ingham, L. Medved // *Biochemistry*. – 2007. – Vol. 46. – № 18. – P. 5418-5426.

80. Tuszynski, G. P. The interaction of human platelet thrombospondin with fibrinogen. Thrombospondin purification and specificity of interaction / G. P. Tuszynski, S. Srivastava, H. I. Switalska [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1985. – Vol. 260. – № 22. – P. 12240-12245.

81. Bacon-Baguley, T. Thrombospondin binding to specific sequences within the A alpha- and B beta-chains of fibrinogen / T. Bacon-Baguley, M. L. Ogilvie, T. K. Gartner, D. A. Walz // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1990. – Vol. 265. – № 4. – P. 2317-2323.

82. Marchi, R. Biophysical characterization of fibrinogen Caracas I with an A α -chain truncation at A α -466 Ser: identification of the mutation and biophysical characterization of properties of clots from plasma and purified fibrinogen / R. Marchi, M. Meyer, N. De Bosch [et al.] // *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. – 2004. – Vol. 15. – № 4. – P. 285-293.

83. Barczyk, M. Integrins / M. Barczyk, S. Carracedo, D. Gullberg // *Cell and Tissue Research*. – 2010. – Vol. 339. – № 1. – P. 269-280.

84. Bach, T. L. Endothelial Cell VE-cadherin Functions as a Receptor for the β 15–42 Sequence of Fibrin / T. L. Bach, C. Barsigian, C. H. Yaen, J. Martinez // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – Vol. 273. – № 46. – P. 30719-30728.

85. Languino, L. R. Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway / L. R. Languino, J. Plescia, A. Duperray [et al.] // *Cell*. – 1993. – Vol. 73. – № 7. – P. 1423-1434.

86. Altieri, D. C. Structural Recognition of a Novel Fibrinogen γ Chain Sequence (117–133) by Intercellular Adhesion Molecule-1 Mediates Leukocyte-Endothelium Interaction / D. C. Altieri, A. Duperray, J. Plescia [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – Vol. 270. – № 2. – P. 696-699.

87. Macrae, F. L. A fibrin biofilm covers blood clots and protects from microbial invasion / F. L. Macrae, C. Duval, P. Papareddy [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 2018. – Vol. 128. – № 8. – P. 3356-3368.

88. Ko, Y.-P. Fibrinogen Is at the Interface of Host Defense and Pathogen Virulence in *Staphylococcus aureus* Infection / Y.-P. Ko, M. Flick // *Seminars in*

Thrombosis and Hemostasis. – 2016. – Vol. 42. – № 04. – P. 408-421.

89. Tennent, G. A. Human plasma fibrinogen is synthesized in the liver / G. A. Tennent, S. O. Brennan, A. J. Stangou [et al.] // *Blood*. – 2007. – Vol. 109. – № 5. – P. 1971-1974.

90. Adams, R. A. Fibrin mechanisms and functions in nervous system pathology / R. A. Adams, M. Passino, B. D. Sachs [et al.] // *Molecular Interventions*. – 2004. – Vol. 4. – № 3. – P. 163-176.

91. Phillips, D. R. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex / D. R. Phillips, I. F. Charo, L. V. Parise, L. A. Fitzgerald // *Blood*. – 1988. – Vol. 71. – № 4. – P. 831-843.

92. Farrell, D. H. Binding of recombinant fibrinogen mutants to platelets / D. H. Farrell, P. Thiagarajan // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1994. – Vol. 269. – № 1. – P. 226-231.

93. Holmbäck, K. Impaired platelet aggregation and sustained bleeding in mice lacking the fibrinogen motif bound by integrin alpha IIb beta 3 / K. Holmbäck, M. J. Danton, T. T. Suh [et al] // *The EMBO journal*. – 1996. – Vol. 15. – № 21. – P. 5760-5771.

94. Rooney, M. M. Dissecting Clot Retraction and Platelet Aggregation / M. M. Rooney, L. V. Parise, S. T. Lord // *Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – Vol. 271. – № 15. – P. 8553-8555.

95. Bugge, T. H. Loss of Fibrinogen Rescues Mice from the Pleiotropic Effects of Plasminogen Deficiency / T. H. Bugge, K. W. Kombrinck, M. J. Flick [et al.] // *Cell*. – 1996. – Vol. 87. – № 4. – P. 709-719.

96. Lijnen, H. R. Elements of the Fibrinolytic System / H. R. Lijnen // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2001. – Vol. 936. – № 1. – P. 226-236.

97. Sidelmann, J. J. Fibrin Clot Formation and Lysis: Basic Mechanisms / J. J. Sidelmann, J. Gram, J. Jespersen, C. Kluft // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. – 2000. – T. 26. – № 6. – C. 605-618.

98. Mosesson, M. Dysfibrinogenemia and Thrombosis / M. Mosesson // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. – 1999. – Vol. 25. – № 03. – P. 311-319.

99. Asselta, R. The molecular basis of quantitative fibrinogen disorders / R. Asselta, S. Duga, M. L. Tenchini // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2006. – Vol. 4. – № 10. – P. 2115-2129.
100. Bugge, T. H. Plasminogen deficiency causes severe thrombosis but is compatible with development and reproduction. / T. H. Bugge, M. J. Flick, C. C. Daugherty, J. L. Degen // *Genes & Development*. – 1995. – Vol. 9. – № 7. – P. 794-807.
101. Busso, N. Exacerbation of antigen-induced arthritis in urokinase-deficient mice. / N. Busso, V. Péclat, K. Van Ness [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 1998. – Vol. 102. – № 1. – P. 41-50.
102. Akassoglou, K. Tissue Plasminogen Activator–Mediated Fibrinolysis Protects against Axonal Degeneration and Demyelination after Sciatic Nerve Injury / K. Akassoglou, K. W. Kombrinck, J. L. Degen, S. Strickland // *The Journal of Cell Biology*. – 2000. – Vol. 149. – № 5. – P. 1157-1166.
103. Lowe, G. D. O. Circulating inflammatory markers and risks of cardiovascular and non-cardiovascular disease / G. D. O. Lowe // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2005. – Vol. 3. – № 8. – P. 1618-1627.
104. Skogen, W. F. Fibrinogen-derived peptide B beta 1-42 is a multidomained neutrophil chemoattractant / W. F. Skogen, R. M. Senior, G. L. Griffin, G. D. Wilner // *Blood*. – 1988. – Vol. 71. – № 5. – P. 1475-1479.
105. Solovjov, D. A. Distinct Roles for the α and β Subunits in the Functions of Integrin α M β 2 / D. A. Solovjov, E. Pluskota, E. F. Plow // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280. – № 2. – P. 1336-1345.
106. Fan, S. T. Integrin regulation of leukocyte inflammatory functions. CD11b/CD18 enhancement of the tumor necrosis factor-alpha responses of monocytes / S. T. Fan, T. S. Edgington // *Journal of Immunology*. – 1993. – Vol. 150. – № 7. – P. 2972-2980.
107. Perez, R. L. Transcriptional Regulation of the Interleukin-1 β Promoter via Fibrinogen Engagement of the CD18 Integrin Receptor / R. L. Perez, J. D. Ritzenthaler, J. Roman // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. – 1999. –

Vol. 20. – № 5. – P. 1059-1066.

108. Perez, R. L. Fibrin enhances the expression of IL-1 beta by human peripheral blood mononuclear cells. Implications in pulmonary inflammation / R. L. Perez, J. Roman // *Journal of Immunology*. – 1995. – Vol. 154. – № 4. – P. 1879-1887.

109. Raskob, G. E. Thrombosis: A Major Contributor to Global Disease Burden / G. E. Raskob, P. Angchaisuksiri, A. N. Blanco [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2014. – Vol. 34. – № 11. – P. 2363-2371.

110. Byrnes, J. R. Red blood cells in thrombosis / J. R. Byrnes, A. S. Wolberg // *Blood*. – 2017. – Vol. 130. – № 16. – P. 1795-1799.

111. Fibrinogen Studies Collaboration. Plasma Fibrinogen Level and the Risk of Major Cardiovascular Diseases and Nonvascular Mortality: An Individual Participant Meta-analysis / Fibrinogen Studies Collaboration. – Text : electronic // *JAMA*. – 2005. – Vol. 294. – Plasma Fibrinogen Level and the Risk of Major Cardiovascular Diseases and Nonvascular Mortality. – № 14. – URL: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.294.14.1799> (date accessed: 27.02.2024).

112. Zhang, Y. Higher Fibrinogen Level is Independently Linked with the Presence and Severity of New-Onset Coronary Atherosclerosis among Han Chinese Population / Y. Zhang, C.-G. Zhu, Y.-L. Guo [et al.] // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – № 11. – P. e113460.

113. Lowe, G. D. Fibrinogen Assays for Cardiovascular Risk Assessment / G. D. Lowe // *Clinical Chemistry*. – 2010. – Vol. 56. – № 5. – P. 693-695.

114. Sarker, H. Identification of fibrinogen as a natural inhibitor of MMP-2 / H. Sarker, E. Hardy, A. Haimour [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 4340.

115. Lovely, R. S. Association of gammaA/gamma' fibrinogen levels and coronary artery disease / R. S. Lovely, L. A. Falls, H. A. Al-Mondhiry [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2002. – Vol. 88. – № 1. – P. 26-31.

116. De Maat, M. P. M. Fibrinogen heterogeneity: inherited and noninherited: / M. P. M. De Maat, M. Verschuur // *Current Opinion in Hematology*. – 2005. – Vol. 12. – № 5. – P. 377-383.

117. Morris, T. A. High prevalence of dysfibrinogenemia among patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension / T. A. Morris, J. J. Marsh, P. G. Chiles [et al.] // *Blood*. – 2009. – Vol. 114. – № 9. – P. 1929-1936.

118. Planquette, B. Fibrinogen and the prediction of residual obstruction manifested after pulmonary embolism treatment / B. Planquette, O. Sanchez, J. J. Marsh [et al.] // *European Respiratory Journal*. – 2018. – Vol. 52. – № 5. – P. 1801467.

119. Simpson-Haidaris, P. J. Tumors and Fibrinogen: The Role of Fibrinogen as an Extracellular Matrix Protein / P. J. Simpson-Haidaris, B. Rybarczyk // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2001. – Vol. 936. – № 1. – P. 406-425.

120. Dai, K. Plasma fibrinogen levels correlate with prognosis and treatment outcome in patients with non-M3 acute myeloid leukemia / K. Dai, Q. Zhang, Y. Li [et al.] // *Leukemia & Lymphoma*. – 2019. – Vol. 60. – № 6. – P. 1503-1511.

121. Elmoamly, S. Can biomarkers of coagulation, platelet activation, and inflammation predict mortality in patients with hematological malignancies? / S. Elmoamly, A. Afif // *Hematology*. – 2018. – Vol. 23. – № 2. – P. 89-95.

122. Perisanidis, C. Prognostic role of pretreatment plasma fibrinogen in patients with solid tumors: A systematic review and meta-analysis / C. Perisanidis, A. Psyrris, E. E. Cohen [et al.] // *Cancer Treatment Reviews*. – 2015. – Vol. 41. – № 10. – P. 960-970.

123. Wada, H. High plasma fibrinogen level is associated with poor clinical outcome in DIC patients / H. Wada, Y. Mori, K. Okabayashi [et al.] // *American Journal of Hematology*. – 2003. – Vol. 72. – № 1. – P. 1-7.

124. Palumbo, J. S. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells / J. S. Palumbo, K. W. Kombrinck, A. F. Drew [et al.] // *Blood*. – 2000. – Vol. 96. – № 10. – P. 3302-3309.

125. Zheng, S. Platelets and fibrinogen facilitate each other in protecting tumor cells from natural killer cytotoxicity / S. Zheng, J. Shen, Y. Jiao [et al.] // *Cancer*

Science. – 2009. – Vol. 100. – № 5. – P. 859-865.

126. Abbott, N. J. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier / N. J. Abbott, L. Rönnbäck, E. Hansson // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2006. – Vol. 7. – № 1. – P. 41-53.

127. Baeten, K. M. Extracellular matrix and matrix receptors in blood–brain barrier formation and stroke / K. M. Baeten, K. Akassoglou // *Developmental Neurobiology*. – 2011. – Vol. 71. – № 11. – P. 1018-1039.

128. Davalos, D. Imaging Microglia in the Central Nervous System: Past, Present and Future / D. Davalos, K. Akassoglou. – Text : electronic // *Central Nervous System Diseases and Inflammation* / eds. T. E. Lane [et al.]. – Boston, MA : Springer US, 2008. – Imaging Microglia in the Central Nervous System. – P. 45-57. – URL: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-73894-9_4 (date accessed: 27.02.2024).

129. Hawkins, B. T. The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease / B. T. Hawkins, T. P. Davis // *Pharmacological Reviews*. – 2005. – Vol. 57. – № 2. – P. 173-185.

130. Petersen, M. A. Fibrinogen in neurological diseases: mechanisms, imaging and therapeutics / M. A. Petersen, J. K. Ryu, K. Akassoglou // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2018. – Vol. 19. – № 5. – P. 283-301.

131. Marik, C. Lesion genesis in a subset of patients with multiple sclerosis: a role for innate immunity? / C. Marik, P. A. Felts, J. Bauer [et al.] // *Brain*. – 2007. – Vol. 130. – № 11. – P. 2800-2815.

132. Hultman, K. The *APOE* $\epsilon 4/\epsilon 4$ Genotype Potentiates Vascular Fibrin(Ogen) Deposition in Amyloid-Laden Vessels in the Brains of Alzheimer's Disease Patients / K. Hultman, S. Strickland, E. H. Norris // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2013. – Vol. 33. – № 8. – P. 1251-1258.

133. Ryu, J. K. A leaky blood–brain barrier, fibrinogen infiltration and microglial reactivity in inflamed Alzheimer's disease brain / J. K. Ryu, J. G. McLarnon // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2009. – Vol. 13. – № 9a. – P. 2911-2925.

134. Fiala, M. Cyclooxygenase-2-positive macrophages infiltrate the Alzheimer's disease brain and damage the blood-brain barrier / M. Fiala, Q. N. Liu, J. Sayre [et al.] // *European Journal of Clinical Investigation*. – 2002. – Vol. 32. – № 5. – P. 360-371.

135. Miners, J. S. Differing associations between A β accumulation, hypoperfusion, blood-brain barrier dysfunction and loss of PDGFRB pericyte marker in the precuneus and parietal white matter in Alzheimer's disease / J. S. Miners, I. Schulz, S. Love // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2018. – Vol. 38. – № 1. – P. 103-115.

136. Davalos, D. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease / D. Davalos, K. Akassoglou // *Seminars in Immunopathology*. – 2012. – Vol. 34. – № 1. – P. 43-62.

137. Montagne, A. Pericyte degeneration causes white matter dysfunction in the mouse central nervous system / A. Montagne, A. M. Nikolakopoulou, Z. Zhao [et al.] // *Nature Medicine*. – 2018. – Vol. 24. – № 3. – P. 326-337.

138. Карбышев, М. С. Биохимия оксидативного стресса. Учебно-методическое пособие. / М. С. Карбышев, Ш. П. Абдуллаев; ред. А. В. Шестопапов. – Москва : ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России, 2018. – 60 с.

139. Меньщикова, Е. Б. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания / Е. Б. Меньщикова, Н. К. Зенков, В. З. Ланкин, [и др.]. – Новосибирск : Сибирское университетское издательство, 2013. – 284 с.

140. Cogley, J. N. Mechanisms of Mitochondrial ROS Production in Assisted Reproduction: The Known, the Unknown, and the Intriguing / J. N. Cogley // *Antioxidants*. – 2020. – Vol. 9. – № 10. – P. 933.

141. Панасенко О. М. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах / О. М. Панасенко, И. В. Горудко, А. В. Соколов. // *Успехи биологической химии*. – 2013. – Т. 53. – С. 195-244.

142. Ray, P. D. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling / P. D. Ray, B.-W. Huang, Y. Tsuji // *Cellular*

Signalling. – 2012. – Vol. 24. – № 5. – P. 981-990.

143. Tse, G. Reactive Oxygen Species, Endoplasmic Reticulum Stress and Mitochondrial Dysfunction: The Link with Cardiac Arrhythmogenesis / G. Tse, B. P. Yan, Y. W. F. Chan [et al.]. – Text : electronic // *Frontiers in Physiology*. – 2016. – Т. 7. – Reactive Oxygen Species, Endoplasmic Reticulum Stress and Mitochondrial Dysfunction. – URL: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphys.2016.00313/abstract> (дата обращения: 05.12.2022).

144. Cheung, E. C. The role of ROS in tumour development and progression / E. C. Cheung, K. H. Vousden // *Nature Reviews Cancer*. – 2022. – Vol. 22. – № 5. – P. 280-297.

145. Senoner, T. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? / T. Senoner, W. Dichtl // *Nutrients*. – 2019. – Vol. 11. – № 9. – P. 2090.

146. Wiegman, C. H. Oxidative Stress in Ozone-Induced Chronic Lung Inflammation and Emphysema: A Facet of Chronic Obstructive Pulmonary Disease / C. H. Wiegman, F. Li, B. Ryffel [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – C. 1957.

147. Rendra, E. Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and function in diabetes / E. Rendra, V. Riabov, D. M. Mossel [et al.] // *Immunobiology*. – 2019. – Vol. 224. – № 2. – P. 242-253.

148. Singh, A. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases / A. Singh, R. Kukreti, L. Saso, S. Kukreti // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – № 8. – P. 1583.

149. Tönnies, E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease / E. Tönnies, E. Trushina // *Journal of Alzheimer's Disease*. – 2017. – Vol. 57. – № 4. – С. 1105-1121.

150. Солвей, Дж. Г. Наглядная медицинская биохимия. Учебное пособие / Дж. Г. Солвей. – Москва : Гэотар-Медиа, 2015. – 168 с.

151. Grune, T. Protein oxidation and aging : Wiley series on protein and peptide science / T. Grune, B. Catalgol, T. Jung. – Hoboken, New Jersey : John Wiley & Sons, 2013. – 516 p.
152. Caroch, M. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives / M. Caroch, I. C. F. R. Ferreira // Food and Chemical Toxicology. – 2013. – Vol. 51. – P. 15-25.
153. Nimalaratne, C. Hen Egg as an Antioxidant Food Commodity: A Review / C. Nimalaratne, J. Wu // Nutrients. – 2015. – Vol. 7. – № 10. – P. 8274-8293.
154. Stadtman, E. R. Protein Oxidation / E. R. Stadtman, R. L. Levine // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2006. – Vol. 899. – № 1. – P. 191-208.
155. Temple, A. Identification of specific protein carbonylation sites in model oxidations of human serum albumin / A. Temple, T.-Y. Yen, S. Gronert // Journal of the American Society for Mass Spectrometry. – 2006. – Vol. 17. – № 8. – P. 1172-1180.
156. Requena, J. R. Recent advances in the analysis of oxidized proteins / J. R. Requena, R. L. Levine, E. R. Stadtman // Amino Acids. – 2003. – Vol. 25. – № 3-4. – P. 221-226.
157. Uchida, K. 2- Oxo- histidine as a novel biological marker for oxidatively modified proteins / K. Uchida, S. Kawakishi // FEBS Letters. – 1993. – Vol. 332. – № 3. – P. 208-210.
158. Hipkiss, A. Accumulation of altered proteins and ageing: Causes and effects / A. Hipkiss // Experimental Gerontology. – 2006. – Vol. 41. – № 5. – P. 464-473.
159. Armstrong, R. C. Pulse- and gamma-radiolysis of aqueous solutions of tryptophan / R. C. Armstrong, A. J. Swallow // Radiation Research. – 1969. – Vol. 40. – № 3. – P. 563-579.
160. Antelmann, H. Thiol-Based Redox Switches and Gene Regulation / H. Antelmann, J. D. Hellmann // Antioxidants & Redox Signaling. – 2011. – Vol. 14. – № 6. – P. 1049-1063.
161. Huggins, T. G. Formation of o-tyrosine and dityrosine in proteins during

radiolytic and metal-catalyzed oxidation / T. G. Huggins, M. C. Wells-Knecht, N. A. Detorie [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1993. – Vol. 268. – № 17. – P. 12341-12347.

162. Vogt, W. Oxidation of methionyl residues in proteins: Tools, targets, and reversal / W. Vogt // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1995. – Vol. 18. – № 1. – P. 93-105.

163. Gu, S. X. Regulation of thrombosis and vascular function by protein methionine oxidation / S. X. Gu, J. W. Stevens, S. R. Lentz // *Blood*. – 2015. – Vol. 125. – № 25. – P. 3851-3859.

164. Kim, H.-Y. Methionine sulfoxide reductases: selenoprotein forms and roles in antioxidant protein repair in mammals / H.-Y. Kim, V. N. Gladyshev // *Biochemical Journal*. – 2007. – Vol. 407. – № 3. – P. 321-329.

165. Levine, R. L. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins / R. L. Levine, L. Mosoni, B. S. Berlett, E. R. Stadtman // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. – Vol. 93. – № 26. – P. 15036-15040.

166. Poole, L. B. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry / L. B. Poole // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2015. – Vol. 80. – P. 148-157.

167. Aoyama, K. Glutathione in the Brain / K. Aoyama // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 9. – P. 5010.

168. Poole, L. B. Protein Sulfenic Acids in Redox Signaling / L. B. Poole, P. A. Karplus, A. Claiborne // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. – 2004. – Vol. 44. – № 1. – P. 325-347.

169. Berlett, B. S. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress / B. S. Berlett, E. R. Stadtman // *Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 272. – № 33. – P. 20313-20316.

170. Forman, H. J. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis / H. J. Forman, H. Zhang, A. Rinna // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2009. – Vol. 30. – № 1-2. – P. 1-12.

171. Janssen-Heininger, Y. M. W. Redox-based regulation of signal

transduction: Principles, pitfalls, and promises / Y. M. W. Janssen-Heininger, B. T. Mossman, N. H. Heintz [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2008. – Vol. 45. – № 1. – P. 1-17.

172. Weissbach, H. Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage / H. Weissbach, L. Resnick, N. Brot // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. – 2005. – Vol. 1703. – № 2. – P. 203-212.

173. Levine, R. L. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage / R. L. Levine, B. S. Berlett, J. Moskovitz [et al.] // *Mechanisms of Ageing and Development*. – 1999. – Vol. 107. – № 3. – P. 323-332.

174. Lim, J. M. Methionine in Proteins: It's Not Just for Protein Initiation Anymore / J. M. Lim, G. Kim, R. L. Levine // *Neurochemical Research*. – 2019. – Vol. 44. – № 1. – P. 247-257.

175. Griffiths, H. R. Redox regulation of protein damage in plasma / H. R. Griffiths, I. H. K. Dias, R. S. Willetts, A. Devitt // *Redox Biology*. – 2014. – Vol. 2. – P. 430-435.

176. Aledo, J. C. Methionine in proteins: The Cinderella of the proteinogenic amino acids / J. C. Aledo // *Protein Science*. – 2019. – Vol. 28. – № 10. – P. 1785-1796.

177. Hsu, Y.-R. In vitro methionine oxidation of *escherichia coli* -derived human stem cell factor: Effects on the molecular structure, biological activity, and dimerization: In vitro methionine oxidation of stem cell factor / Y.-R. Hsu, L. O. Narhi, C. Spahr [et al.] // *Protein Science*. – 1996. – Vol. 5. – № 6. – P. 1165-1173.

178. Keck, R. G. The Use of t-Butyl Hydroperoxide as a Probe for Methionine Oxidation in Proteins / R. G. Keck // *Analytical Biochemistry*. – 1996. – Vol. 236. – № 1. – P. 56-62.

179. Spahr, C. S. The effects of in vitro methionine oxidation on the bioactivity and structure of human keratinocyte growth factor / C. S. Spahr, L. O. Narhi, J. Speakman [et al.]. – Text : electronic // *Techniques in Protein Chemistry*. – Elsevier, 1997. – Vol. 8. – P. 299-308. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1080891497800312> (date accessed:

18.03.2024).

180. Bourdon, E. Differential effects of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin / E. Bourdon, N. Loreau, L. Lagrost, D. Blache // *Free Radical Research*. – 2005. – Vol. 39. – № 1. – P. 15-20.

181. Grune, T. Degradation of Oxidized Proteins in K562 Human Hematopoietic Cells by Proteasome / T. Grune, T. Reinheckel, K. J. A. Davies // *Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – Vol. 271. – № 26. – P. 15504-15509.

182. Jennifer Rivett, A. Regulation of Intracellular Protein Turnover: Covalent Modification as a Mechanism of Marking Proteins for Degradation / A. Jennifer Rivett. – Text : electronic // *Current Topics in Cellular Regulation*. – Elsevier, 1986. – Vol. 28. – Regulation of Intracellular Protein Turnover. – P. 291-337. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012152828750010X> (date accessed: 05.12.2022).

183. Wang, P. Thioredoxin and Thioredoxin Reductase Control Tissue Factor Activity by Thiol Redox-dependent Mechanism / P. Wang, Y. Wu, X. Li [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288. – № 5. – P. 3346-3358.

184. Abudu, N. Fibrinogen is a co-antioxidant that supplements the vitamin E analog trolox in a model system / N. Abudu, J. J. Miller, S. S. Levinson // *Free Radical Research*. – 2006. – Vol. 40. – № 3. – P. 321-331.

185. Kaplan, I. Fibrinogen is an antioxidant that protects \hat{I}^2 -lipoproteins at physiological concentrations in a cell free system / I. Kaplan // *Atherosclerosis*. – 2001. – Vol. 158. – № 2. – P. 455-463.

186. Swertfeger, D. K. Feasibility of a plasma bioassay to assess oxidative protection of low-density lipoproteins by high-density lipoproteins / D. K. Swertfeger, S. Rebholz, H. Li [et al.] // *Journal of Clinical Lipidology*. – 2018. – Vol. 12. – № 6. – P. 1539-1548.

187. Mañucat-Tan, N. Hypochlorite-induced aggregation of fibrinogen underlies a novel antioxidant role in blood plasma / N. Mañucat-Tan, R. Zeineddine Abdallah, H. Kaur [et al.] // *Redox Biology*. – 2021. – Vol. 40. – P. 101847.

188. Rosenfeld, M. A. Ozone-induced oxidative modification of fibrinogen:

Role of the D regions / M. A. Rosenfeld, A. N. Shchegolikhin, A. V. Bychkova [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2014. – Vol. 77. – P. 106-120.

189. Upchurch Jr, G. R. Prothrombotic Consequences of the Oxidation of Fibrinogen and their Inhibition by Aspirin / G. R. Upchurch Jr, N. Ramdev, M. T. Walsh, J. Loscalzo // *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. – 1998. – Vol. 5. – № 1. – P. 9-14.

190. Burney, P. R. Structural Effects of Methionine Oxidation on Isolated Subdomains of Human Fibrin D and α C Regions / P. R. Burney, N. White, J. Pfaendtner // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – № 1. – P. e86981.

191. Weigandt, K. M. Fibrin Clot Structure and Mechanics Associated with Specific Oxidation of Methionine Residues in Fibrinogen / K. M. Weigandt, N. White, D. Chung [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2012. – Vol. 103. – № 11. – P. 2399-2407.

192. Colombo, G. A central role for intermolecular dityrosine cross-linking of fibrinogen in high molecular weight advanced oxidation protein product (AOPP) formation / G. Colombo, M. Clerici, D. Giustarini [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 2015. – Vol. 1850. – № 1. – P. 1-12.

193. Розенфельд М. А. Окислительная модификация фибриногена под действием озона / М. А. Розенфельд, А. Н. Щеголихин, А.В. Бычкова [и др.] // *Биохимия*. – 2013. – Т. 78. – № 10. – С. 1491-1501.

194. Belisario, M. A. Metal-ion catalyzed oxidation affects fibrinogen activity on platelet aggregation and adhesion / M. A. Belisario, C. Di Domenico, A. Pelagalli [et al.] // *Biochimie*. – 1997. – Vol. 79. – № 7. – P. 449-455.

195. Paton, L. N. Increased thrombin-induced polymerization of fibrinogen associated with high protein carbonyl levels in plasma from patients post myocardial infarction / L. N. Paton, T. J. Mocatta, A. M. Richards, C. C. Winterbourn // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2010. – Vol. 48. – № 2. – P. 223-229.

196. Sovová, Ž. Impact of posttranslational modifications on atomistic structure of fibrinogen / Ž. Sovová, J. Štikarová, J. Kaufmanová [et al.] // *PLOS ONE*. – 2020. – Vol. 15. – № 1. – P. e0227543.

197. Hodge, E. A. Bridging protein structure, dynamics, and function using

hydrogen/deuterium-exchange mass spectrometry / E. A. Hodge, M. A. Benhaim, K. K. Lee // *Protein Science*. – 2020. – Vol. 29. – № 4. – P. 843-855.

198. White, N. J. Post-translational oxidative modification of fibrinogen is associated with coagulopathy after traumatic injury / N. J. White, Y. Wang, X. Fu [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2016. – Vol. 96. – P. 181-189.

199. Wang, L. Study on the influence of oxidative stress on the fibrillization of fibrinogen / L. Wang, L. Li, H. Wang, J. Liu // *Biochemical Journal*. – 2016. – Vol. 473. – № 23. – P. 4373-4384.

200. Becatti, M. Oxidative Modification of Fibrinogen Is Associated With Altered Function and Structure in the Subacute Phase of Myocardial Infarction / M. Becatti, R. Marcucci, G. Bruschi [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2014. – Vol. 34. – № 7. – P. 1355-1361.

201. Siudut, J. Impaired Fibrinolysis in Patients with Isolated Aortic Stenosis is Associated with Enhanced Oxidative Stress / J. Siudut, J. Natorka, E. Wypasek [et al.] // *Journal of Clinical Medicine*. – 2020. – Vol. 9. – № 6. – P. 2002.

202. Undas, A. Fibrin clot properties and their modulation in thrombotic disorders / A. Undas // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2014. – Vol. 112. – № 07. – P. 32-42.

203. Ząbczyk, M. Fibrin clot properties in cardiovascular disease: from basic mechanisms to clinical practice / M. Ząbczyk, R. A. S. Ariëns, A. Undas // *Cardiovascular Research*. – 2023. – Vol. 119. – № 1. – P. 94-111.

204. Rosenfeld, M. A. Antioxidant role of methionine-containing intra- and extracellular proteins / M. A. Rosenfeld, L. V. Yurina, A. D. Vasilyeva // *Biophysical Reviews*. – 2023. – Vol. 15. – № 3. – P. 367-383.

205. Doolittle, R. F. Amino acid sequence studies on artiodactyl fibrinopeptides / R. F. Doolittle, D. Schubert, S. A. Schwartz // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1967. – Vol. 118. – № 2. – P. 456-467.

206. Yurina, L. Ozone-induced damage of fibrinogen molecules: identification of oxidation sites by high-resolution mass spectrometry / L. Yurina, A. Vasilyeva, M. Indeykina [et al.] // *Free Radical Research*. – 2019. – Vol. 53. – № 4. – P. 430-455.

207. Loewy, A. G. Fibrinase. I. Purification of substrate and enzyme / A. G. Loewy, K. Dunathan, R. Kriel, H. L. Wolfinger // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1961. – Vol. 236. – P. 2625-2633.

208. Deutsch, D. G. Plasminogen: Purification from Human Plasma by Affinity Chromatography / D. G. Deutsch, E. T. Mertz // *Science*. – 1970. – Vol. 170. – № 3962. – P. 1095-1096.

209. Юрина Л. В. Структурно-функциональные повреждения фибриногена в результате пероксид-индуцированного окисления / Л. В. Юрина, А. Д. Васильева, В. Л. Кононенко [и др.] // *Доклады российской академии наук. Науки о жизни*. – 2020. – Т. 492. – № 1. – С. 287-292.

210. Юрина Л. В. Влияние гипохлорит- и пероксид- индуцированного окисления фибриногена на структуру фибрина / Л. В. Юрина, А. Д. Васильева, Л. А. Вассерман [и др.] // *Доклады российской академии наук. Науки о жизни*. – 2021. – Т. 499. – № 1. – С. 364-369.

211. Юрина Л. В. Гипохлорит-индуцированная окислительная модификация фибриногена / Л. В. Юрина, А. Д. Васильева, А. Е. Бугрова [и др.] // *Доклады академии наук*. – 2019. – Т. 484. – № 3. – С. 367–371.

212. Yurina, L. V. A role of methionines in the functioning of oxidatively modified fibrinogen / L. V. Yurina, A. D. Vasilyeva, E. S. Gavrilina [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. – 2024. – Vol. 1872. – № 4. – P. 141013.

213. Morris, J. C. The Acid Ionization Constant of HOCl from 5 to 35° / J. C. Morris // *The Journal of Physical Chemistry*. – 1966. – Vol. 70. – № 12. – P. 3798-3805.

214. Васильева А. Д. Гипохлорит-индуцированная окислительная модификация плазминогена: структурно-функциональные нарушения / А. Д. Васильева, Л. В. Юрина, А. Н. Щеголихин [и др.] // *Доклады академии наук*. – Т. 488. – №5 – С. 560–566.

215. Weisel, J. W. Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations: clot structure and

assembly are kinetically controlled / J. W. Weisel, C. Nagaswami // *Biophysical Journal*. – 1992. – Vol. 63. – № 1. – P. 111-128.

216. Kaufmanova, J. Fibrin Clot Formation under Oxidative Stress Conditions / J. Kaufmanova, J. Stikarova, A. Hlavackova [et al.] // *Antioxidants*. – 2021. – Vol. 10. – № 6. – P. 923.

217. Casassa, E. F. Light Scattering from Very Long Rod-Like Particles and an Application to Polymerized Fibrinogen / E. F. Casassa // *The Journal of Chemical Physics*. – 1955. – Vol. 23. – № 3. – P. 596-597.

218. Kotova, Y. N. Binding of Coagulation Factor XIII Zymogen to Activated Platelet Subpopulations: Roles of Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ and Fibrinogen / Y. N. Kotova, N. A. Podoplelova, S. I. Obydenny [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2019. – Vol. 119. – № 6. – P. 906-915.

219. Sakharov, D. V. Rearrangements of the Fibrin Network and Spatial Distribution of Fibrinolytic Components during Plasma Clot Lysis / D. V. Sakharov, J. F. Nagelkerke, D. C. Rijken // *Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – Vol. 271. – № 4. – P. 2133-2138.

220. Ishihama, Y. Microcolumns with self-assembled particle frits for proteomics / Y. Ishihama, J. Rappsilber, J. S. Andersen, M. Mann // *Journal of Chromatography A*. – 2002. – Vol. 979. – № 1-2. – P. 233-239.

221. Vasilyeva, A. Oxidation-induced modifications of the catalytic subunits of plasma fibrin-stabilizing factor at the different stages of its activation identified by mass spectrometry / A. Vasilyeva, L. Yurina, M. Indeykina [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. – 2018. – Vol. 1866. – № 8. – P. 875-884.

222. Han, X. PeaksPTM: Mass Spectrometry-Based Identification of Peptides with Unspecified Modifications / X. Han, L. He, L. Xin [et al.] // *Journal of Proteome Research*. – 2011. – Vol. 10. – № 7. – P. 2930-2936.

223. Verrastro, I. Mass Spectrometry-Based Methods for Identifying Oxidized Proteins in Disease: Advances and Challenges / I. Verrastro, S. Pasha, K. Jensen [et al.] // *Biomolecules*. – 2015. – Vol. 5. – № 2. – P. 378-411.

224. Zhang, J. PEAKS DB: De Novo Sequencing Assisted Database Search for Sensitive and Accurate Peptide Identification / J. Zhang, L. Xin, B. Shan [et al.] // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2012. – Vol. 11. – № 4. – P. M111.010587.

225. Sharma, V. K. Oxidation of Amino Acids, Peptides and Proteins by Ozone: A Review / V. K. Sharma, N. J. D. Graham // *Ozone: Science & Engineering*. – 2010. – Vol. 32. – № 2. – P. 81-90.

226. Розенфельд М.А. Природа активных промежуточных частиц в процессах индуцированного озоном окисления фибриногена / М. А. Розенфельд, С. Д. Разумовский, А. Н. Щеголихин [и др.] // *Доклады Академии наук*. – 2015. – Т. 461. – № 6. – С. 729–732.

227. Berlett, B. S. Comparison of the Effects of Ozone on the Modification of Amino Acid Residues in Glutamine Synthetase and Bovine Serum Albumin / B. S. Berlett, R. L. Levine, E. R. Stadtman // *Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – Vol. 271. – № 8. – P. 4177-4182.

228. Smith, C. E. Ozone effects on inhibitors of human neutrophil proteinases / C. E. Smith, M. S. Stack, D. A. Johnson // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1987. – Vol. 253. – № 1. – P. 146-155.

229. Rosenfeld, M. A. Fibrin self-assembly is adapted to oxidation / M. A. Rosenfeld, A. V. Bychkova, A. N. Shchegolikhin [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2016. – Vol. 95. – P. 55-64.

230. Babior, B. M. Biological Defense Mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent / B. M. Babior, R. S. Kipnes, J. T. Curnutte // *Journal of Clinical Investigation*. – 1973. – Vol. 52. – № 3. – P. 741-744.

231. Melkani, G. C. Protection of GroEL by its methionine residues against oxidation by hydrogen peroxide / G. C. Melkani, J. Kestetter, R. Sielaff [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2006. – Vol. 347. – № 2. – P. 534-539.

232. Lorand, L. Intramolecular localization of the acceptor cross-linking sites in fibrin / L. Lorand, D. Chenoweth // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. –

1969. – Vol. 63. – № 4. – P. 1247-1252.

233. Pechik, I. Crystal structure of the complex between thrombin and the central “E” region of fibrin / I. Pechik, J. Madrazo, M. W. Mosesson [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – Vol. 101. – № 9. – P. 2718-2723.

234. Chen, R. γ - γ Cross-linking sites in human and bovine fibrin / R. Chen, R. F. Doolittle // Biochemistry. – 1971. – Vol. 10. – № 24. – P. 4486-4491.

235. Sobel, J. H. Identification of the α Chain Lysine Donor Sites Involved in Factor XIIIa Fibrin Cross-linking / J. H. Sobel, M. A. Gawinowicz // Journal of Biological Chemistry. – 1996. – Vol. 271. – № 32. – P. 19288-19297.

236. McKenna, S. M. The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. Possible role in the bactericidal activity of phagocytes / S. M. McKenna, K. J. A. Davies // Biochemical Journal. – 1988. – Vol. 254. – № 3. – P. 685-692.

237. Ulfig, A. The effects of neutrophil-generated hypochlorous acid and other hypohalous acids on host and pathogens / A. Ulfig, L. I. Leichert // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2021. – Vol. 78. – № 2. – P. 385-414.

238. 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 [et al.] // Russian Journal of Physical Chemistry B. – 2024. – Vol. 18. – № 2. – P. 521-526.

239. Weisel, J. W. A Model for Fibrinogen: Domains and Sequence / J. W. Weisel, C. V. Stauffacher, E. Bullitt, C. Cohen // Science. – 1985. – Vol. 230. – № 4732. – P. 1388-1391.

240. 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.

241. Rosenfeld, M. A. Ozone-induced oxidative modification of plasma fibrin-stabilizing factor / M. A. Rosenfeld, A. V. Bychkova, A. N. Shchegolikhin [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. – 2013. – Vol. 1834. – № 12. – P. 2470-2479.

242. Loria, V. Myeloperoxidase: A New Biomarker of Inflammation in Ischemic Heart Disease and Acute Coronary Syndromes / V. Loria, I. Dato, F. Graziani, L. M. Biasucci // *Mediators of Inflammation*. – 2008. – Vol. 2008. – P. 1-4.

243. McCall, M. R. LDL Modified by Hypochlorous Acid Is a Potent Inhibitor of Lecithin-Cholesterol Acyltransferase Activity / M. R. McCall, A. C. Carr, T. M. Forte, B. Frei // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2001. – Vol. 21. – № 6. – P. 1040-1045.

244. Summers, F. A. Identification of Plasma Proteins That Are Susceptible to Thiol Oxidation by Hypochlorous Acid and *N*-Chloramines / F. A. Summers, P. E. Morgan, M. J. Davies, C. L. Hawkins // *Chemical Research in Toxicology*. – 2008. – Vol. 21. – № 9. – P. 1832-1840.

245. Epstein, F. H. Tissue Destruction by Neutrophils / F. H. Epstein, S. J. Weiss // *New England Journal of Medicine*. – 1989. – Vol. 320. – № 6. – P. 365-376.

246. Pattison, D. I. What Are the Plasma Targets of the Oxidant Hypochlorous Acid? A Kinetic Modeling Approach / D. I. Pattison, C. L. Hawkins, M. J. Davies // *Chemical Research in Toxicology*. – 2009. – Vol. 22. – № 5. – P. 807-817.

247. Pattison, D. I. Absolute Rate Constants for the Reaction of Hypochlorous Acid with Protein Side Chains and Peptide Bonds / D. I. Pattison, M. J. Davies // *Chemical Research in Toxicology*. – 2001. – Vol. 14. – № 10. – P. 1453-1464.

248. Forman, H. J. What is the concentration of hydrogen peroxide in blood and plasma? / H. J. Forman, A. Bernardo, K. J. A. Davies // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2016. – Vol. 603. – P. 48-53.

249. Root, R. K. H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. I. Documentation, quantitation, and some regulating factors. / R. K. Root, J. Metcalf, N. Oshino, B. Chance // *Journal of Clinical Investigation*. – 1975. – Vol. 55. – № 5. – P. 945-955.

250. Pastori, D. Nox-2 up-regulation and platelet activation: Novel insights / D. Pastori, P. Pignatelli, R. Carnevale, F. Violi // *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. – 2015. – Vol. 120. – P. 50-55.

251. Hassan, H. M. Inhibitors of superoxide dismutases: A cautionary tale / H. M. Hassan, H. Dougherty, I. Fridovich // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1980. – Vol. 199. – № 2. – P. 349-354.

252. Siebenlist, K. R. The polymerization and thrombin-binding properties of des-(B beta 1-42)-fibrin / K. R. Siebenlist, J. P. DiOrio, A. Z. Budzynski, M. W. Mosesson // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1990. – Vol. 265. – № 30. – P. 18650-18655.

253. Shacter, E. Oxidative modification of fibrinogen inhibits thrombin-catalyzed clot formation / E. Shacter, J. A. Williams, R. L. Levine // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1995. – Vol. 18. – № 4. – P. 815-821.

254. Vadseth, C. Pro-thrombotic State Induced by Post-translational Modification of Fibrinogen by Reactive Nitrogen Species / C. Vadseth, J. M. Souza, L. Thomson [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – № 10. – P. 8820-8826.

255. Kononova, O. Molecular Mechanisms, Thermodynamics, and Dissociation Kinetics of Knob-Hole Interactions in Fibrin / O. Kononova, R. I. Litvinov, A. Zhmurov [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288. – № 31. – P. 22681-22692.

256. Kostelansky, M. S. B β Glu397 and B β Asp398 but Not B β Asp432 Are Required for “B:b” Interactions / M. S. Kostelansky, B. Bolliger-Stucki, L. Betts [et al.] // *Biochemistry*. – 2004. – Vol. 43. – № 9. – P. 2465-2474.

257. Bowley, S. R. Fibrinogen variant B β D432A has normal polymerization but does not bind knob “B” / S. R. Bowley, S. T. Lord // *Blood*. – 2009. – Vol. 113. – № 18. – P. 4425-4430.

258. Levine, R. Oxidation of Methionine in Proteins: Roles in Antioxidant Defense and Cellular Regulation / R. Levine, J. Moskovitz, E. Stadtman // *IUBMB Life*. – 2001. – Vol. 50. – № 4. – P. 301-307.

259. Luo, S. Methionine in proteins defends against oxidative stress / S. Luo, R. L. Levine // *The FASEB Journal*. – 2009. – Vol. 23. – № 2. – P. 464-472.

260. Litvinov, R. I. Fibrinogen and Fibrin / R. I. Litvinov, M. Pieters, Z. De Lange-Loots, J. W. Weisel. – Text: electronic // Macromolecular Protein Complexes III: Structure and Function : Subcellular Biochemistry / eds. J. R. Harris, J. Marles-Wright. – Cham : Springer International Publishing, 2021. – Vol. 96. – P. 471-501. – URL: https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-58971-4_15 (date accessed: 04.07.2023).

261. J. C. Aledo, J. C. Mitochondrially encoded methionine is inversely related to longevity in mammals: Methionine usage and longevity in mammals / J. C. Aledo, Y. Li, J. P. de Magalhães [et al.] // Aging Cell. – 2011. – Vol. 10. – № 2. – P. 198-207.

262. Walker, E. J. Global analysis of methionine oxidation provides a census of folding stabilities for the human proteome / E. J. Walker, J. Q. Bettinger, K. A. Welle [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2019. – Vol. 116. – № 13. – P. 6081-6090.

263. Momozono, A. Oxidised Met147 of human serum albumin is a biomarker of oxidative stress, reflecting glycaemic fluctuations and hypoglycaemia in diabetes / A. Momozono, Y. Kodera, S. Sasaki [et al.] // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 268.

264. Suzuki, S. Methionine sulfoxides in serum proteins as potential clinical biomarkers of oxidative stress / Y. Kodera, T. Saito [et al.] // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – № 1. – P. 38299.

265. Reddy, V. Y. Oxidative dissociation of human alpha 2-macroglobulin tetramers into dysfunctional dimers / V. Y. Reddy, P. E. Desorchers, S. V. Pizzo [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 1994. – Vol. 269. – № 6. – P. 4683-4691.

266. Van Patten, S. M. Oxidation of Methionine Residues in Antithrombin / S. M. Van Patten, E. Hanson, R. Bernasconi [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 1999. – Vol. 274. – № 15. – P. 10268-10276.

267. Vasilyeva, A. The effect of hypochlorite- and peroxide-induced oxidation of plasminogen on damage to the structure and biological activity / A. Vasilyeva, L. Yurina, V. Ivanov [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2022. – Vol. 206. – P. 64-73.

268. Vasilyeva, A. The Structure of Blood Coagulation Factor XIII Is Adapted to Oxidation / A. Vasilyeva, L. Yurina, A. Shchegolikhin [et al.] // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10. – № 6. – P. 914.