

На правах рукописи

Гаврилина Елизавета Сергеевна

**СТРУКТУРНАЯ АДАПТАЦИЯ МОЛЕКУЛЫ ПЛАЗМИНОГЕНА К
ВОЗДЕЙСТВИЮ ОКИСЛИТЕЛЕЙ**

1.5.2. Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2026

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

**Научный
руководитель:**

Васильева Александра Дмитриевна,
кандидат биологических наук

**Официальные
оппоненты:**

Пантелеев Михаил Александрович,
доктор физико-математических наук, член-корреспондент РАН, профессор РАН, Заведующий лабораторией Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук.

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

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю. М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства»

Защита диссертации состоится «23» декабря 2026 года в 12:00 на заседании Диссертационного совета 24.1.038.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

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

<https://biochemphysics.ru/ru/odissertacii/Диссертация%20Гаврилиной%20Елизаветы%20Сергеевны/>

Автореферат разослан « » _____ 2026 года

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.1.038.01,
кандидат химических наук



Л.И. Мазалецкая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Известно, что белковые молекулы являются восприимчивыми мишенями для активных форм кислорода (АФК). Ввиду высокой реакционной способности активных форм кислорода они выступают ключевыми агентами окислительной модификации белков, индуцируя конформационные и химические изменения в молекулах, причем характер этих нарушений зависит как от структуры белка, так и от природы АФК. В целом, действие АФК на белок может вызывать окисление боковых радикалов аминокислот, генерацию внутри- и межмолекулярных сшивок, а также атаку пептидного остова, ведущую к протеолитической деградации. Накопление белков с окислительными посттрансляционными модификациями (ПТМ), коррелирует с процессами клеточного старения, а также с этиологией и патогенезом ряда заболеваний. Взаимосвязь между ПТМ и структурно-функциональными нарушениями является предметом исследований на примере многих белков плазмы, таких как фибриноген, альбумин, фактор свертывания крови XIII, $\alpha 2$ -макроглобулин и других. Окислительные ПТМ плазминогена остаются недостаточно изученными.

Плазминоген является одним из важнейших белков системы фибринолиза. Также он вовлечен в ряд физиологических процессов, включая клеточную миграцию, эмбриогенез, ангиогенез и регенерацию тканей. Кроме того, плазминоген участвует и в развитии патологических процессов, в частности, способствует росту злокачественных новообразований и их метастазированию.

Плазминоген принадлежит к классу сериновых протеаз, для представителей которого характерно наличие эволюционно консервативных доменов. Поскольку плазминоген содержит домены, которые не являются для него уникальными, идентификация ПТМ плазминогена при индуцированном окислении может способствовать пониманию универсального механизма сохранения функциональной активности различных сериновых протеаз в условиях избытка АФК.

Цель исследования: выявление механизмов нарушения молекулярной структуры и функциональной активности плазминогена при его индуцированном окислении.

Задачи исследования:

1. Оценить влияние окислительных модификаций плазминогена, возникающих под воздействием гипохлорита натрия (NaOCl/OCl) и перекиси водорода (H_2O_2), на функциональные свойства плазмина, образующегося из него методами электрофореза в ПААГ и колориметрии.

2. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) дать характеристику модифицированных аминокислотных остатков плазминогена: определить локализацию модифицированных аминокислотных остатков, определить их химическую природу, количественно оценить степень модификации и выявить наиболее уязвимые для окисления структурные элементы белка.

3. Исследовать термическую денатурацию плазминогена в присутствии различных концентраций гипохлорита натрия (NaOCl/OCl) методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и оценить изменения термодинамических параметров денатурации.

4. Провести сравнение окислительных модификаций в плазминогене и комплексе плазминогена и стрептокиназы, образующихся в результате индуцированного гипохлоритом натрия (NaOCl/OCl) окисления.

5. Оценить вклад конформации молекулы плазмин(оген)а в сохранение его функциональной активности при окислении.

Научная новизна:

1. Впервые методом масс-спектрометрии (МС) было исследовано влияние окислителей с различной химической активностью – гипохлорита натрия (NaOCl/OCl) и пероксида водорода (H_2O_2) – на структуру плазминогена. Установлено, что индуцированное окисление вызывает формирование ПТМ преимущественно в сериновопроteaseзном (SP) домене и четвертом крингл-домене (KR4).

2. Посттрансляционные окислительные модификации, индуцированные в SP-домене, не приводят к существенному изменению его функциональной активности.

3. Остатки метионина Met57, Met182, Met385, Met404, Met788 могут являться внутримолекулярными перехватчиками АФК.

Теоретическая и практическая значимость работы. Сопоставив данные об окислительных ПТМ, возникающих в плазминогене и изменениях его функциональной активности было установлено, что некоторые из выявленных окислительные модификации, могут быть ответственны за подавление фибринолитической функции белка. Эти данные расширяют представления о взаимосвязи между накоплением плазминогена, содержащего ПТМ с развитием тромбозов и других патологий, которые могут быть связаны с дисфункцией белка.

Плазминоген служит оптимальной моделью для изучения молекулярных механизмов адаптации белков к окислительному стрессу в плазме крови: анализ его индуцированных окислительных ПТМ позволяет раскрыть общие принципы адаптации белков к окислению.

Методология и методы исследования. Выделение плазминогена (ПГ) из донорской плазмы крови человека осуществляли методом аффинной хроматографии с использованием Lys-Sepharose 4B (Amersham, Великобритания). Концентрацию выделенного белка определяли спектрофотометрически.

Окисление плазминогена индуцировали гипохлоритом натрия (NaOCl/OCl) или перекисью водорода (H_2O_2) в выбранных концентрациях.

Влияние окисления на ферментативную активность плазмина оценивали с помощью синтетического субстрата S2251TM (Chromogenix, США), а также методом электрофореза в ПААГ по изменению соотношения продуктов деградации фибриногена.

Значения гидродинамического диаметра для различных образцов молекул плазминогена до и после окисления измеряли с помощью прибора Zetasizer Nano S (Malvern, Англия).

Термодинамические параметры денатурации плазминогена определяли методом высокочувствительной дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на микрокалориметре ДАСМ-4 (Пушино, Россия). Обработку данных ДСК проводили с использованием специализированного программного обеспечения: температуры фазовых переходов и энтальпию денатурации рассчитывали в программе НАИРТА (ИНЭОС РАН), а деконволюцию термограмм осуществляли с помощью пакета Peak Fit версии 4 (AISN Software Incorporated).

Идентификацию модифицированных аминокислотных остатков проводили методом ВЭЖХ-МС/МС на хроматографической системе Agilent 1200, сопряженной с масс-спектрометром высокого разрешения 7T LTQ-FT Ultra (Thermo Scientific, Германия). Разделение триптических пептидов осуществляли на колонке Reprosil-Pur Basic C18 (75 мкм × 12 см, 3 мкм; Dr. Maisch HPLC GmbH, Германия). Полученные МС/МС-спектры обрабатывали в программе PEAKS Studio версии 8.5 (Bioinformatics Solutions Inc., Канада), выполняя поиск по базе данных UniProtKB (Homo sapiens, таксономический идентификатор UP000005640).

Положения, выносимые на защиту:

1. На основании исследования индуцированной окислительной модификации плазминогена и плазминогена в комплексе со стрептокиназой методом ВЭЖХ-МС/МС показано, что наибольшее число модификаций и повышенный уровень окисления аминокислотных остатков наблюдается в образцах плазминогена в комплексе со стрептокиназой. Окисление аминокислотных остатков, расположенных в крингл-доменах, вероятно может приводить к потере функциональной активности белка.
2. Наиболее подверженными окислительной модификации структурными элементами во всех исследуемых образцах оказались домены KR4 и SP.
3. При анализе протеазной активности плазминогена и комплекса плазминоген-стрептокиназа методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ), в обоих случаях значительное снижение активности было обнаружено при окислении 50 мкМ NaOCl/OC1.
4. Анализ результатов дифференциальной сканирующей калориметрии показал, что окислительная модификация плазминогена, индуцированная NaOCl/OC1, приводит к уменьшению молярной энтальпии денатурации. Несмотря на выраженное уменьшение энтальпии, стабильность наиболее устойчивого к нагреванию фрагмента белка сохраняется, что подтверждается близостью его температуры денатурации относительно контроля. Это свидетельствует о том, что при окислении SP-домен остается наиболее устойчивым к тепловой денатурации структурным элементом.

Личный вклад диссертанта. Личный вклад автора заключался в постановке целей и задач исследования, самостоятельном планировании и проведении

экспериментов, статистической обработке полученных данных и подготовке публикаций по теме работы. Результаты исследования были представлены на российских и международных научных конференциях.

Исследования с применением оборудования центра коллективного пользования ИБХФ РАН (ВЭЖХ-МС/МС) были проведены в сотрудничестве с научными сотрудниками: к.ф.-м.н. Кононихиным А. С., к.б.н. Бугровой А. Е., н.с. Индейкиной М. И. и д.ф.-м.н. Николаевым Е. Н. Исследования на микрокалориметре ДАСМ-4 были проведены в сотрудничестве с с.н.с., к.х.н. Вассерман Л. А.

Степень достоверности полученных результатов и обоснованность выводов обеспечиваются применением комплекса современных физико-химических методов анализа белковых структур и их функциональной активности. Обработка экспериментальных данных проводилась с использованием специализированного программного обеспечения, реализующего оригинальные алгоритмы анализа и позволяющего выполнять строгую статистическую оценку погрешности измерений.

Достоверность полученных результатов обеспечивалась сопоставлением собственных данных с литературными источниками, в которых аналогичные системы изучались альтернативными физико-химическими методами. Техническое обеспечение экспериментов осуществлялось ЦКП «Новые материалы и технологии» ИБХФ РАН на сертифицированном научном оборудовании.

Апробация работы

Результаты диссертации были представлены:

IX Всероссийской научной молодежной школе-конференции "Химия, физика, биология: пути интеграции" (Москва, 2022); XXII Ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы (Москва, 2022); 3rd International Conference "Systems Biology and Systems Physiology: Intracellular Signaling and Metabolism Regulation" (Москва, 2022); 13-ой Международной научной конференции «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (Суздаль, 2023); Second Moscow International Conference on Multi-omics Technologies for Precision Medicine (Московская область, 2023); XXIII Ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы (Москва, 2023); XXIV Ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы (Москва, 2024); XXV Ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы (Москва, 2025); Всероссийской научно-практической конференции "Экспериментальная медицина", посвященной 135-летию Института экспериментальной медицины (Санкт-Петербург, 2025).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них – 4 статьи в международных и российских рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК; 9 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 и их обсуждением, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, список литературы (137 источников) и приложение А. Работа изложена на 95 страницах машинописного текста, содержит 6 таблиц и 26 рисунков.

Список сокращений и условных обозначений. АФК – активные формы кислорода; ПТМ – посттрансляционные модификации; ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с tandemной масс-спектрометрией; ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия; МС – масс-спектрометрия; KR1-KR5 – крингл домены 1-5; NTP, Pap – Pan-Apple домен; SP-домен – сериновый протеазный домен; комплекс ПГ-СК – комплекс плазминогена со стрептокиназой; ПААГ – полиакриламидный гель.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

Глава 1 содержит обзор литературы, в котором последовательно рассматриваются современные представления о пространственной структуре плазминогена: конформации белка и организации его доменов. Отдельное внимание уделено характеристике эндогенных и экзогенных активаторов белка. В главе также изложена информация о мутациях плазминогена. Кроме того, в главе представлена информация об активных формах кислорода и их влиянии на окислительную модификацию аминокислотных остатков.

Глава 2 описывает материалы и методы, использованные при выполнении работы. Фибриноген получали из цитратной плазмы крови методом глицинового осаждения. Плазминоген выделяли из плазмы методом аффинной хроматографии с использованием, модифицированной лизином CNBr-Sepharose 4B (Amersham, Англия) при +4 °С. Концентрации выделенных белков определяли спектрофотометрическим методом по поглощению белка при $\lambda=280$ нм.

Превращение Glu-плазминогена в плазмин инициировали стрептокиназой (Behringwerke, Германия). Для образования комплексов плазминоген-стрептокиназа белки смешивали в эквимольном соотношении и инкубировали 40 минут при +37 °С.

Окисление плазминогена индуцировали гипохлоритом натрия (Sigma-Aldrich, Германия), либо перекисью водорода. Плазминоген (0,1 мг/мл) окисляли 25, 50 или 100 мкМ гипохлоритом натрия (NaOCl/OCI) в течение 2-х часов при +37 °С. Реакцию останавливали добавлением 10-кратного молярного избытка L-метионина. Окисление плазминогена в присутствии 100 или 300 мкМ H₂O₂ проводили в тех же условиях. L-метионин удаляли центрифугированием на фильтрах Amicon Ultra (0,5 мл, 10 кДа, Merck) согласно протоколу производителя.

Влияние окисления на ферментативную активность плазмина оценивали с

помощью синтетического хромогенного субстрата S2251TM (Chromogenix, США). Методом SDS-PAGE (Лэммли) оценивали накопление продуктов деградации фибриногена при фибринолизе, опосредованном плазмином, либо комплексом плазминоген-стрептокиназа (ПГ-СК).

Метод динамического рассеяния света применяли для измерения распределения размеров молекул плазминогена, значения гидродинамического диаметра для которых (до и после окисления) измеряли с помощью Zetasizer Nano-S (Malvern, Англия).

Термодинамические параметры денатурации плазминогена (3,0 мг/мл) определяли до и после окисления (3,0; 6,25; 12,5 и 25,0 мкмоль NaOCl/ОCl на 1 мг плазминогена; 1 час при +37 °С) методом высокочувствительной дифференциальной сканирующей калориметрии на микрокалориметре ДАСМ-4 (Пушино, Россия). Для деконволюции термограмм использовали программу Peak Fit (AISN Software Incorporated, версия 4).

Восстановление дисульфидных связей в белке проводили с помощью 5 мМ дитиотреитола с последующей блокировкой свободных сульфгидрильных групп 10 мМ йодацетамидом. Трипсиновый протеолиз инициировали растворением образцов в 50 мМ трис-НСl буфере, 0,15 М NaCl (pH 8,0). Трипсиновые гидролизаты анализировали методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) на системе Agilent 1100 (Agilent Technologies, США), совмещенной с масс-спектрометром высокого разрешения 7T LTQ-FT Ultra (Thermo, Германия). Пептидные фракции разделяли на колонке C18 (75 мкм × 12 см, Reprosil-Pur Basic C18, 3 мкм; Dr. Maisch HPLC GmbH, Германия).

Идентификацию триптических пептидов плазминогена осуществляли с помощью программы PEAKS Studio (версия 8.5, Bioinformatics Solutions Inc., Канада), путем поиска по базе данных UniProtKB (UP000005640–9606, Homo sapiens). В параметрах алгоритма задавали специфичность трипсина с допущением одного неспецифического расщепления. Точность измерения массы иона-предшественника составляла 15 ppm, а для фрагментов МС/МС — 0,05 Да. Уровень ложноположительных результатов (false discovery rate, FDR) для пептидов не превышал 0,1%.

При анализе модификаций допускали наличие до трех возможных переменных посттрансляционных модификаций (ПТМ) на один пептид согласно ранее опубликованным рекомендациям. Степень окислительной модификации (%) каждого аминокислотного остатка рассчитывали как отношение площади пика окисленного пептида к суммарной площади всех форм (окисленных и нативных), содержащих данный остаток. Аминокислоту считали модифицированной при условии увеличения уровня её окисления не менее чем на 1% относительно контрольной группы.

Глава 3 посвящена описанию полученных результатов и их обсуждению.

Активность плазмينا, образованного из окисленного плазминогена.

Активность плазмينا, образованного из нативного плазминогена, была принята за 100% (Рисунок 1). Обработка плазминогена 25 мкМ гипохлорита натрия или 100 мкМ перекиси водорода оказывала минимальное влияние на активность образовавшегося плазмينا, которая составляла 97 ± 7 % и 92 ± 8 %, соответственно. Окисление образцов 300 мкМ H_2O_2 снижало активность плазмينا более существенно, до 78 ± 7 %. Ещё более выраженным эффект оказался при окислении плазминогена 50 мкМ и 100 мкМ гипохлоритом натрия со снижением активности плазмينا до 64 ± 5 % и 31 ± 3 %, соответственно.

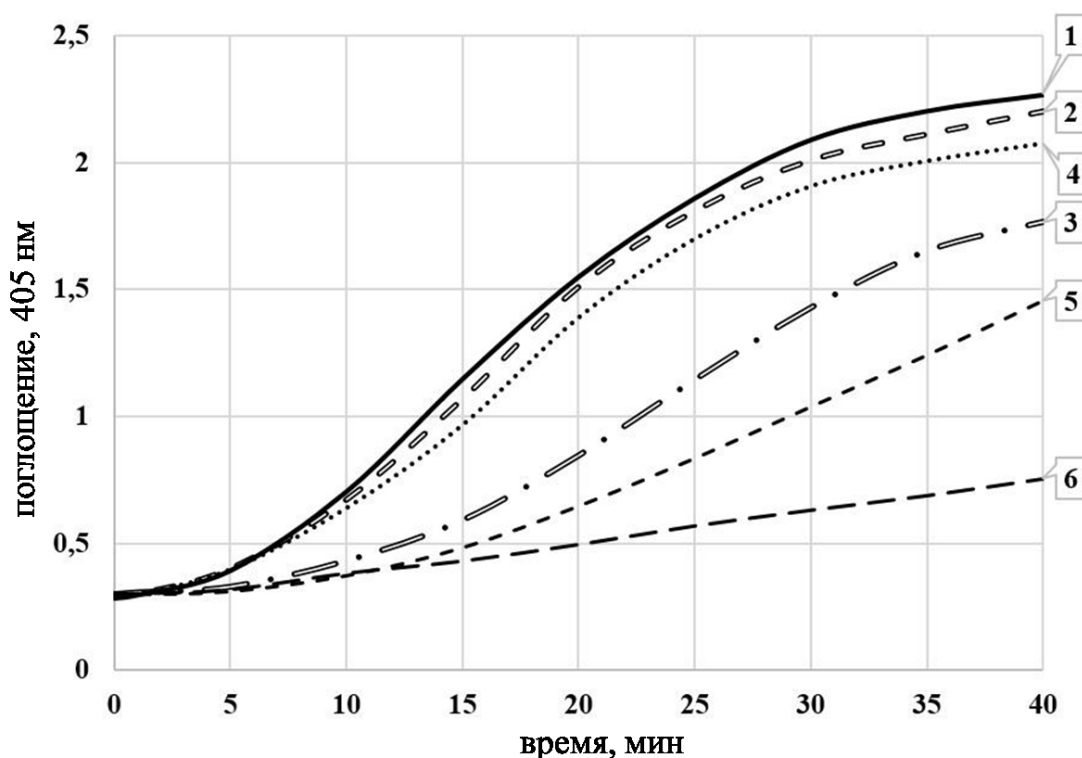


Рисунок 1 – Сравнение амидолитической активности плазмينا, образующегося из нативного ПГ (кривая 1) и ПГ, обработанного окислителями: 2 – 100 мкМ H_2O_2 , 3 – 300 мкМ H_2O_2 , 4, 5 и 6 – 25, 50 и 100 мкМ $NaOCl/OCl$, соответственно

Гидролиз фибриногена опосредованный плазмином приводил к накоплению продуктов деградации фибриногена, фрагментов X, Y, D и E. Окисление плазминогена минимальными концентрациями окислителей (25 мкМ $NaOCl/OCl$ и 100 мкМ H_2O_2) незначительно влияло на их накопление (Рисунок 2, дорожки 8 и 5), по сравнению с контрольным неокисленным образцом (дорожка 3). Однако при увеличении концентрации окислителей (дорожки 4, 6 и 7) становилось заметным уменьшение количества продуктов поздней деградации фибриногена (фрагментов D и E) и увеличение доли продуктов ранней деградации (фрагментов X и Y), что отражало снижение активности плазмينا. Кроме того, при высоких концентрациях окислителей сохранялось больше нативного фибриногена.

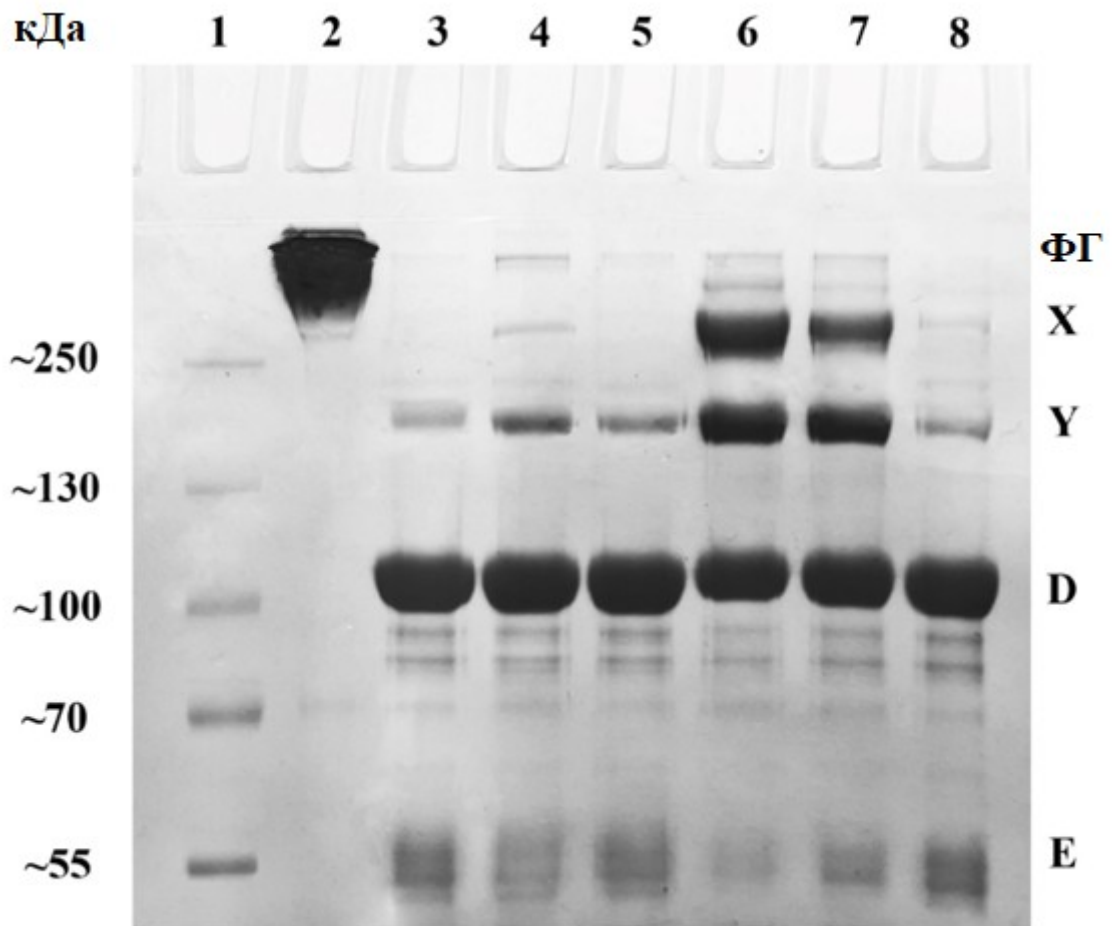


Рисунок 2 – Результаты SDS-ПААГ продуктов деградации фибриногена (5 % концентрирующий гель, 8 % разделяющий гель) в реакции с плазмином, полученным из нативного и окисленного ПГ. Дорожка 1 – маркерные белки; 2 – нативный фибриноген; 3–8 – продукты деградации фибриногена плазмином образованном из: нативного ПГ (3) и ПГ, обработанного 300 и 100 мкМ H_2O_2 (4 и 5), либо 100, 50 и 25 мкМ $NaOCl/OCl$ (6–8), соответственно

Масс-спектрометрический анализ окислительных модификаций плазминогена. В работе исследовалось влияние $NaOCl/OCl$ и H_2O_2 на плазминоген. Масс-спектрометрический анализ выявил увеличение содержания (площади пиков) окисленных пептидов и уменьшение содержания неокисленных пептидов для плазминогена после воздействия окислителями. Анализ показал, что в окислительную модификацию было вовлечено до 22 аминокислотных остатков.

В контрольном образце только Met182 и Met404 подвергались окислительной модификации до сульфоксида метионина (Таблица 1). После обработки плазминогена 25 мкМ $NaOCl/OCl$ число окисленных остатков возросло до 5-ти метионинов (Met57, Met182, Met385, Met404, Met788) и 1-го триптофана (Trp523). При увеличении концентрации окислителя до 50 мкМ в окислительную модификацию вовлекались некоторые аминокислотные остатки тирозина (Tyr80, Tyr397, Tyr672), а также дополнительные остатки метионина и триптофана; ещё дополнительные остатки триптофана и тирозина модифицировались при 100 мкМ окислителе (Таблица 1). Степень окисления обнаруженных аминокислотных

остатков возрастала при увеличении концентрации гипохлорита натрия.

При взаимодействии плазминогена со 100 мкМ H_2O_2 в окисление вовлеклось 6 остатков метионина и 5 – триптофана. Повышение концентрации перекиси до 300 мкМ привело к модификации всего двух дополнительных остатков, однако у остальных возросла степень окисления.

Обработка плазминогена 25 мкМ NaOCl/OCl или 100 мкМ H_2O_2 не повлияла на функциональную активность полученного из него плазмина. Результаты МС анализа показывают, что при таких (относительно низких 25 мкМ NaOCl/OCl или 100 мкМ H_2O_2) концентрациях окислителей в модификацию вовлекаются остатки метионина: Met57, Met182, Met385, Met404 и Met788. Это позволяет предположить, что модифицированные в таких окислительных условиях аминокислотные остатки метионина, обеспечивают антиоксидантную защиту белка. Эти остатки, вероятно, реагируют с окислителями и не участвуют непосредственно в связывании белка с субстратом или в его каталитической активности.

Тот факт, что Met585 остался неокисленным в плазминогене, обработанном 25 мкМ NaOCl/OCl , но легко окислялся как 50 и 100 мкМ NaOCl/OCl , так и 100 и 300 мкМ H_2O_2 , также позволяет предположить, что этот остаток обладает антиоксидантной активностью. Вероятнее всего, этот остаток, изначально находящийся внутри белковой глобулы, в результате модификации более доступных метионинов мигрирует в гидрофильную область, становясь, таким образом, пространственно доступным для окислителей. В некоторой степени это также можно отнести к остатку Met463. Во всем диапазоне концентраций NaOCl/OCl этот остаток оставался не модифицированным и окислялся только при обработке плазминогена 300 мкМ H_2O_2 .

Полученные результаты показывают, что окислительная модификация отдельных остатков метионина, вызванная NaOCl/OCl или H_2O_2 , не связана напрямую с их доступностью для окислителя, что предполагает изменения в третичной структуре плазминогена, инициированные окислением.

Механизм снижения биологической активности плазминогена под воздействием повышенных концентраций окислителей (50, 100 мкМ NaOCl/OCl и 300 мкМ H_2O_2) может быть связан с некоторыми из обнаруженных модификаций в ароматических аминокислотных остатках. Известно, что Trp235 участвует в образовании солевого мостика между LBS в KR2 и SP-доменом. Tyr672 расположен в петле Tyr672–Thr678 SP-домена, которая вместе с петлей Pro703–Tyr713 также образует обширные взаимодействия с доменом KR2. Остатки Trp417 и Trp427 расположены в гидрофобном центре LBS KR4, и их окисление может сильно влиять на способность KR4 связываться с субстратом. Trp761 является одним из консервативных остатков сайта S2, ответственного за связывание субстрата.

Ни один из 38 остатков лизина в плазминогене не подвергался окислительной модификации несмотря на то, что их аминогруппы легко образуют хлораминные промежуточные соединения при реакции с NaOCl/OCl . Можно

предположить, что их структурная целостность в плазминогене может быть связана с антиоксидантными остатками метионина, способными перехватывать молекулы окислителя.

Таблица 1 – Тип и степень модификации аминокислотных остатков в первичной структуре плазминогена

АО	Тип модификации	0 мкМ	NaOCl/OCI			H ₂ O ₂	
			25 мкМ	50 мкМ	100 мкМ	100 мкМ	300 мкМ
Met57	Окисление	0	22±5,5	97±2,1	100±1	69±7	88±3,2
Tyr80	Хлорирование	0	0	9±2	25±6,1	0	0
Trp108	Окисление до оксииндоаланина	0	0	0	2±0,5	21±2,2	23±3
	Карбоксилирование	0	0	0	0	6±2,4	4±0,5
Met182	Окисление	3±1,1	20±6	100±3,2	100±1	61±13,5	96±2,6
Trp190	Окисление до оксииндоаланина	0	0	16±4,3	21±2	0	0
Trp235	Окисление до оксииндоаланина	0	0	18±3,3	20±3	10±2,5	15±2
	Окисление до оксолактона	0	0	0	11±4	0	0
	Окисление до формилкинуруенина	0	0	6±2	3±2	58±5,8	74±7
Tyr304	Хлорирование	0	0	0	2±0,5	0	0
Trp325	Окисление до оксииндоаланина	0	0	4±0,6	5±2	0	0
Trp382	Окисление до формилкинуруенина	0	0	0	0	0	6
Met385	Окисление	0	13±0,7	56±4,7	100±0,5	42±11	87±7
Tyr397	Хлорирование	0	0	3±0,5	8±2	0	0
Met404	Окисление	10±0,8	14±2,2	99±4	100±0,3	84±1	99±2
Trp417	Окисление до оксииндоаланина	0	0	6±2	6±1	0	34±4
Trp427	Окисление до оксииндоаланина	0	0	0	0	56±14,7	70±6,2
Met463	Окисление	0	0	0	0	0	100±1
Trp486	Окисление до оксииндоаланина	0	0	4±2,2	11±3,1	0	0
Trp523	Окисление до оксииндоаланина	0	10±2	66±4	81±1	0	0
Met585	Окисление	0	0	84±3	100±0,3	96±4,9	100±1
Tyr672	Хлорирование	0	0	3±0,5	3±0,5	0	0
Trp685	Окисление до оксииндоаланина	0	0	1±0,2	13±3,2	0	0
	Окисление до кинуруенина	0	0	3±1	14±2	0	0

	Окисление до формилкинурины	0	0	0	37±4,2	0	0
Trp761	Окисление до оксииндоаланина	0	0	5±2,2	17±2	0	0
	Окисление до оксолактона	0	0	2±2,8	16±1	0	0
	Окисление до формилкинурины	0	0	0	3±1	0	0
Met788	Окисление	0	6±2.1	99±0,3	99±0,7	32±6	86±1

Результаты дифференциальной сканирующей калориметрии. При обработке плазминогена гипохлоритом натрия наблюдается снижение общей молярной энтальпии денатурации (Таблица 2). Температура первого перехода с ростом концентрации окислителя незначительно понижается, тогда как температуры второго и третьего переходов снижаются сильнее.

Таблица 2 – Термодинамические параметры денатурации контрольного и обработанных NaOCl/OCl образцов плазминогена

Концентрация окислителя, мкМ	ΔH , кДж/Моль	T_1 , °C	T_2 , °C	T_3 , °C
0	1,48±0.13	56,8	65,0	75,0
6,25	1,25±0.13	56,5	64,4	74,2
12,5	1,02±0.11	56,4	64,2	73,4
25,0	0,78±0.13	56,2	63,7	73,1

Хотя температура низкотемпературного перехода практически не изменяется при увеличении концентрации гипохлорита, доля его молярной энтальпии в общей энтальпии денатурации снижается (Таблица 3).

Для второго перехода наблюдается снижение как температуры, так и доли молярной энтальпии по сравнению с контрольным образцом (Таблица 3).

Температура третьего перехода при окислении существенно снижается, однако доля его молярной энтальпии в общей энтальпии денатурации возрастает. При этом значение энтальпии денатурации для этого перехода незначительно уменьшается при концентрации гипохлорита натрия 6,25 мкМ по сравнению с контролем, а дальнейшее повышение концентрации окислителя не оказывает существенного влияния на этот параметр (Таблица 3).

Выраженное снижение энтальпии денатурации пика, показывающего плавление крингл-доменов KR4 и KR5, а также NTP (пик T2), соответствует результатам ВЭЖХ-МС/МС по окислительным модификациям аминокислотных остатков ПГ, окисленного гипохлоритом натрия. Наиболее подверженным окислительным модификациям является крингл-домен 4, где были детектированы следующие окисленные аминокислотные остатки: Met385, Tyr397, Met404 и Trp417. В соседнем домене KR5 найдены два окисленных аминокислотных остатка

триптофана — на позициях 486 и 523. Для N-терминального пептида отмечен один окисленный остаток метионина (Met57).

Таблица 3 – Результаты деконволюции термограмм денатурации контрольного образца плазминогена и образцов, обработанных NaOCl/OCI

Концентрация окислителя, мкМ	Низкотемпературный переход			Второй температурный переход			Высокотемпературный переход		
	T ₁ , °C	α_1 , %	ΔH_1 , кДж/М	T ₂ , °C	α_2 , %	ΔH_2 , кДж/М	T ₃ , °C	α_3 , %	ΔH_3 , кДж/М
0	56.8	32.0	0.46	65.0	46.6	0.69	75.0	21.4	0.33
6,25	56.5	31.3	0.40	64.4	45.7	0.57	74.2	23.0	0.30
12,5	56.4	28.5	0.29	64.2	44.4	0.45	73.4	27.1	0.28
25,0	56.2	23.1	0.19	63.7	41.3	0.32	73.1	35.6	0.27

Уменьшение доли молярной энтальпии низкотемпературного пика, показывающего плавление первых трех крингл-доменов (KR1-KR3), менее значительное, чем у пика T₂. Окисленные аминокислотные остатки были детектированы в каждом из этих доменов: в KR1 обнаружены окисленные Tyr80 и Trp108, в KR2 были подвержены модификации аминокислотные остатки Met182, Trp190, Trp235, а в KR3 окисленными оказались остатки Tyr304 и Trp325. Следует отметить, что локализованный в KR2 Trp235 участвует во взаимодействии между различными доменами молекулы плазминогена, поддерживая её закрытую конформацию.

Вклад доли молярной энтальпии высокотемпературного пика (T₃), показывающего плавление SP-домена, увеличивается относительно общей энтальпии денатурации. Это свидетельствует об относительной устойчивости SP-домена к термической денатурации даже при его окислении. SP-домен критически важен для ферментативной активности плазминогена благодаря наличию каталитической триады (His603, Asp646 и Ser741). Среди окисленных аминокислотных остатков в этом домене обнаруживаются Met585, Tyr672, Trp685, Trp761 и Met788. Tyr672 аналогично Trp235 влияет на конформацию ПГ, участвуя в междоменных взаимодействиях.

Активность комплекса плазминогена со стрептокиназой при окислении.

При гидролизе фибриногена комплексом ПГ-СК происходит накопление продуктов деградации фибриногена – фрагментов X, Y, D и E. Электрофоретический анализ показал, что окисление комплекса ПГ-СК гипохлоритом натрия (NaOCl/OCI) в низких концентрациях (25 и 50 мкМ; Рисунок 3, дорожки 5 и 6) практически не влияет на накопление продуктов деградации фибриногена по сравнению с

контролем (дорожка 4).

Однако при повышении концентрации окислителя до 100 мкМ наблюдается снижение активности комплекса ПГ-СК. Это выражается в уменьшении накопления поздних продукта деградации фибриногена (фрагмента D и E) при одновременном росте пула ранних продуктов деградации – фрагментов X и Y.

Максимальная протеолитическая активность наблюдается у комплекса ПГ-СК, не подверженному последующей двухчасовой инкубации (дорожка 3), что указывает на слабовыраженный процесс автокатализа белковых молекул.

Эти наблюдения согласуются с ранее полученными данными о гидролизе фибриногена плазмином, который был получен из окисленного предшественника – плазминогена.

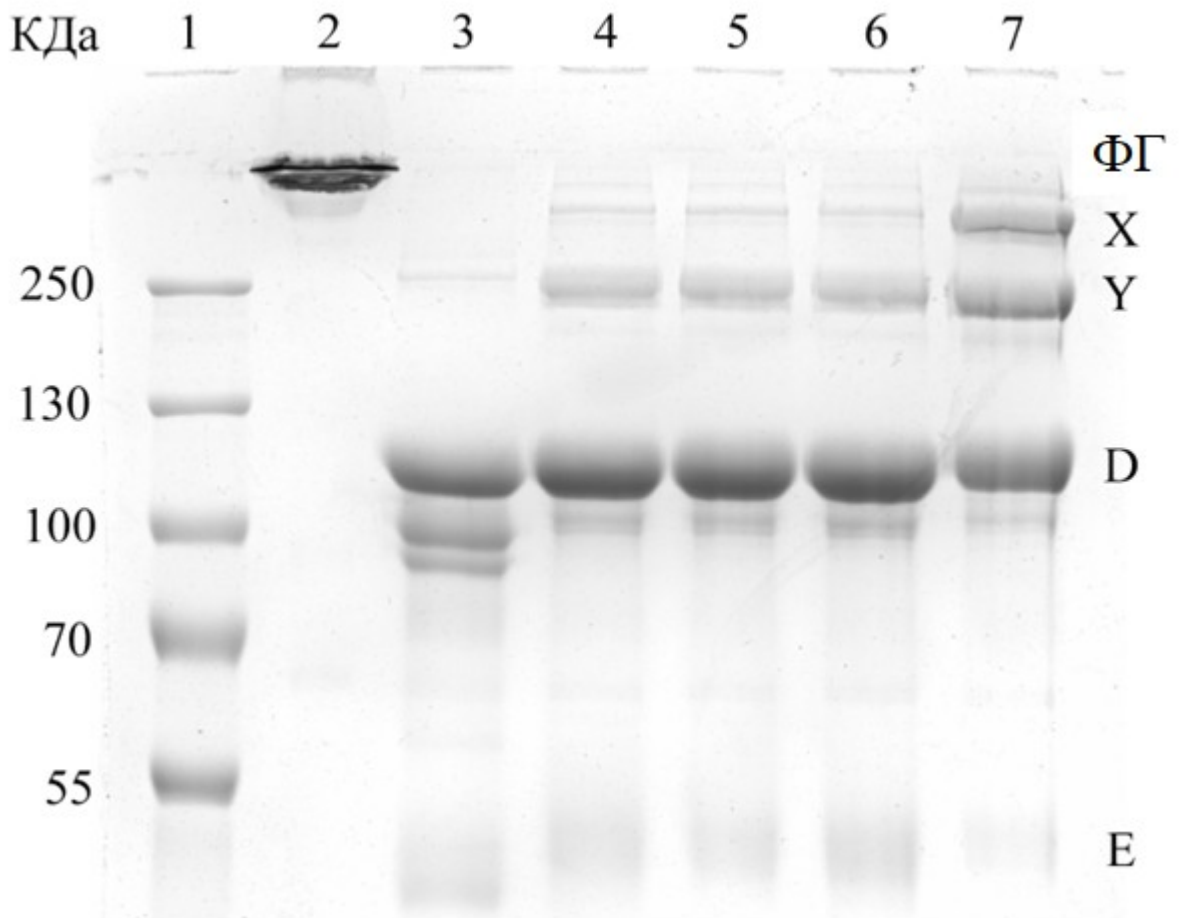


Рисунок 3 – Результаты SDS-ПААГ продуктов деградации фибриногена (5% концентрирующий гель, 8% разделяющий гель), полученных под воздействием нативного и окисленного комплекса ПГ-СК. Дорожка 1 – маркерные белки; 2 – нативный фибриноген; 3 – продукты деградации фибриногена, продуцируемые только что активированным комплексом ПГ-СК; 4-7 – продукты деградации фибриногена, продуцируемые комплексом ПГ-СК, окисленным 0, 25, 50 и 100 мкМ NaOCl/OCI

Масс-спектрометрический анализ плазминогена в комплексе со стрептокиназой. Методом ВЭЖХ-МС/МС были исследованы образцы нативного и окисленного плазминогена в комплексе со стрептокиназой. В неокисленном (контрольном) комплексе ПГ-СК были выявлены модифицированные остатки

метионина (Met57, Met182, Met404, Met585, Met788) и триптофана (Trp523, Trp685): уровень модификации Met57 оказался самым высоким и составил около 70%, остальные метионины были окислены на уровне ~10% (каждый); уровень окисления остатков триптофана был совсем незначительным (Таблица 4).

В результате воздействия 50 мкМ NaOCl/OCl в комплексе ПГ-СК были выявлены модифицированные остатки метионина (Met57, Met182, Met385, Met404, Met585, Met788), триптофана (Trp325, Trp523, Trp685, Trp761) и тирозина (Tyr80, Tyr397). Наиболее распространёнными вариантами модификаций оказались образование метионин-сульфоксида (+15.99) и хлорированного тирозина (+33.96). Для триптофана чаще идентифицировались окисление до оксолактона (+13.98), диоксииндоаланина (+31.99) и оксииндоаланина (+15.99) (Таблица 4).

При 100 мкМ NaOCl/OCl степень модификации остатков увеличивалась, а также появлялись новые формы окисления среди уже затронутых остатков и новые модификации: окисление лизина (Lys78) до аминокадипинового полуальдегида (-1.03), хлорирование тирозина (Tyr132, Tyr304 и Tyr672), окисление (+15.99) пролина (Pro224) и аспарагиновой кислоты (Asp485).

Наибольшее количество модифицированных остатков было детектировано преимущественно в SP-доме и, в меньшей степени, в KR2 доме; уровень окисления KR3 был наименьшим.

В комплексе ПГ-СК детектируется большее количество сайтов окисления по сравнению со свободным плазминогеном. Это, вероятно, связано с тем, что при образовании комплекса конформация плазминогена становится более открытой из-за нарушения междоменных контактов, в том числе между NTP и крингл-доменами 4 и 5. В результате ранее недоступные аминокислотные остатки становятся доступными для NaOCl/OCl, что может объяснить появление новых сайтов окислительной модификации.

При обработке комплекса ПГ-СК 50 мкМ NaOCl/OCl количество детектированных модифицированных аминокислотных остатков примерно такое же, как и в свободном плазминогене, однако процент модификации отдельных остатков (например, Tyr80, Trp685, Trp761) оказывается выше, чем в плазминогене, обработанном 100 мкМ NaOCl/OCl. Между тем, в последнем случае в комплексе ПГ-СК наблюдается более выраженное окисление Trp235 и Trp523, а также появляются новые модифицированные остатки (Lys78, Pro224, Asp485), которые не окисляются в свободном плазминогене.

Стоит отметить, что в комплексе ПГ-СК остаток Met57 значительно окислен даже в контрольном образце. Это может быть связано с изменением конформации белка при образовании комплекса из-за нарушения взаимодействия между NTP и KR5, что делает аминокислотные остатки NTP, включая Met57, более доступными для окислителя.

Единственным аминокислотным остатком, который в плазминогене окислен сильнее, чем в комплексе ПГ-СК, является Met385 (дом KR4), что также может быть связано с конформационными особенностями.

Наибольшее повышение уровня окислительных модификаций при повышении концентрации $\text{NaOCl}/\text{OCl}^-$ наблюдаются в SP-домене, особенно в остатках Trp685 и Trp761. Известно, что в плазминогене Trp761 блокирует доступ к сайту связывания субстрата S2 и активному центру, предотвращая активность плазминогена, в отличие от плазмина, где конформационные изменения открывают этот сайт и активный центр. Аналогично, в комплексе ПГ-СК изменение конформации SP-домена приводит к изменению положения Trp761, делая активный центр и сайт S2 доступными и обеспечивая, таким образом, ферментативную активность комплекса.

Сравнение 3D структур SP-домена ПГ и комплекса ПГ-СК показало, что аминокислотные остатки Trp761 и Trp685, а также Met585 становятся более доступными для окислителя в комплексе (Рисунок 4), что также подтверждается МС данными (Таблица 1 и Таблица 4).

Несмотря на значительно больший уровень окисления SP-домена комплекса ПГ-СК снижение активности плазминогена при его окислении в комплексе со стрептокиназой примерно такое же, как снижение активности плазмина, образованного из окисленного плазминогена. Вероятно, наиболее подверженные окислению остатки в SP-домене комплекса ПГ-СК могут выступать в роли «ловушек» для окислителя, защищая, таким образом, открытый каталитический сайт от окисления. Это позволяет предположить, что ключевую роль в нарушении функциональной активности плазминогена играют окислительные модификации аминокислотных остатков, расположенных в крингл-доменах.

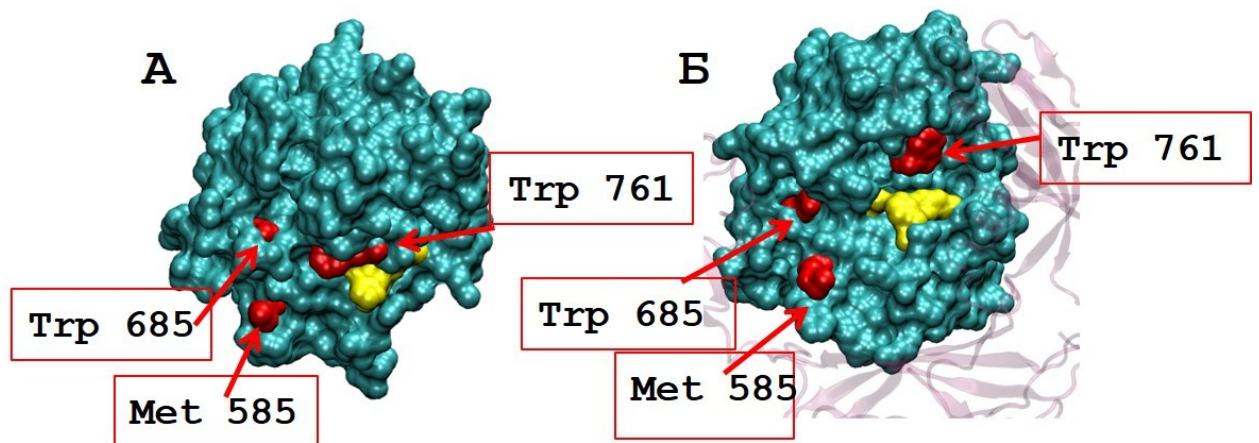


Рисунок 4 – Сравнение экспонированных областей SP-домена (А) свободного ПГ и (Б) ПГ в комплексе со стрептокиназой (PDB ID: 1BML). Зеленым цветом показан SP-домен ПГ; прозрачным розовым – стрептокиназа; желтым цветом выделена каталитическая триада; красным – показаны окисленные аминокислотные остатки

Таблица 4 – Типы и уровни модификаций аминокислотных остатков в комплексе ПГ-СК

АО	Тип модификации	NaOCl/OCl		
		0 кММ	50 кММ	100 кММ
Met57	Окисление	70 ±3	100 ±2,8	100 ±2
Lys78	Окисление до аминокетонадиного полуальдегида	0	0	6 ±0,5
Tyr80	Хлорирование	0	16 ±3	25 ±2
Tyr132	Хлорирование	0	0	1 ±0,5
Met182	Окисление	4 ±1	98 ±7,3	100 ±5,9
Trp190	Окисление до оксииндоаланина	0	0	7 ±1,4
Pro224	Окисление	0	0	17 ±2
Arg234	Окисление	0	0	1 ±0,1
Trp235	Окисление до оксолактона	0	0	11 ±0,7
	Окисление до оксииндоаланина	0	4 ±1	20 ±3,4
	Окисление до диоксииндоаланина	0	0	3 ±0,7
Tyr304	Хлорирование	0	0	2 ±0,3
Trp325	Окисление до оксииндоаланина	0	2 ±1	4 ±0,8
Met385	Окисление	0	12 ±2,8	12 ±2
Tyr397	Хлорирование	0	1 ±1	3 ±0,7
Met404	Окисление	12 ±3,1	97 ±4,9	100 ±8
Trp417	Окисление до оксииндоаланина	0	0	1 ±0,4
Asp485	Окисление	0	0	3 ±1
Trp486	Окисление до оксииндоаланина	0	0	5 ±1
Trp523	Окисление до оксииндоаланина	1 ±0,2	8 ±2	81 ±3,6
Met585	Окисление	8 ±2,1	100 ±5,5	100 ±5,2
Tyr672	Хлорирование	0	0	2 ±1

Trp685	Окисление до оксииндоаланина	0	11 ±1	13 ±1,4
	Окисление до кинуренина	1 ±1	2 ±0,2	1 ±0,1
	Окисление до диоксииндоаланина	0	21 ±3	37 ±3,2
Trp761	Окисление до оксолактона	0	2 ±0,5	16 ±1
	Окисление до оксииндоаланина	0	4 ±1,6	17 ±2,2
	Окисление до диоксииндоаланина	0	0	3 ±0,9
Met788	Окисление	5 ±1,1	97 ±5,2	99 ±6,4

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молекула плазминогена проявляет устойчивость к умеренному окислительному воздействию без существенной потери функциональной активности при индуцированном окислении гипохлоритом натрия и пероксидом водорода. При минимальных концентрациях окислителей (25 мкМ NaOCl/OC1 или 100 мкМ H₂O₂) статистически значимого снижения амидолитической активности не зарегистрировано, однако остатки метионина (Met57, Met182, Met385, Met404, Met788) вовлекаются в окислительную модификацию, что позволяет рассматривать их в качестве внутримолекулярных перехватчиков активных форм кислорода, обеспечивающих защиту функционально значимых сайтов. При увеличении концентрации окислителей до 100 мкМ NaOCl/OC1 или 300 мкМ H₂O₂ окисление метиониновых остатков до метионинсульфоксида сопровождается повышением полярности и снижением липофильности боковых цепей, что может инициировать локальные конформационные перестройки полипептидной цепи и повышать доступность отдельных сайтов для окислителя. Указанные перестройки, по-видимому, носят кооперативный характер и способны приводить к дестабилизации молекулы и снижению её функциональной активности.

При повышении концентрации окислителей до 50–100 мкМ NaOCl/OC1 и 300 мкМ H₂O₂ наблюдаются окислительные модификации критически важных ароматических аминокислотных остатков (Trp235, Trp672, Trp417, Trp427, Trp761, а также Arg234), преимущественно локализованных в крингл-доменах. Нарушение индольной системы триптофана, нейтрализация положительного заряда аргинина и разрушение солевых мостиков между крингл-доменами и SP-доменом также приводят к конформационным перестройкам белка и нарушению его функций.

Данные дифференциальной сканирующей калориметрии согласуются с результатами масс-спектрометрии. По результатам ДСК видно, что при окислении ПГ гипохлоритом натрия общая энтальпия молекулы уменьшается, что свидетельствует о дестабилизации белка. Доля вкладов в общую энтальпию пиков T1 и T2 уменьшается, однако вклад пика T3 растёт. Это говорит о том, что сериновый протеазный домен, плавление которого показывает пик T3, в отличие от крингл-доменов (пики T1 и T2), оказывается достаточно устойчивым к

воздействию окислителя.

Таким образом, потеря функциональной активности плазминогена при окислительном стрессе, вероятно, связана с модификациями аминокислотных остатков крингл-доменов.

Активность плазминогена, находящегося в комплексе со стрептокиназой при минимальных концентрациях окислителя демонстрирует незначительное снижение по сравнению с контролем. При увеличении концентрации окислителя активность комплекса снижается более значительно. Однако, в среднем, эти данные схожи с данными об изменении активности плазмина, образованного из окисленного плазминогена. По сравнению со свободным плазминогеном комплекс ПГ-СК имеет повышенную чувствительность к воздействию окислителя, причем наиболее сильно окислению подвержен сериновый протеазный домен. Вероятнее всего это происходит из-за более открытой конформации молекулы плазминогена, находящегося в комплексе. Такая конформация объясняется нарушением взаимодействий между доменами плазминогена, в первую очередь между NTP и KR5. Это информация дополнительно подтверждает предположение о том, что первопричиной нарушения функциональной активности белка являются окислительные модификации остатков в крингл-доменах.

Таким образом, можно предположить, что снижение активности плазминогена обусловлено окислением его крингл-доменов и нарушением их способности связываться с субстратом. Окисленные аминокислотные остатки, детектируемые в SP-домене, незначительно влияют на функционирование белка и, вероятно, также, как и остатки метионина, могут выполнять функцию ловушек для активных форм кислорода, защищая каталитическую триаду.

ВЫВОДЫ

1. Методами колориметрии и электрофореза в ПААГ было установлено, что при окислении ПГ гипохлоритом натрия или перекисью водорода функциональная активность образованного из него плазмина незначительно снижалась при 25 мкМ и 100 мкМ соответственно. Наиболее существенное снижение активности наблюдалось при 100 мкМ NaOCl/OCI и 300 мкМ H₂O₂.

2. Методом ВЭЖХ-МС/МС установлено, что окисление плазминогена H₂O₂ и NaOCl/OCI преимущественно затрагивает остатки Met и Trp, а воздействие NaOCl/OCI дополнительно модифицирует Tug. Степень окисления плазминогена при действии гипохлорита натрия в среднем выше, чем при окислении перекисью водорода. Для обоих окислителей степень модификации возрастает с увеличением их концентрации. Несмотря на больший размер SP-домена, нормирование по количеству аминокислот показало максимальную частоту модификаций в домене KR4.

3. Окисление плазминогена гипохлоритом приводит к снижению энтальпии его термической денатурации, что свидетельствует о дестабилизации структуры белка. Наиболее чувствительными к окислению оказались домены KR4, KR5 и NTP. При этом SP-домен проявляет большую устойчивость к окислению.

4. Комплекс ПГ-СК более подвержен окислительной модификации, чем ПГ, что выражается в возникновении новых сайтов окисления, появлении других типов модификаций уже окисленных аминокислотных остатков и к повышению уровня модификаций в конкретном сайте.

5. Закрытая конформация молекулы ПГ делает функционально значимые аминокислотные остатки, менее доступными для окислителя. В комплексе ПГ-СК остатки метионина и триптофана в SP-доме также выполняют функцию перехватчиков АФК и защищают каталитическую триаду молекулы. Эти факторы обеспечивают ограниченную резистентность плазминогена к воздействию окислителя.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:

1. Vasilyeva, A. The effect of hypochlorite- and peroxide-induced oxidation of plasminogen on damage to the structure and biological activity / Vasilyeva A., Yurina L., Ivanov V., Azarova D., Gavrilina E., Indeykina M., Bugrova A., Rosenfeld M., Kononikhin A., Nikolaev E. // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2022. – Vol. 206. – P. 64–73. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.02.128

2. Rosenfeld, M.A. Post-translational oxidative modifications of hemostasis proteins: structure, function, and regulation / Rosenfeld M.A., Yurina L.V., Gavrilina E.S., Vasilyeva A.D. // *Biochemistry*. – 2024. – Vol. 89, № S1. – P. 14–33. doi: 10.1134/S0006297924140025.

3. Вассерман, Л.А. Исследование термической денатурации молекулы плазминогена при индуцированном окислении / Вассерман Л.А., Гаврилина Е.С., Юрина Л.В., Васильева А.Д., Розенфельд М.А. // *Химическая физика*. – 2024. – Т. 43, № 11. – С. 39–46. doi: 10.31857/S0207401X24110058

4. Гаврилина, Е.С. Влияние индуцированного гипохлоритом окисления на структуру и функциональную активность комплекса плазминоген-стрептокиназа / Е.С. Гаврилина, А.И. Модин, А.Д. Васильева, Л.В. Юрина, А.Е. Бугрова, М.И. Индейкина, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Розенфельд // *Химическая физика*. – 2026. – Т. 45, № 10. – С. 36–49. doi: 10.7868/S3034612626100040

Тезисы докладов на конференциях:

1. Васильева, А.Д. Влияние гипохлорит и пероксидиндуцированного окисления плазминогена на повреждение структуры и биологическую активность / А.Д. Васильева, Л.В. Юрина, Д.Ю. Азарова, Е.С. Гаврилина, В.С. Иванов, М.И. Индейкина, А.Е. Бугрова, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Розенфельд //

Сборник тезисов докладов IX Всероссийской научной молодежной школы-конференции «Химия, физика, биология: пути интеграции». – 2022. – С. 31.

2. Гаврилина, Е.С. Исследование влияния окислительной модификации на структуру и функциональную активность плазминогена / Е.С. Гаврилина, А.Д. Васильева, Л.В. Юрина, В.С. Иванов, Д.Ю. Гусарова, М.И. Индейкина, А.Е. Бугрова, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Розенфельд // Труды XXII Ежегодная молодежная конференция с международным участием «биохимическая физика» ИБХФ РАН-ВУЗЫ. – 2022. – С. 47-50.

3. Васильева, А.Д. Исследование возможного влияния окислительной модификации на структуру и функциональную активность плазминогена / А.Д. Васильева, Е.С. Гаврилина, Л.В. Юрина, В.С. Иванов, Д.Ю. Гусарова, М.И. Индейкина, А.Е. Бугрова, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Розенфельд. // Специальный выпуск «Системная биология и физиология». – 2022. – С. 6.

4. Гаврилина, Е.С. Исследование влияния окислительной модификации на структуру и функциональную активность плазминогена / А.Д. Васильева, Л.В. Юрина, В.С. Иванов, М.И. Индейкина, А.Е. Бугрова, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Розенфельд // Тезисы докладов 13-ой Международной научной конференции «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения». – 2023. – С. 58. DOI 10.25998/msl.2023.78.95.001

5. Gavrilina, E.S. Investigation of the effect of oxidative modification on the structure and functional activity of plasminogen / E.S. Gavrilina, A.D. Vasil'eva, V.S. Ivanov, L.V. Yurina, M.I. Indeykina, A.S. Kononikhin, E.N. Nikolaev, M.A. Rosenfeld // Second Moscow International Conference on Multi-omics Technologies for Precision Medicine. – 2023.

6. Гаврилина, Е.С. Влияние гипохлорит-индуцированного окисления плазминогена на его структуру и термодинамические свойства / Е.С. Гаврилина, А.Д. Васильева, Л.В. Юрина, В.С. Иванов, Л.А. Вассерман, М.И. Индейкина, А.Е. Бугрова, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Розенфельд // Труды XXIII Ежегодной молодежной конференции с международным участием «биохимическая физика» ИБХФ РАН-ВУЗЫ. – 2024. – С. 22-23.

7. Гаврилина, Е.С. Исследование влияния окислительной модификации плазминогена и плазмينا / Е.С. Гаврилина, А.Д. Васильева, Л.В. Юрина, М.И. Индейкина, А.Е. Бугрова, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Розенфельд // Труды XXIII Ежегодной молодежной конференции с международным участием «биохимическая физика» ИБХФ РАН-ВУЗЫ. – 2024. – С. 112-114.

8. Модин, А.И. Исследование индуцированных гипохлоритом посттрансляционных модификаций плазмينا / А.И. Модин, М.А. Соболева, А.Д. Васильева, Л.В. Юрина, Е.С. Гаврилина, М.И. Индейкина, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Розенфельд // Труды XXIII Ежегодной молодежной конференции с международным участием «биохимическая физика» ИБХФ РАН-ВУЗЫ. – 2025. – С. 195-198.

9. Модин, А.И. Исследование пост-трансляционных модификаций плазмينا при индуцированном окислении / А.И. Модин, М.А. Соболева, А.Д. Васильева, Л.В. Юрина, Е.С. Гаврилина, М.И. Индейкина, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Розенфельд // Труды Всероссийской научно-практической конференции «Экспериментальная медицина». – 2025. – С. 126.