

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.03.01 Биология
Профиль подготовки Биохимия
Форма обучения очная

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

на тему:

**«ИССЛЕДОВАНИЕ ИНДУЦИРОВАННОГО ГИПОХЛОРИТОМ
ОКИСЛЕНИЯ ПЛАЗМИНОГЕНА МЕТОДОМ ТАНДЕМНОЙ МАСС-
СПЕКТРОМЕТРИИ»**

Студент  Акжигитова Карина Ирековна

Руководитель  Кручинина А.Д.

Нормоконтролер  Кручинина А.Д.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 15.06.19 № 16)

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично
(протокол заседания ГЭК от 15.06.19 № 2)

Секретарь ГЭК  Клыченков С.В.

Пенза, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Система фибринолиза. Плазминоген, плазмин.	7
1.2 Структура плазминогена	9
1.3 Крингл-домены плазминогена	11
1.4 Активаторы плазминогена	15
1.4 Фибриновая сеть, система свёртывания крови	17
1.5 Окислительный стресс	25
1.6 Методы выявления модификаций в белковых молекулах	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	36
2.1 Материалы исследования	36
2.2 Методы исследования	36
2.2.1 Выделение плазминогена	36
2.2.2 Выделение фибриногена	37
2.2.3 Оценка гомогенности полученных препаратов белка	38
2.2.4 Проверка амидолитической активности	38
2.2.5 Проверка ферментативной активности плазмина	38
2.2.6 Окисление плазминогена гипохлоритом (HOCl)	38
2.2.7 Хромато-масс-спектрометрический анализ (ВЭЖХ-МС/МС)	40
2.2.8 Инфракрасная спектроскопия	42
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ ..	43
3.1 Результаты проверки активности плазминогена (электрофорез)	43
3.2 Результаты проверки методом электрофореза эффекта HOCl/OCl ⁻ на плазминоген	44
3.3 Результаты проверки кинетическим анализом активности плазмина при увеличении количества HOCl/OCl ⁻	46
3.4 Результаты проверки методом ИК-спектроскопии влияния на вторичную структуру белка окисление плазминогена	47
3.5 Результаты проверки методом масс-спектрометрии возникновения модификаций при окислении плазминогена гипохлоритом	52
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	59
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	61

Список сокращений

АФК – активные формы кислорода

EGF – эпидермальный домен фактора роста

KR – крингл домены плазминогена

LBS – лизинсвязывающие участки

NTP – N-терминальный пептид

PAp – Pan-apple домен

PD – протеазный домен плазмина

tPA – активатор плазминогена тканевого типа

uPA – активатор плазминогена урокиназного типа

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Плазминоген играет значительную физиологическую и патологическую роль в ряде жизненно-важных процессов. Данный белок - предшественник пламина, сериновой протеазы, основная функция которой – это осуществление внутрисосудистого тромболизиса, является недостаточно изученным белком плазмы крови в отношении его посттрансляционных окислительных модификаций и, как следствие, структурных нарушений.

Плазминоген является ключевым белком фибринолитической системы крови – важного защитного механизма предупреждения возникновения тромбозов. В основе деятельности фибринолитической системы находится реакция превращения плазминогена в активный фермент пламин. Нарушение активации плазминогена приводит к угнетению фибринолиза и может привести к тромбозам, и как следствие к различным заболеваниям. Тромбоз — опасное состояние, которое может встречаться в том числе, как осложнение различных заболеваний [35].

В течение своей жизни организмы постоянно подвергаются воздействию систем, генерирующих активные формы кислорода, которые могут вызвать повреждения белков, нуклеиновых кислот и липидов. К ним относятся ряд факторов окружающей среды, таких как облучение (рентгеновские лучи, γ -лучи, ультрафиолетовый свет), загрязняющие вещества в атмосфере (озон, N_2O_2 , NO_2 , сигаретный дым); однако многие являются простыми побочными продуктами нормальных метаболических процессов, таких как автоокисление восстановленных форм электронных носителей (NAD (P) H, восстановленные флавины, цитохром P450s), воспалительные реакции, синтез оксида азота, катализируемые оксидазой реакции, реакции перекисного окисления липидов и реакции, катализируемые металлами (в том числе система Фентона). Окисление аминокислотного остатка, которое происходит в

результате взаимодействия молекулы с АФК, может служить диагностическим признаком различных заболеваний, сопровождающимися повышенной генерацией свободных радикалов в организме.

Плазменные белки, которые защищены антиоксидантными ферментами в несопоставимо меньшей степени по сравнению с внутриклеточными белками, непрерывно подвергаются окислительным атакам со стороны нейтрофилов. Активация нейтрофилов как *in vitro*, так и *in vivo* при определенных заболеваниях (например, при воспалительных процессах, атеросклерозе и др.) вызывает генерацию высоко реактивных АФК, таких как O_2^- и H_2O_2 , и высвобождение фермента миелопероксидазы. Реакция последней с H_2O_2 в присутствии физиологических концентраций Cl^- приводит к образованию продукта $HOCl/OCl^-$, который рассматривается одним из главных окислителей в плазме крови.

Целью работы является исследование особенности индуцированного гипохлоритом окисления молекулы плазминогена, влияние окисления на функцию фермента (плазмина), проанализировать полученную информацию об обнаруженных окислительных модификациях и сопоставить их с функциональными нарушениями молекулы.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Выделить плазминоген и оценить его гомогенность и функции;
2. Провести картирование молекул исследуемых белков методом масс-спектрометрии высокого разрешения для определения окислительно модифицированных аминокислотных остатков;
3. Сопоставить локализации окислительных модификаций в аминокислотных остатках исследуемого белка с возможными функциональными и структурными нарушениями;
4. Оценить влияние физиологического окислителя – гипохлорита на молекулу плазминогена.

Выпускная квалификационная работа написана на 66 листах, содержит 20 рисунков, 2 таблицы и список литературы на русском и английском языках из 72 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Система фибринолиза. Плазминоген, плазмин.

Фибринолиз – это процесс протеолитического расщепления фибрина. Растворение сгустков или тромбов и восстановление нарушенного кровотока *in vivo*. Фибринолитическая система крови – это сложный комплекс взаимосвязанных биохимических реакций, которые протекают главным образом на поверхности волокон фибрина. Эти волокна образуют основу сгустков и тромбов.

Основным ферментом фибринолитической системы является плазмин, сериновая протеаза, который образуется из неактивного предшественника плазминогена под действием белков и ферментов, они появляются в крови и/или активизируются при различных патологических процессах. Данный белок осуществляет физиологически значимую реакцию всего процесса фибринолиза – расщепление фибриновых нитей.

Предшественник плазмينا – плазминоген, циркулирующий в крови в концентрации 150-300 мг/л. Кодирован на 6-й хромосоме геном PLG. Основным органом, синтезирующим плазмин, является печень. Так же он может синтезироваться клетками почек, роговицы, надпочечников, мозга, яичек, сердца, лёгких, матки, селезёнки, значительные его количества найдены во внесосудистых жидкостях [71].

При секреции от плазминогена длиной 810 аминокислот, отсоединяется 19 аминокислот. Циркулирующий в организме полипептид является гликопротеидом, который содержит 791 аминокислоту.

У человека в плазме крови в равных количествах присутствуют две гликоформы плазминогена: 1) гликозилированный по Asn²⁸⁹, и по Thr³⁴⁶ 2) гликозилированный только по Thr³⁴⁶.

В крови активаторы плазминогена тканевого (tPA) и урокиназного типа (uPA) специфически расщепляют единственную активационную связь

Arg561- Val562 в одноцепочечной молекуле плазминогена, в результате чего образуется двухцепочечный фермент плазмин. Некоторые белковые вещества, такие как калликреин, стрептокиназа, факторы XIa и XIIa также способны активировать плазминоген [19].

Плазмин – протеолитический фермент, который специфически действует в нейтральной среде на фибрин и фибриноген и также способный подвергать гидролизу другие протеины: антигемофильный глобулин, гормон роста, глюкагон и др. Наибольшее сродство наблюдается у плазмينا к фибрину. По механизму протеолитического действия плазмин более близок к трипсину. В крови плазмин находится в незначительных количествах и действия на фибриноген не оказывает из-за присутствия ингибиторов.

Плазмин является ферментом класса гидролаз, сериновой протеазой, с широкой субстратной специфичностью, молекулярная масса которого 85 000 кДа. Белковая часть молекулы состоит из двух соединённых дисульфидной связью полипептидных цепей — тяжёлой (60 000 кДа) лёгкой (25 000 кДа), в которой локализован активный центр плазмينا, который образован остатками Ser-740, His-602 и Asp-734. Плазмин вызывает разрушение тромбов за счёт влияние на распад фибрина. В фибрине плазмин гидролизует пептидные связи, которые образованные остатками лизина и аргинина. Также субстратами плазмينا являются фибриноген, факторы свертывания крови V, VIII и XII, гликопротеины мембран тромбоцитов, компоненты C1, C3 и C5 системы комплемента и др. Данный белок используют для лечения болезней, которые сопровождаются образованием тромбов (острый тромбофлебит, тромбоэмболии лёгочной и периферической артерий, тромбоз сосудов мозга, инфаркт миокарда) [25]. Кроме фибрина, плазмин может расщеплять другие белки и поэтому участвует в разных биологических процессах, кроме гемостаза и тромбоза.

1.2 Структура плазминогена

Плазминоген представлен в виде одной полипептидной цепи, которая состоит из 791 аминокислотных остатков. Третичная структура плазминогена представлена семью доменами, начиная с N-конца: преактивационный пептид, пять крингл-доменов и протеазный домен. Молекулярная масса каждого крингл-домена около 10 тысяч кДа. Каждый крингл содержит около 80 остатков аминокислот, которые скреплены тремя дисульфидными связями. Подобные структуры обнаружены у тканевого активатора плазминогена, урокиназы и фактора XII свертывания крови – протромбина. Два домена состоят из участка полипептидной цепи, которые соответствуют легкой цепи плазмина. В пяти крингл доменах расположены участки связывания субстрата с лизином и аргинином, которые представляют собой полости, в их формировании участвуют остатки аминокислот, в основном ароматической, природы, которые определяют сродство плазминогена и плазмина к фибрину. На их поверхности расщепляется одна пептидная связь между аргинином и валином в положениях 560 и 561 и происходит образование двухцепочечной структуры плазмина из одноцепочечной - плазминогена. У тяжелой цепи плазмина имеются все пять крингл доменов плазминогена. Нативный Glu-плазминоген – это одноцепочечный гликопротеин, (93-95 кДа), с Glu в качестве N - концевой аминокислоты. Он содержит N-терминальный пептид (NTP), протеазный домен (PD) и пять гомологичных крингл-доменов (KR1–KR5) (рис. 1) [56].

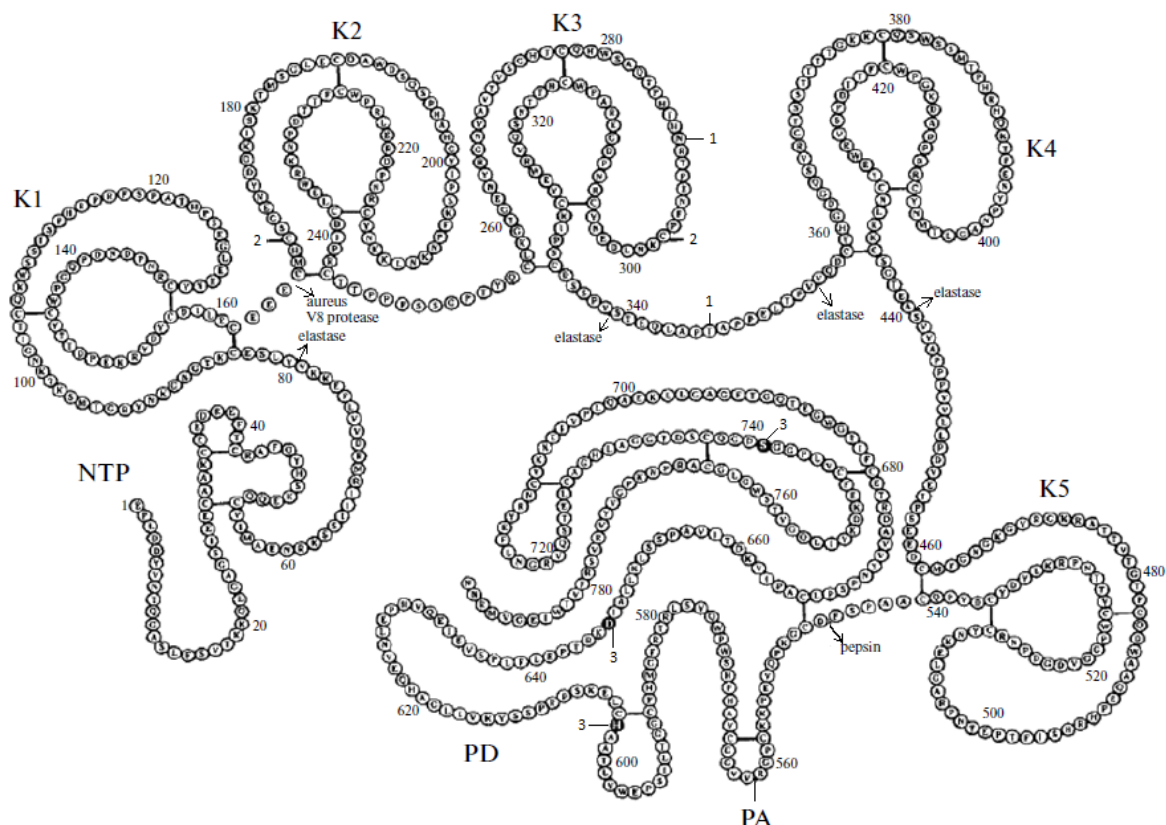


Рисунок 1. Структура Молекулы Glu-плазминогена. PD – протеазный домен плазима (остатки Val 562-Asp 791); KR1 - KR5 – крингл-домены; NTP – N-терминальный пептид (Pap – Pap-apple домен); 1 - центры гликолизирования; PA – пептидная связь Arg561-Val562, расщепляемая активаторами плазминогена; → места расщепления другими протеазами; 2 - остатки цистеинов, образующих S=S связь между K2и K3; 3 - аминокислоты активного центра фермента H 603, D 646, S 741 [1].

Lys-плазминоген – это одноцепочечный гликопротеин, (85 кДа), N - концевой аминокислотой которого является лизин. Образуется при отщеплении N - терминального пептида в присутствии следовых концентраций плазима.

После расщепления активаторами плазминогена (РА) специфической связи Arg561-Val562 с одновременным отщеплением NTP одноцепочечный Glu-плазминоген превращается в двухцепочечный плазмин. Lys-плазминоген, лишенный N-терминального пептида,

активируется быстрее, чем Glu-плазминоген, благодаря изменениям в конформации молекулы. Активный центр плазмина, который содержит триаду аминокислотных остатков Ser 741, His 603 и Asp 646, находится в “легкой” цепи (в PD) [56].

1.3 Крингл-домены плазминогена

Крингл-домены плазминогена имеют высокое содержание β -структур. Они формируются благодаря ван-дер-ваальсовым взаимодействиям, которые способствуют сближению между дисульфидными мостиками внутренней петли молекулы, которые образуют дисульфидный кластер: Cys-84-Cys-162- и Cys-105-Cys-145. Он оказывается спрятанным в структуре крингла около центра его тяжести и недостижим растворителям [42, 50].

Особенность плазмина и плазминогена это наличие в его кринглах лизинсвязывающих участков (LBS), которые обеспечивают связывание плазмина и плазминогена с фибрином, клеточными рецепторами и внеклеточными лигандами, α_2 -антиплазмином. Такие кринглы как: KR1, KR4 и KR5 или их комбинации это связующее звенья между плазминогеном и различными типами клеток, фибрином [41].

Кринглом-1 обеспечивается высокое сродство плазминогена и плазмина к фибрину. В качестве ионных центров остатки Asp-57-Arg-71 этого домена участвуют в первичном взаимодействии с фибрином. Высокое сродство к фибрину определяют остатки Arg-32 и Arg-37.

Интактный фибрин содержит только внутренние лизины, сродство к нему высокое у крингла-5, умеренное у крингла-2 и низкое у крингла-1. У крингла-4 почти нет сродства к интактному фибрину, но может взаимодействовать с частично деградированным фибрином, который содержит С-концевые лизины. [9]

К эндотелиальным клеткам человека крингл-5 обладает самым высоким сродством, это значит, что взаимодействие плазминогена с клетками эндотелия происходит через крингл-5.

Молекула плазминогена в разных условиях может иметь разные конформации: 1) Glu-плазминоген может иметь 3 вида конформации: “закрытая” α -конформация, в которой между лизинсвязывающими участками на крингле-5 и N-терминальным пептидом, и между лизинсвязывающими участками на крингле-4 и лигандом на крингле 3 поддерживается внутримолекулярное взаимодействие; “полуоткрытая” β -конформация, сохраняется одно из двух взаимодействий; “открытая” γ -конформация, когда оба внутримолекулярных лизинзависимых взаимодействия разрушаются. 2) Lys-плазминоген быстрее переходит в активную форму, чем Glu-плазминоген. Он лишён N-терминального пептида, имеет только β - или γ -конформацию [22, 49].

Рецепторы плазминогена существуют на поверхности различных клеток: тромбоцитов, моноцитов, фибробластов, макрофагов, эндотелиальных и раковых клетках и др. Доказано, что на клеточной поверхности специфические рецепторы плазминогена – это α -энолаза, аннексин II, актин, p11, α II β 3 и др [22].

Активацию плазминогена облегчает его связывание с клеточными рецепторами и внеклеточными лигандами. Это происходит благодаря конформационным изменениям его молекулы и защищает от инактивации ингибиторами образуя связанный плазмин (рис. 2) [48].

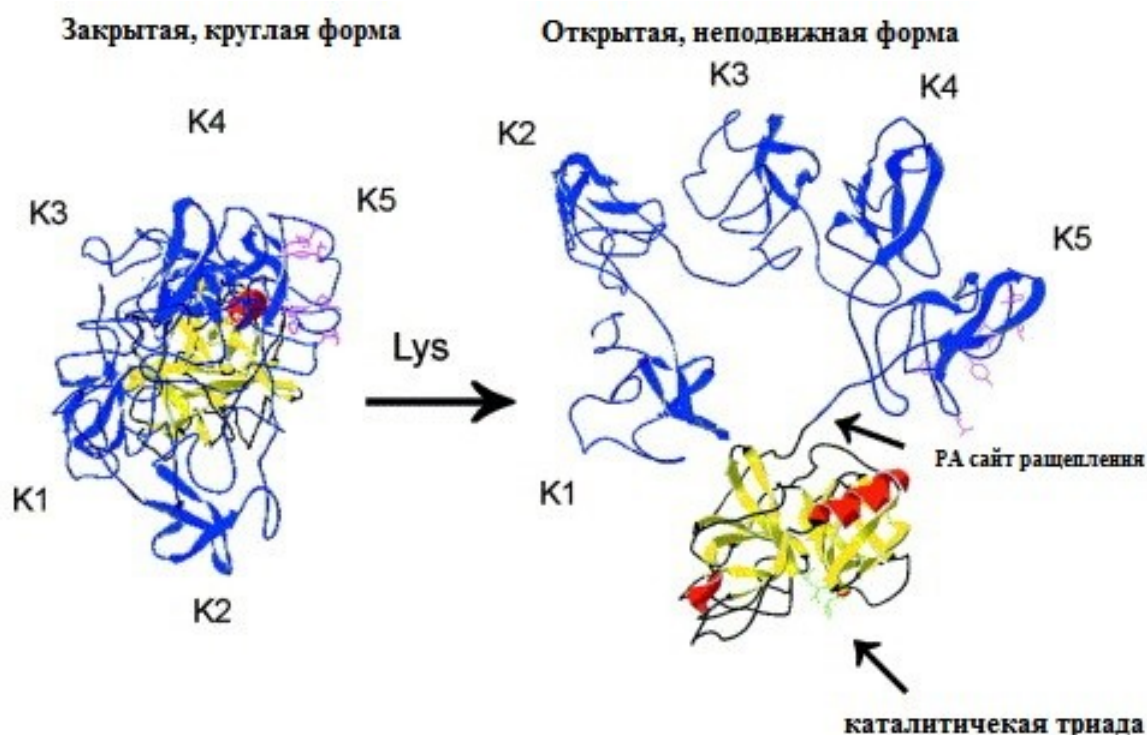


Рисунок 2. Схематичное представление конформационного изменения плазминогена, которое индуцируется при связывании с лизинсодержащими мишенями.

Все три протеазы плазмин, активатор плазминогена тканевого типа и активатор плазминогена урокиназного типа — являются трипсиноподобными ферментами, в отличие от трипсина, вместе с протеазным доменом (легкой В-цепью), локализованным в С-терминальной области молекул, содержат и иные доменные структуры. Эти домены, находясь в тяжелой А-цепи молекул, являющиеся структурно-функционально автономными (таблица 1) [19].

Таблица 1. Структурные модули ферментов системы плазминоген/плазмин.

Символ	Модули	Функции
	Крингл домен	Связывание Lys- и Arg-остатков
	Эпидермальный домен фактора роста (EGF)	Связывание с рецептором
	Витамин-К-зависимый Ca ²⁺ связывающий домен	Связывание кальция
	Пальцевидный домен (F)	Связывание с фибрином
	Протеазный домен (PD)	Расщепление Lys- и Arg-связей в субстратах

Процессы, которые можно объяснить перестановкой экзона: вставка, дублирование, удаление этих доменов. Изменяя специфичность ферментов, создавали, эволюционное дерево сериновых протеаз. Структурные модули тяжелых А-цепей молекул tPA и uPA на много отличаются от модулей тяжелой цепи плазмина (рис. 3).

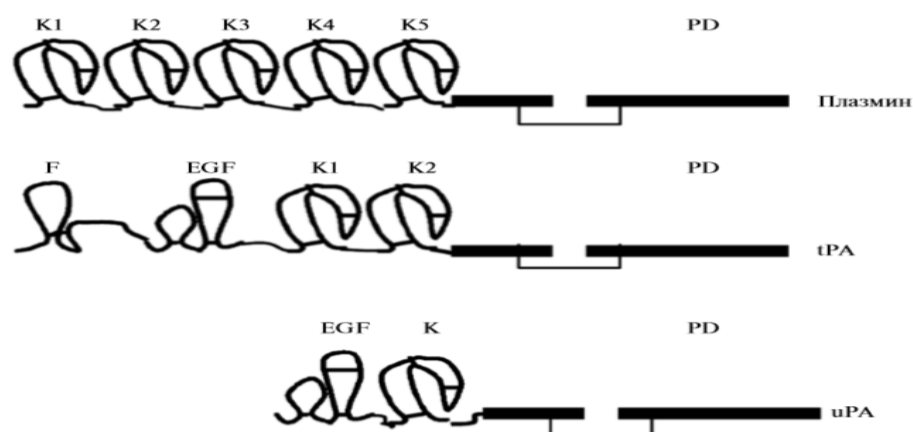


Рисунок 3. Схематичное представление строения двухцепочечных молекул сериновых протеаз системы плазминоген/плазмин.

1.4 Активаторы плазминогена

In vivo плазминоген переходит в активную форму (плазмин) под влиянием активаторов плазминогена тканевого (tPA) и урокиназного типа (uPA). Активатор тканевого типа синтезируется клетками эндотелия и яйцеклетками, а активатор плазминогена урокиназного типа – лейкоцитами, опухолевыми клетками, макрофагами и фибробластами. Специфически они расщепляют единственную активационную связь Arg561-Val562 в одноцепочечной молекуле плазминогена, в результате чего образуется двухцепочечный фермент плазмин. Некоторые белки, такие как калликреин, стрептокиназа, факторы XIa и XIIa также способны активировать плазминоген [56].

Различие функций активаторов плазминогена тканевого и урокиназного типов определяется структурными модулями их тяжелых А-цепей. Молекула активатора плазминогена тканевого типа через пальцевидный домен (F) и крингл 2 связывается с фибрином, а эпидермальный домен фактора роста (EGF) отвечает за связывание тканевого активатора с клеточными рецепторами. Так же, как и плазминоген, тканевый активатор обладает высоким сродством к фибрину. Скорость активации плазминогена под действием тканевого активатора в растворе низкая, но резко увеличивается в несколько раз в присутствии фибрина. Молекула активатора плазминогена урокиназного типа не имеет пальцевидного домена, она связывается с рецепторами через домен фактора роста. Единственный крингл активатора плазминогена урокиназного типа не имеет сродства к фибрину [22, 54].

Стрептокиназа – непрямой активатор плазминогена, который выделен из культуры б-гемолитического стрептококка (*Streptococcus equisimilis*). Молекула представляет собой одноцепочечный белок (47 кДа), который имеет подвижную многодоменную структуру в которой нет

углеводных и липидных компонентов. Так как стрептокиназа не фермент, активность она приобретает после образования эквимольных комплексов с плазминогеном. Скорость активации плазминогена определяется типом гликозилирования его молекулы, конформацией и специфичностью к определенным лигандам его кринглов. Стрептокиназа активирует плазминоген непротеолитическим способом так как не является ферментом [4, 23].

Стадии активации:

- Первая. Образование эквимольного комплекса стрептокиназы с плазминогеном человека
- Вторая. Стрептокиназа вызывает изменения конформации в серинпротеиназном домене профермента, которые приводят к формированию активного центра и появлению каталитической активности.
- Третья. Активаторный комплекс ферментативным путем расщепляет в молекуле субстратного плазминогена активационную пептидную связь с образованием плазмин-стрептокиназного комплекса. При большом количестве стрептокиназы происходит образование свободного плазмина [57, 60].

Опосредованная плазминоген-стрептокиназным комплексом активация плазминогена не зависит от присутствия в системе фибрина, что приводит к активации растворенного профермента. Образовавшийся комплекс активирует плазминоген, избирательно расщепляя пептидную связь Arg 561-Val 562, в результате чего протеолитическая активность в отношении фибрина — физиологического субстрата, снижается. Связанный со стрептокиназой плазмин защищен от ингибирования α_2 -антиплазмином и автолиза [63,65].

Стрептокиназа в составе комплекса с плазминогеном нестабильна и быстро подвергается частичному гидролизу. Через 10 с. существования комплекса формируется несколько производных форм с молекулярной массой от 47 кДа до 36 кДа. В течение 30 мин почти вся 47 кДа-

стрептокиназа превращается в 36 кДа-фрагмент, который сохраняется в течение 5 ч. Амидазная и фибринолитическая активность деградируемого плазмин-стрептокиназного комплекса при этом практически не изменяется, способность стрептокиназы защищать плазмин от ингибирования α_2 -антиплазмином и аутолиза сохраняется. В это же время активаторное действие на Glu-плазминоген снижается на половину [26].

Стрептокиназа — тромболитический белок, успешно применяемый в медицине для растворения тромбов при различных сердечнососудистых заболеваниях. Тканевой активатор и стрептокиназа применяются в тромболитической терапии при остром инфаркте миокарда, остром тромбозе вен, тромбозах легочной артерии и других нарушениях процесса фибринолиза. Главным недостатком стрептокиназы как тромболитического агента является способность активировать свободноциркулирующий плазминоген [15, 75].

1.4 Фибриновая сеть, система свёртывания крови

Фибринолитическая система крови, так же, как и свертывающая система крови, имеет два механизма активации: внутренний, который осуществляется ферментными системами крови, и внешний, который осуществляется тканевыми активаторами (рис. 4). При внутренней активации фибринолиза образуется комплекса Ха' с калликреином и высокомолекулярным кининогеном, в ответ на свертывание крови. Действие внутреннего фибринолитического механизма, позволяет постоянно удалять из кровотока фибрин, который образуется из фибриногена [59, 60].

При внешней активации фибринолиза в кровоток поступают тканевые киназы, в основном, из сосудистого эндотелия. Активаторы фибринолиза содержатся во многих тканях и жидкостях, в клетках крови — эритроцитах, тромбоцитах, лейкоцитах. Кроме того, гранулы и

макрофаги могут секретировать внутриклеточные киназы, которые сами по себе расщепляют фибрин [61,62].

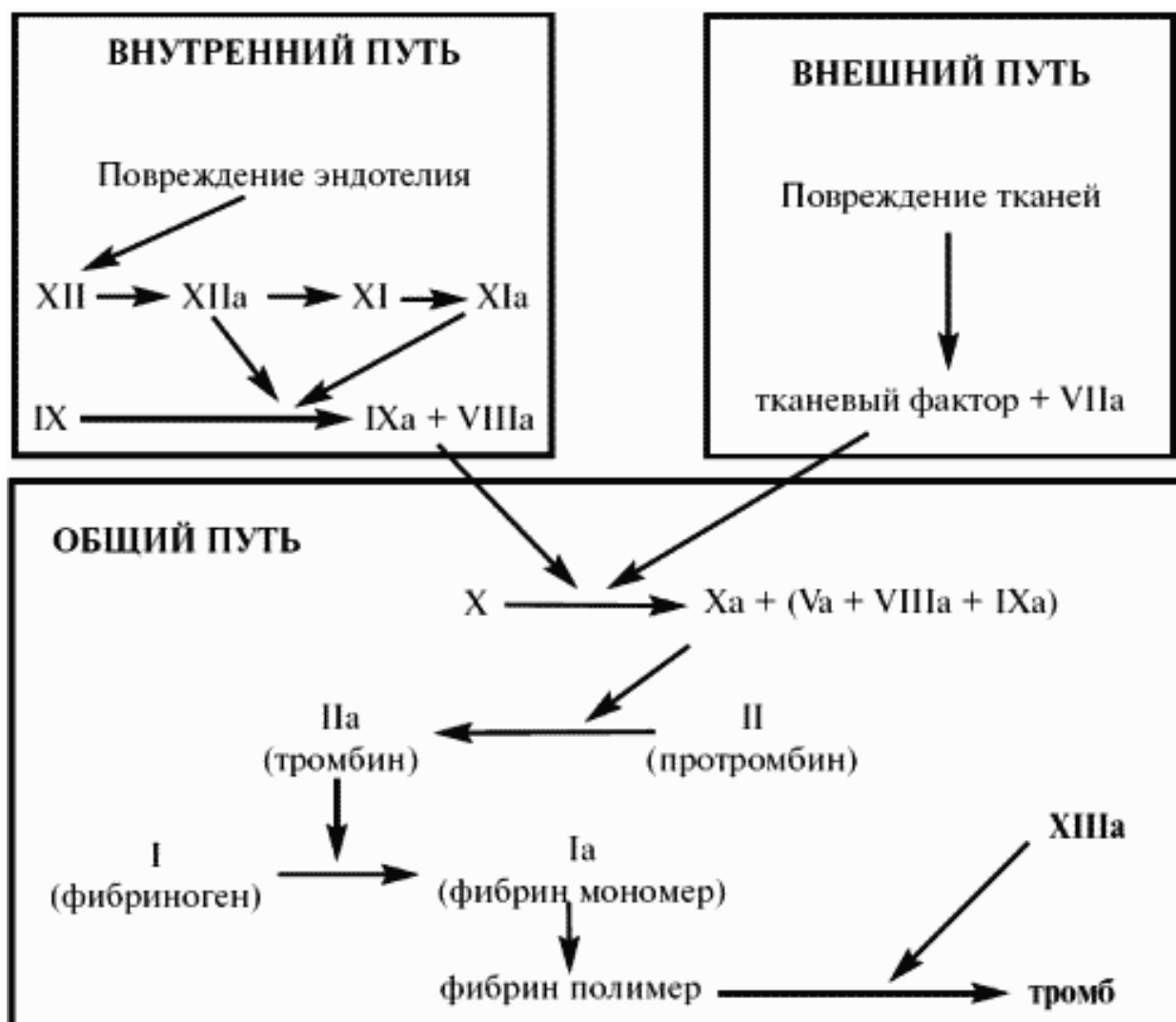


Рисунок 4. Схема свертывания крови

Тромбин – важный компонент системы свёртывания крови у человека, относится к семейству сериновых протеаз – ферментов, которые способны осуществлять протеолиз – расщепление в белках пептидных связей. Катализирует гидролиз пептидных связей, которые образованы остатками лизина и аргинина. Обладает ограниченной специфичностью к субстрату (рис. 5) [28].

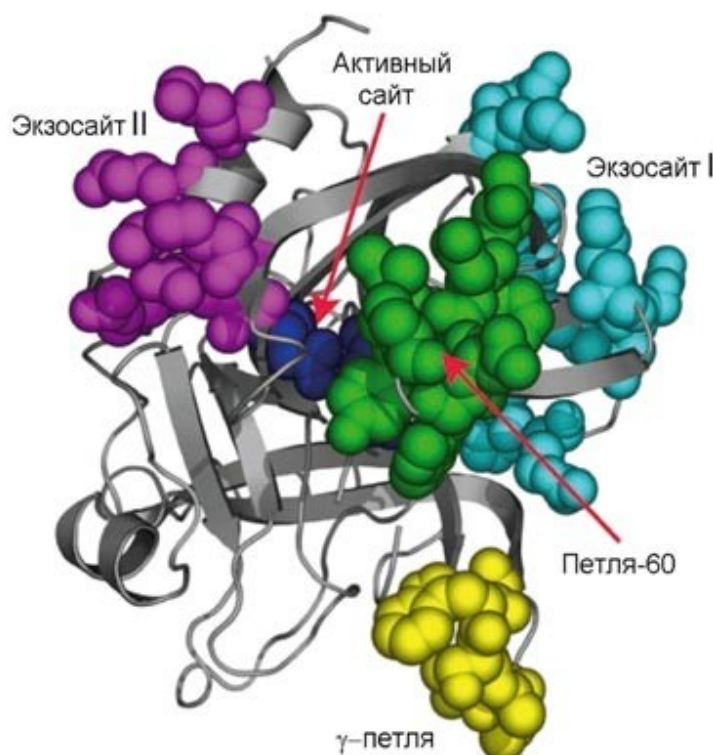


Рисунок 5. Молекула тромбина. Активный сайт – часть молекулы, которая распознаёт место расщепления и осуществляет ферментативный катализ. Экзосайты – выступающие части молекулы, которые позволяют осуществлять «переключение» молекулы, делая тромбин мультифункциональным белком.

Фибриноген – ключевой белок системы свёртывания крови, палочковидной формы длиной 45 нм и ~2–5 нм в диаметре. Синтез белка происходит в печени. Подвергается ферментативному расщеплению тромбином. При активации системы свёртывания крови. под действием активированного тромбина и XIII фактора свёртывания крови фибрино-мономер полимеризуется и образует нерастворимую сеть фибрина [33].

Фибриноген состоит из трех пар полипептидных цепей, обозначенных как A α , B β и γ с молекулярными массами 66,5, 52 и 46,5 кДа, соответственно. Посттрансляционное гликозилирование цепей B β и γ приводит к тому, что общая молекулярная масса достигает примерно 340 кДа. Обозначение полипептидного состава молекулы фибриногена (A α , B β , γ)₂ вытекает из обозначения фибринопептидов A и

В (FrA и FrB), N-концевых участков цепей A α и B β , которые отщепляются под действием тромбина, в результате чего образуются α и β цепи без фибринопептидов. Фибриноген состоит из центрального фрагмента E (E-область) и двух идентичных концевых областей D (D-область). Соответственно, структура фибриногена представлена как молекула, состоящая из трех линейно расположенных областей D-E-D. В E-области COOH-концевые части всех трех цепей (A α , B β , γ) образуют суперспиральный сегмент [52].

В центральной E-области (центральный узел) NH₂-концевые части обеих γ -цепей формируют единый асимметричный домен, первоначально обозначаемый как γ N-домен (воронкообразный домен). В области D NH₂-концы всех трех цепей образуют суперспиральный участок. Остальные COOH-концевые части β - и γ -цепей образуют β -узел (β -модуль) и γ -узел (γ -модуль), каждый из которых состоит из трех структурных доменов. Первоначально эти домены были идентифицированы в кристаллической структуре γ -модуля и обозначены как A-домен NH₂-терминальной области, центральный B-домен и P-домен COOH-терминальной области (P-домен содержит сайт полимеризации). Фибриноген становится способным выполнять свою физиологическую функцию только после превращения в фибрин под влиянием тромбина и последующей его полимеризации (рис. 6) [73].

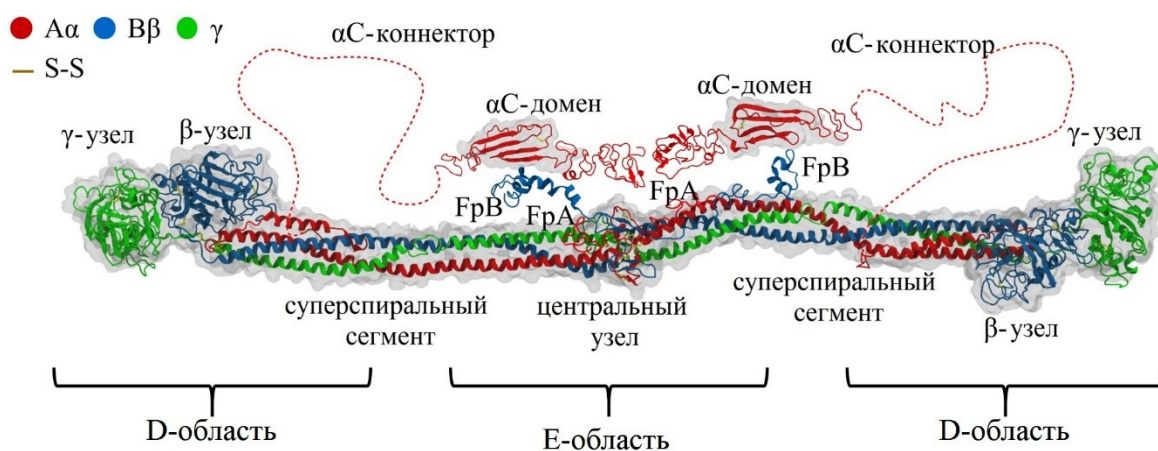


Рисунок 6. Молекула фибриногена.

На первом этапе полимеризации фибриногена тромбин отщепляет два фибринопептида А. Тромбин разрывает в Аа-цепях фибриногена связь между остатком аргинина в 17-м положении одной цепи и остатком глицина в 16-м положении другой цепи, которые представляют N-концевые участки полипептидных цепей.

На втором этапе отщепляет два фибринопептида В. Тромбин разрывает связь между остатком аргинина в 14-м положении и остатком глутамина в 15-м положении другой цепи,

Образующиеся после отщепления фибринопептидов фибрин-мономеры полимеризуются, после чего ковалентно связываются под действием фибринстабилизирующего фактора (XIII фактора) свертывания крови [34].

Продукты деградации фибриногена/фибрина образуются в организме, когда активируется система фибринолиза, при взаимодействии плазмينا с фибриногеном и фибрином. На рисунке 7 Схематично изображена структура фибриногена и продуктов его плазминовой деградации. Межцепочечные дисульфидные связи показаны в виде линий, а внутрицепочечные – в виде прямоугольников под каждой цепью. Сайты гликозилирования на β - и γ -цепях обозначены структурами «леденцов». Фибринопептиды А и В показаны как черные прямоугольники на А α - и В β -цепях, соответственно. Сайты расщепления плазмином обозначены вертикальными линиями внутри каждой цепи, а участки расщепления, дающие начало основным структурным фрагментам D и E, показаны черными стрелками. Эта система активируется в ответ на образование фибрина внутри сосуда. Активный плазмин последовательно расщепляет фибриноген/фибрин. Вначале от их альфа- и бета-цепей отщепляются низкомолекулярные фрагменты. После в плазме крови остаётся крупномолекулярный фрагмент X, который еще способен свёртываться под влиянием тромбина. Под влиянием плазмينا фрагмент X

расщепляется на фрагменты Y и D, а фрагмент Y расщепляется на фрагменты D и E.

Фрагменты X и Y – крупномолекулярные фрагменты фибринолиза, они получили название «ранние», а D и E фрагменты – «поздние» или конечные. Продуктами деградации фибриногена/фибрина называют эти фрагменты расщепления фибриногена и фибрина.

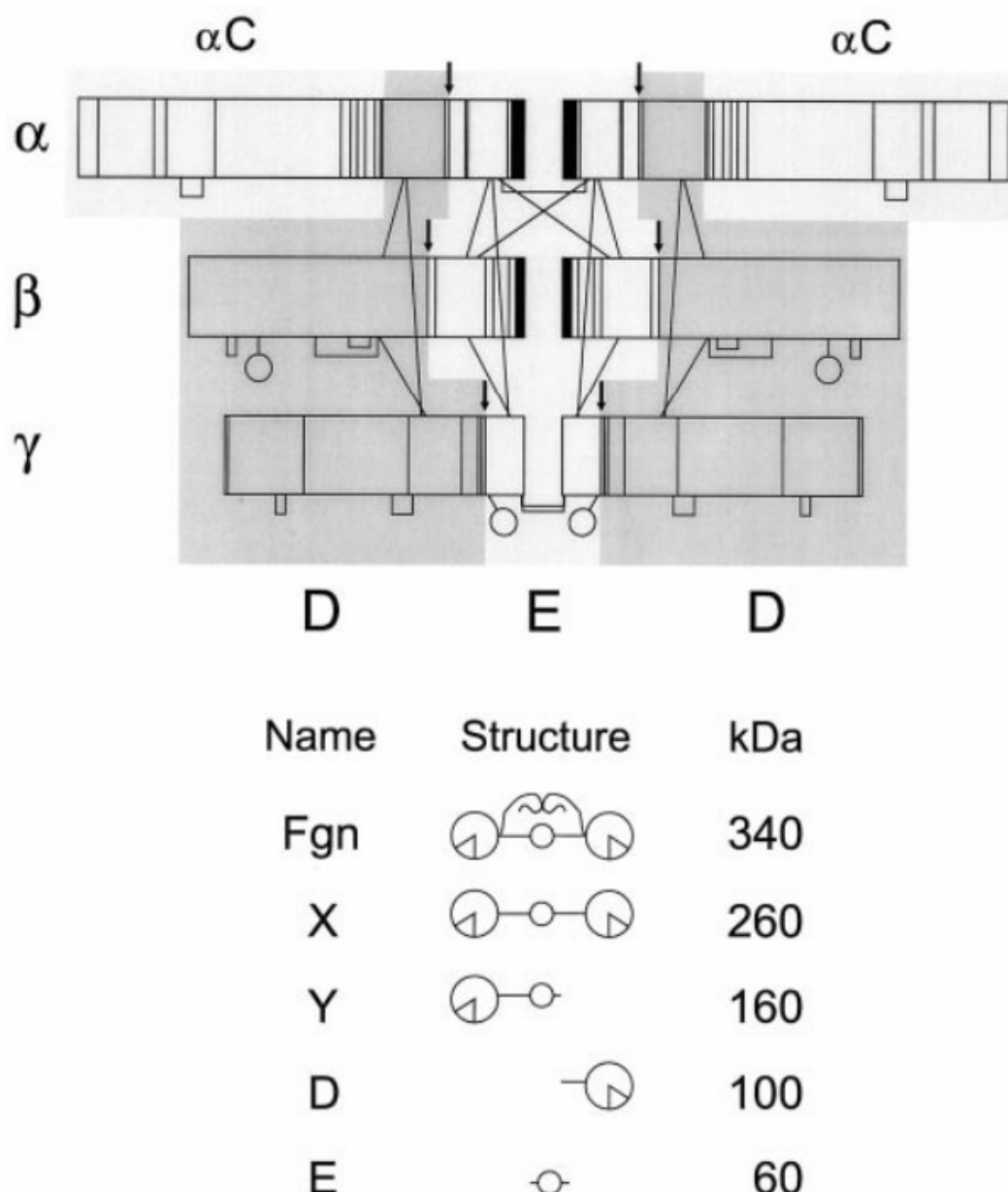


Рисунок 7. Схематичное изображение структуры фибриногена и продуктов его плазминовой деградации. [64].

Фибрин — высокомолекулярный, неглобулярный белок, который образуется из фибриногена, под действием фермента тромбина. Волокна, при свёртывании крови их сгустки составляют основу тромба (рис. 8). Тромбин удаляет четыре низкомолекулярных пептида (2FrA и 2FrB) у каждой молекулы фибриногена, формируя одиночные молекулы фибрин-мономеров, которые объединяются и формируют нити фибрина.

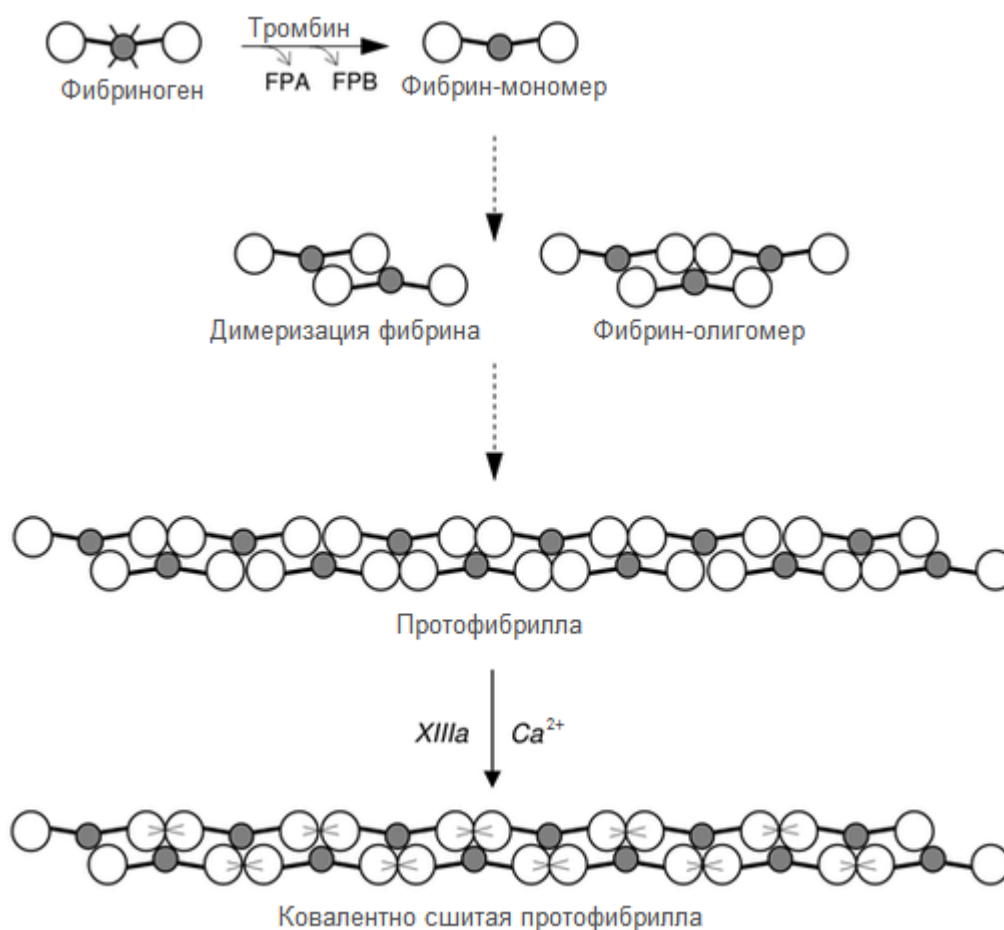


Рисунок 8. Полимеризация фибрина.

На первых этапах полимеризации молекулы фибрин-мономеров соединены вместе нековалентными водородными связями. В итоге волокна не соединены между собой поперечными связями. Только через несколько минут фибриновая сеть укрепляется. Это достигается при помощи фибринстабилизирующего фактора. В норме он находится в крови, среди плазменных глобулинов, в малом количестве, высвобождается из тромбоцитов, которые попали в тромб [27].

Когда нарушается целостность кровеносной системы, уменьшить кровопотерю помогает система гемостаза. Гемостаз поддерживается остановкой кровотечения системой свёртывания крови. Весь процесс сводится к образованию тромбоцитарно-фибринового сгустка.

При повреждении сосудов немедленно активируются тромбоциты. Они прилипают к волокнам соединительной ткани по краю раны. Прилипание (адгезия) обусловлено гликопротеиновым фактором Виллебранда. Вместе с адгезией активировавшиеся тромбоциты присоединяются к повреждённым тканям и к друг другу, формируют соединения, которые преграждают путь потери крови — наступает агрегация тромбоцитов, в результате чего образуется тромбоцитарная пробка. Одновременно с высвобождением факторов свертывания крови происходит активация протромбина с образованием тромбина. Он действует на фибриноген с образованием сети фибрина. В этой сети застревают некоторые эритроциты и лейкоциты, образуется тромбоцитарно-фибриновый сгусток. Белок тромбостенин помогает приближаться тромбоцитам друг к другу, в результате чего сгусток уменьшается и уплотняется, наступает его ретракция [7].

В самом простом виде процесс свёртывания крови может быть разделён на три фазы:

1. фаза активации — это последовательные реакции, которые приводят к образованию протромбиназы и превращения протромбина в тромбин;
2. фаза коагуляции — превращение фибрина из фибриногена;
3. фаза ретракции — формирование плотного фибринового сгустка.

1.5 Окислительный стресс

Окислительный стресс — это состояние, когда в организме образуется избыточное количество активных форм кислорода, запускается цепная реакция, которая вызывает окислительные повреждения (модификации) биологических молекул, вызывая потерю их функциональной активности. Аминокислоты, основные структурные элементы белковых макромолекул и пептидов, являются мишенями атаки свободными радикалами. Окисление аминокислот в составе белка неизбежно приводит к химическим и пространственным изменениям самих белков и могут приводить к фрагментации белковой молекулы [31, 36].

Активные формы кислорода (АФК) являются первыми радикалами, которые появляются при свободнорадикальном окислении. Наиболее распространенные формы активного кислорода — супероксидный анион-радикал, гидроксильный радикал, синглетный кислород и перекись водорода. Нейтрофилы и гепатоциты в организме человека в норме способны продуцировать гипохлорит (хлорноватистую кислоту), которая является важным компонентом неспецифической антибактериальной защиты организма. Разлагаясь в растворе, гипохлорит образует активные формы кислорода, преимущественно синглетный кислород, которые взаимодействуя с чувствительными к окислению макромолекулами в структуре чужеродных веществ и микроорганизмов, защищает организм от их воздействия. Однако при многих воспалительных заболеваниях продуцирование гипохлорита может повыситься, вызывая повреждения тканей и тромбозы [14, 37].

Супероксид-анион радикал O_2^- — образуется в результате присоединения первого электрона к молекуле кислорода. Получив второй электрон, супероксид-анион радикал превращается в перекись водорода (H_2O_2). Молекула перекиси водорода распадается на 2 наиболее активных

гидроксил-радикала, которые отнимают у любой органической молекулы атом водорода, превращаясь в воду. Синглетный кислород ($^1O_2$) — молекула кислорода с более высокой энергией [30, 38].

Период полужизни супероксид-анион радикала, гидроксильного радикала и синглетного кислорода составляет до 10 сек, а перекиси — 1 мин. Оставалось загадкой, каким образом небольшое число исходных короткоживущих активных форм кислорода вызывают лавинообразный процесс с образованием огромного числа новых радикалов. Известная к тому времени цепная реакция по «принципу домино» не объясняла этого критического явления [5].

Разрыв пептидной связи. Реакция начинается с извлечения гидроксил-радикалом водородного атома от α -атома углерода аминокислотных остатков. Это приводит к образованию алкильного радикала и воды. Алкил-пероксиды — пептидные радикалы тоже могут отнимать атомы водорода из аминокислотных остатков. Таким образом производят новые радикалы, которые способны вступать в подобные реакции. Если отсутствует O_2 или наблюдается его недостаток, то два производных алькильных пептидов могут провзаимодействовать между собой и образовать внутри- или межпептидные сшивки [3, 39].

ROS-опосредованное окисление белков и липидов и реакции гликирования приводят к образованию белково-белковых сшитых производных (рисунок 10). К ним относятся: (а) Реакция карбонильной группы в одном белке с N^ϵ -аминогруппой остатка лизина другого белка приводит к образованию поперечно-сшитых производных по основанию Шиффа. (б) Окисление двух остатков цистеина одного и того же белка или двух разных белков может привести к образованию внутри- или междисульфидных сшитых производных. Влияние ионизирующего излучения на белки, группы RCO, расщепление пептидной связи, инактивацию, окисление [53].

Образование сшивок. Добавление остатка гистидина, лизина или цистеина белка с α - β -ненасыщенным альдегидом, таким как 4-гидрокси-2-ноненал (HNE), приводит к образованию альдегидного продукта, который может реагировать с остатком лизина другого белка с образованием поперечной сшивки белок-белок. Ковалентное присоединение 4-гидроксиноненала к глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе: возможное участие внутри- и межмолекулярной реакции сшивания. Ковалентное присоединение 4-гидроксиноненала к глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе: возможное вовлечение внутри- и межмолекулярных поперечных глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы 4-гидрокси-2-ноненалом. Белок-белковые сшивки могут образовываться также в результате взаимодействия остатков лизина двух разных белков с альдегидными группами малонового диальдегида, образующимися при окислении полиненасыщенных жирных кислот. Введение карбонильных групп в белки продуктом перекисного окисления липидов малонового диальдегида. (д) поперечные связи образуются путем сочетания тирозиновых радикалов в двух разных белках, которые образуются в результате одноэлектронного окисления ароматических колец. Опосредованное гидроксильным радикалом повреждение белков с особым акцентом на кристаллические свойства. Кинетическая модель конкурентных реакций озона с аминокислотными остатками в белках в обратных мицеллах. Сшивки также образуются при взаимодействии остатков лизина или аргинина с основаниями Шиффа продуктов Amadori, образующихся при гликировании-гликоксидировании белков (рис. 9) [2].

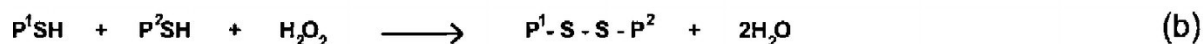
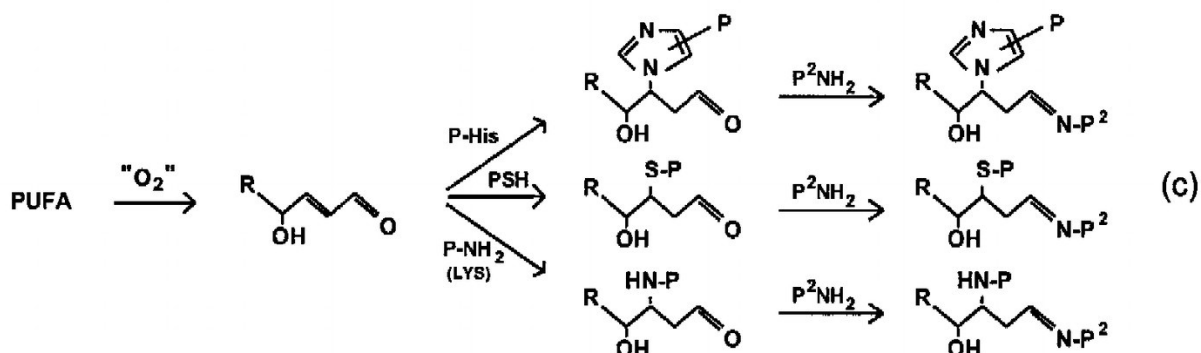
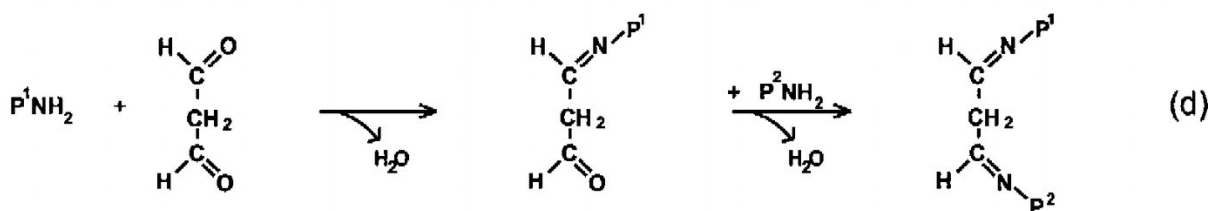
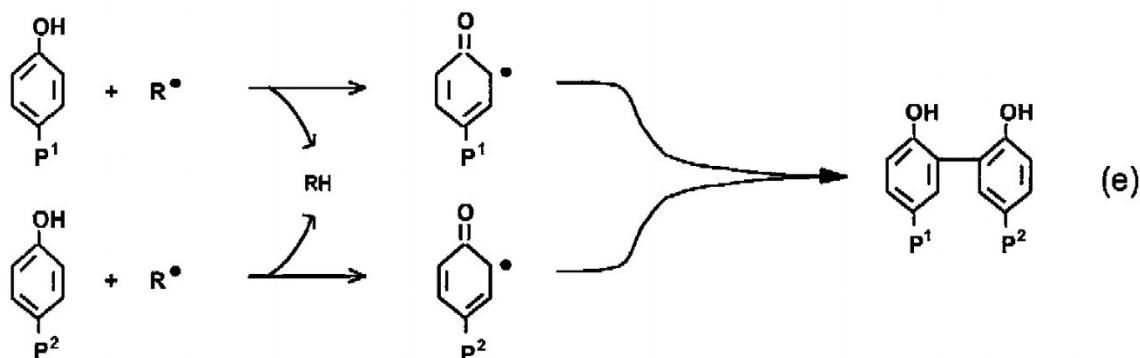


Рисунок 9. Генерация белок-белковых поперечных связей [7].

Окисление гипохлоритом (HOCl)

HOCl повреждает белки в результате реакции с боковыми цепями аминокислот, происходит изменение аминокислотных боковых цепей, фрагментации и димеризации белка и делает белок более восприимчивым к деградации протеолитическими ферментами.

Некоторые аминокислоты чувствительны к модификации HOCl. Тут и Phe (свободные аминокислоты или белки) подвергаются хлорированию по кольцу, и эти материалы используются в качестве маркеров

повреждения, вызванного HOCl. Цистеин и метионин быстро реагируют с образованием оксикислот, цистина (из цистеина) и сульфоксидов [9].

Хлорирование Tyr является одной из наиболее хорошо охарактеризованных модификаций боковых цепей, индуцируемых HOCl, в результате использования продуктов этих реакций в качестве специфических маркеров повреждения, опосредованного HOCl хлорамина, образованный в N-концевой аминокетильной группе Gly-Gly-Tyr-Arg, приводил к хлорированию боковой цепи Tyr. В условиях, когда свободный сайт амина не доступен для образования хлорамина (например, N-Ac-Tyr), он может показать, что может происходить прямое хлорирование фенолической цепи HOCl. Другие азотсодержащие боковые цепи; Arg, Gln и Asn [52, 69].

Продукты, возникающие в результате HOCl-опосредованного окисления боковых цепей Gln и Asn в водном растворе, в литературе не сообщались. Вероятно, это связано, по крайней мере частично, с их медленной скоростью реакции с HOCl, что делает их относительно незначительными мишенями в белках. продукты окисления боковой цепи Gln и Asn представляют собой аминокетильные группы. Затем они могут реагировать с HOCl с образованием хлораминов и связанных с ними продуктов разложения (рис. 10) [44, 45].

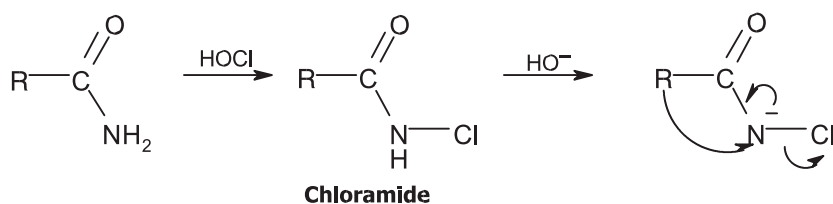


Рисунок 10. Механизм перегруппировки Гофмана, который может иметь значение для модификации боковых цепей Gln и Asn.

В целом, сшивание и агрегация происходят с белками, обработанными HOCl, легче, чем расщепление основной цепи. агрегация возникает главным образом в результате модификации боковой цепи, которая является быстрым и легким процессом, тогда как фрагментация

происходит только тогда, когда прямая реакция является значительным путем. Таким образом, фрагментация происходит в значительной степени только после реакции НОСІ со всеми реакционноспособными боковыми цепями [67, 68].

Следствием многих хронических заболеваний является окислительный стресс и окисление белков. Белки плазмы крови подвергаются окислительной модификации при разных патологических процессах, интенсивность модификации соотносится с тяжестью заболевания, также может использоваться при проведении антиоксидантной терапии. В результате взаимодействия белковых молекул и активных форм кислорода, молекула белка может претерпевать различные модификации. Продукты окислительной модификации белков являются маркерами оксидативного стресса. Дальнейшее исследование процесса окисления белков будет способствовать совершенствованию способов диагностики ряда патологических состояний [16, 43].

1.6 Методы выявления модификаций в белковых молекулах

Детектировать большое количество разных типов окислительных модификаций белка невозможно с помощью одного аналитического подхода, и широкомасштабные исследования окисления белков обычно фокусируются на обнаружении одной модификации, такой как окисление цистеина или тирозина, или подкласса побочных продуктов окисления, такого как карбонилы, количественное определение которых производят, измеряя на спектрофотометре продукт их реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. Протеомика (область молекулярной биологии, посвящённая идентификации и количественному анализу белков) нацелена на анализ всего содержания белков в исследуемом образце и определение всех модификаций вплоть до уровня одной аминокислоты. Обнаружение посттрансляционных модификаций ранее проводилось также различными

аналитическими методами, такими как радиоактивное мечение белков, тонкослойная хроматография, колоночная хроматография и/или ПААГ электрофорез [19].

Позже были разработаны другие методы, такие как белковое секвенирование деградацией Эдмана и Вестерн-блоттинг с использованием специфичных к белку антител. В настоящее время методы обнаружения на основе антител и протеомный анализ на основе масс-спектрометрии являются преобладающими методами, используемыми для обнаружения и анализа посттрансляционных модификаций. Иммунохимические методы ограничиваются доступностью антител, которые могут специфически распознавать модифицированный аминокислотный остаток в белке или пептиде, однако эти методы не дают информации о точном расположении участка модификации, часто требуют дополнительных методов анализа и направлены на обнаружение только одного типа модификаций [13, 46].

Масс-спектрометрия – это метод применяемый в исследовании и анализе веществ, который основан на ионизации атомов и молекул вещества и последующем разделении ионов, которые образуются в соответствии с отношением массы иона к его заряду в электрическом поле. Масс-спектрометр – это вакуумный прибор, который использует физические законы движения заряженных частиц в магнитных и электрических полях. Результат работы – получение масс-спектра (рис.11) [12].

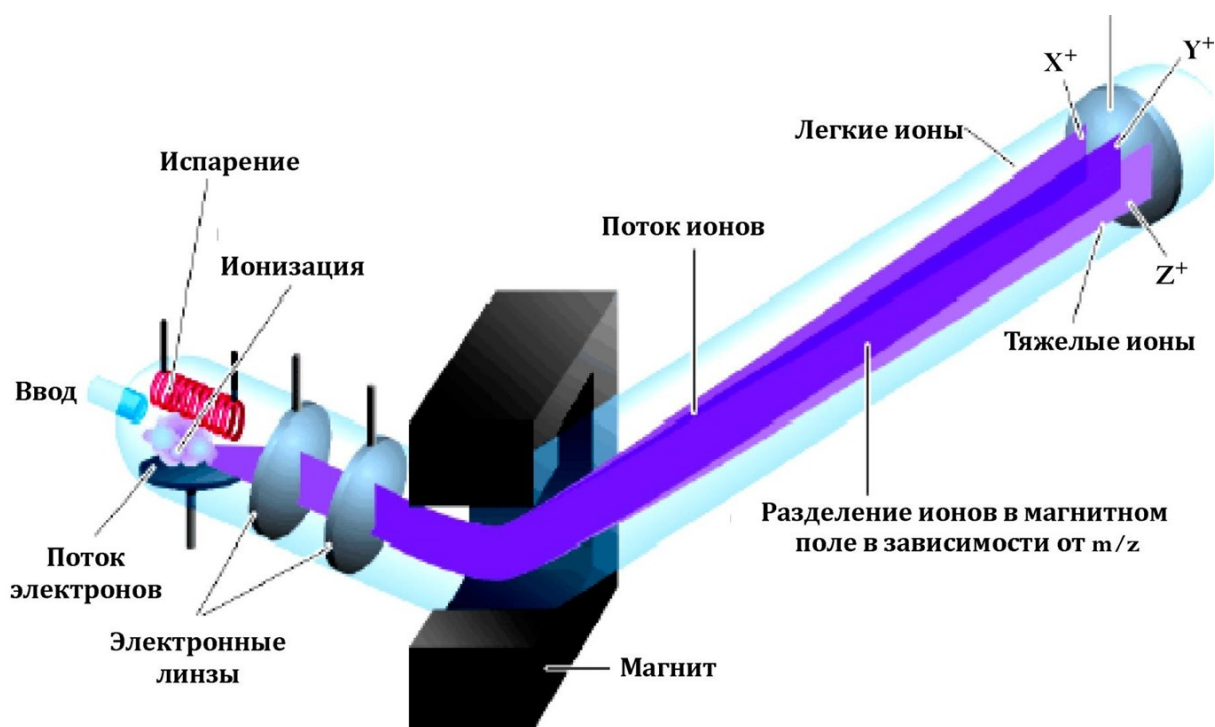


Рисунок 11. Схема масс-спектрометра.

В настоящее время масс-спектрометрия широко используется в биохимии белков и протеомике для идентификации и характеристики белков [14, 25].

Методы разделения белка на основе центрифугирования, электрофореза или хроматографии легко совмещаются с дальнейшим масс-спектрометрическим анализом. Белки предварительно обрабатываются гидролитическими ферментами, поскольку пептиды в большей степени поддаются МС и МС/МС (танDEMная масс-спектрометрия) анализу, чем интактные белки. Наличие надежных и чувствительных приборов для лазерной десорбции (MALDI-MS) или ионизации электрораспылением (электроспрей (electrospray ionisation, ESI-MS) делает этот метод анализа доступным для молекулярных биологов и биохимиков, исследующих белковые молекулы. Масс-спектрометрия с использованием MALDI или ESI в качестве метода ионизации обеспечивает точное определение массы исследуемых пептидов. Однако, в большинстве исследований также желательно получать информацию о аминокислотной последовательности исследуемых белков или пептидов, потому что точно определенная

молекулярная масса в сочетании с частичной аминокислотной последовательностью пептида являются очень специфическими зондами для идентификации белка [26].

Массовый анализ и аминокислотное секвенирование с помощью МС/МС могут выявить присутствие модификаций в отдельных аминокислотных остатках белка [33].

Сначала получают спектр МС для определения молекулярной массы пептидов. Затем пептиды в свою очередь отбираются для МС/МС. Дальнейшая фрагментация пептидной связи дает набор ионов-фрагментов, которые генерируют лестничное считывание последовательности в тандемном масс-спектре. Присутствие модификации изменит массу модифицированного аминокислотного остатка и пептида. (Рис. 12) [29].

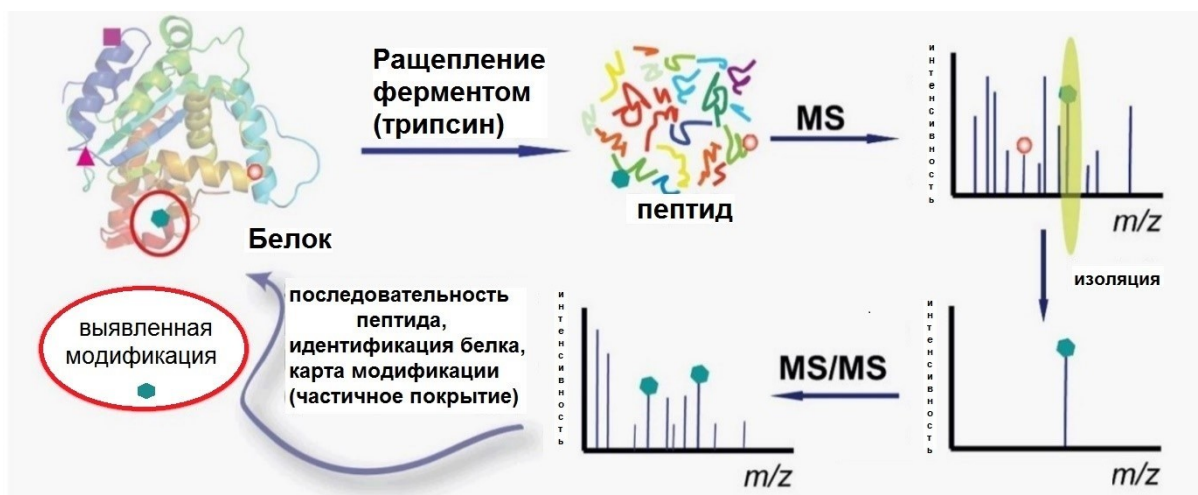


Рисунок 12. Схема поиска посттрансляционных модификаций с использованием тандемной масс-спектрометрии.

Использование в качестве метода ввода пробы ионизацию электрораспылением обеспечивается мягкая ионизация при атмосферном давлении, которая почти не фрагментирует высокомолекулярные соединения и не вызывает дополнительных повреждений белка, что очень важно при поиске посттрансляционных (в т.ч. окислительных) модификаций. При действии высокого напряжения на выходящей из конического капилляра жидкости она превращается в аэрозоль. При

испарении жидкости из частиц аэрозоля (в потоке инертного газа) электрический заряд переходит на биомолекулы, которые растворены в этом аэрозоле (рис. 13). Ионизация электрораспылением очень удобна для совмещения двух значимых методов аналитической биохимии – высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии [40].

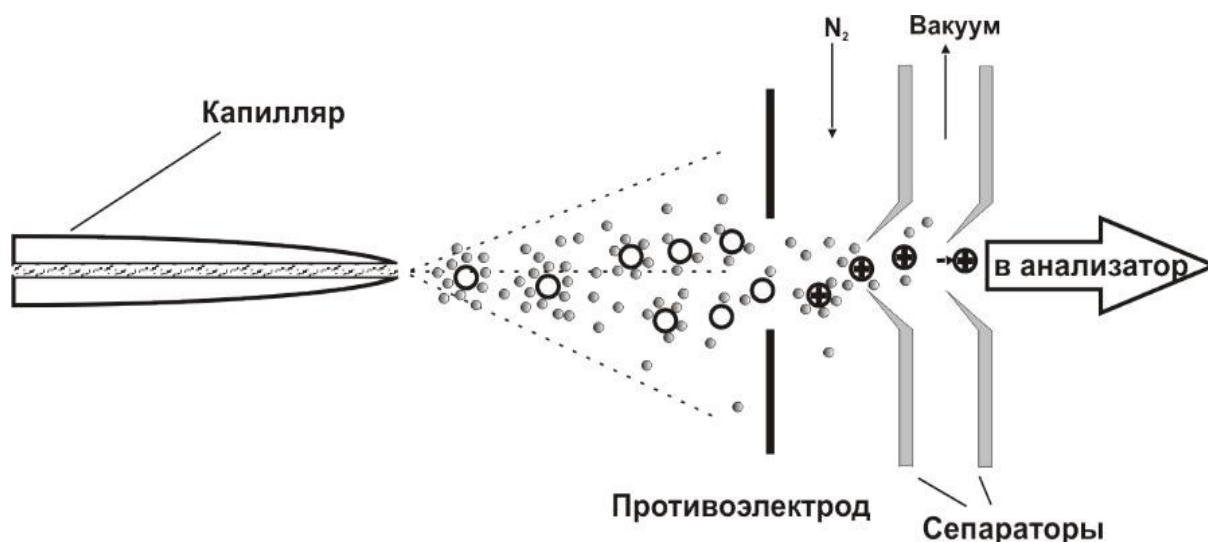


Рисунок 13. Схема ионизации электроспрее (ESI, Electro Spray Ionization).

Поэтому масс-спектрометрические методы являются единственным доступным инструментом для проведения глобального и точного анализа модификаций белка

Используя тандемную масс-спектрометрию высокого разрешения, возможно определить тип модификации и точное местоположение модифицированной аминокислоты в белковой цепи

Высокоэффективная жидкостная хроматография – важный аналитический инструмент для того, чтобы разделить и количественно определить компоненты в сложных смесях жидкостей. При выборе колонки и детектора этот метод применяется к образцам с компонентами, которые начинаются от небольших неорганических и органических молекул и ионов и заканчивая полимерами и белками с высоким молекулярным весом.

Основой хроматографического разделения является участие различных компонентов разделяемой смеси в системе межмолекулярных Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий на границе раздела фаз. Высокоэффективная жидкостная хроматография - особый способ анализа сложных веществ. В данном методе необходимо предварительно разделить исходную многокомпонентную смесь на простые вещества.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Материалы исследования

Материалом для исследования служила плазма крови человека. Цитратная плазма крови была получена от Московской центральной станции переливания крови. Sepharose 4B была приобретена у GE Healthcare (США). Хромогенный субстрат для пламина и активированного стрептокиназой плазминогена Chromogenix S-2251 был получен у Diapharma (США), стрептокиназа – Bechringwerke, (Германия). Все реактивы для SDS PAGE были приобретены у Amresco (США). Маркеры молекулярной массы белка для электрофореза (26616) и краситель Coomassie Brilliant Blue R-250 (20278) были предоставлены компанией Thermo Fisher Scientific (США). Дитиотреитол (DTT) и йодацетамид были приобретены у Merck (Дармштадт, Германия). Трипсин (V5280) приобретен у Promega (США). Все остальные химические вещества были аналитического класса чистоты или выше.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Выделение плазминогена

Glu-плазминоген был выделен из цитратной плазмы крови доноров методом аффинной хроматографии с добавлением во все используемые растворы апротинина до конечной концентрации 5 KIU/мл и 0,003 M ЭДТА [24].

Декантированную Sepharose 4B смешивают с равным объемом воды и добавляют BrCN (100 мг на мл осажденной сефарозы), растворенный в объеме воды равном раствору суспензии сорбента. pH немедленно доводят до 11 и поддерживают на этом уровне путем титрования 4M NaOH. После окончания реакции (8 минут), активированную сефарозу промывают 20 объемами холодного 0,1M NaHCO₃, pH 8,9. Промытую сефарозу

суспендируют в холодном 0,1М NaHCO₃, pH 8,9 равном исходному объему сефарозы. К 150 мл суспензии (0,1М NaHCO₃, pH 8,9), содержащей 100 мл активированной Sepharose 4В, добавляли 20,0 г L-лизина моногидрохлорида, титровали до pH 8,9 в 50 мл H₂O. Полученную суспензию перемешивали в течение 24 часов при 5°C.

Хроматографическую колонку (2,5×30 см) заполняли 50 мл полученной лизин-сефарозы, уравнивали 0,1 М фосфатным буфером (pH 7,4). 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, Ирландия). Концентрацию плазминогена измеряли спектрофотометрически при 280 нм. Препарат плазминогена был заморожен и хранился при -40°C.

2.2.2 Выделение фибриногена

Фибриноген был выделен из плазмы крови человека с помощью осаждения глицином. Плазму инкубировали с глицином в соотношении 0,1 мл плазмы к 15,6 мг глицина в течение одного часа на льду и осадок отделяли центрифугированием при 16 000 об/мин в течение 20 минут при 4°C. Супернатант удаляли и осадок суспендировали в фосфатном буфере при pH 6,4. Этот процесс повторяли еще 3 раза. Концентрацию фибриногена измеряли спектрофотометрически при 280 нм. Препарат фибриногена был заморожен и хранился при -40°C [66].

2.2.3 Оценка гомогенности полученных препаратов белка

Гомогенность полученных препаратов плазминогена и фибриногена проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (12%) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) по методике Laemmli.

2.2.4 Проверка амидолитической активности

Превращение плазминогена в плазмин осуществляли стрептокиназой (Bechringwerke, Германия) в молярном соотношении 100:1 (плазминоген:стрептокиназа), используя для оценки амидолитической активности образующегося плазмина хромогенный субстрат S 2251 (NH₂-D-Val-Leu-Lys-*n*-нитроанилид).

2.2.5 Проверка ферментативной активности плазмина

Ферментативная активность плазмина оценивалась по накоплению продуктов гидролиза фибриногена с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (7%) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) по методике Laemmli.

2.2.6 Окисление плазминогена гипохлоритом (HOCl)

Плазминоген разбавляли в 10 mM натрий-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 150 mM NaCl, до конечной концентрации белка 100 мг/мл. Плазминоген инкубировали в стерильных условиях в присутствии свежеприготовленного гипохлорита натрия (Sigma, SHBJ5633) (конечная концентрация 0–150 мкМ) при 37°C в течение одного часа (Gugliucci, A. (2008). Hypochlorous acid is a potent inactivator of human plasminogen at concentrations secreted by activated granulocytes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 46(10). doi:10.1515/cclm.2008.272). Реакция была остановлена 10-кратным избытком L-метионина.

Glu-плазминоген был выделен из плазмы крови доноров методом аффинной хроматографии с добавлением во все используемые растворы апротинина до конечной концентрации 5 KIU/мл.

Фибриноген был выделен из цитратной плазмы крови человека методом глицинового осаждения.

Преобразование плазминогена в плазмин осуществляли стрептокиназой (Bechringwerke, Германия) в молярном соотношении 100:1 (плазминоген:стрептокиназа), используя для оценки амидолитической активности образующегося плазмина хромогенный субстрат S 2251 (NH₂-D-Val-Leu-Lys-*n*-нитроанилид, "Chromogenix" США).

Ферментативная активность плазмина оценивалась по накоплению продуктов гидролиза фибриногена с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) по методике Laemmli.

Окисление плазминогена было индуцировано раствором гипохлорита натрия (Sigma, SHBJ5633), как детально описано ранее.

Окисление плазминогена было инициировано гипохлоритом. Гипохлорит является сильным окислителем и важнейшим компонентом бактерицидной системы человека и других млекопитающих. Вследствие высокой реактивности и способности продуцировать свободные радикалы, гипохлорит реагирует со многими биологически важными молекулами, в том числе с белками.

Glu-плазминоген был выделен из плазмы крови доноров методом аффинной хроматографии с добавлением во все используемые растворы апротинина до конечной концентрации 5 KIU/мл.

Фибриноген был выделен из цитратной плазмы крови человека методом глицинового осаждения.

Преобразование плазминогена в плазмин осуществляли стрептокиназой (Bechringwerke, Германия) в молярном соотношении 100:1 (плазминоген:стрептокиназа), используя для оценки амидолитической

активности образующегося плазмина хромогенный субстрат S 2251 (NH₂-D-Val-Leu-Lys-*n*-нитроанилид, "Chromogenix" США).

Ферментативная активность плазмина оценивалась по накоплению продуктов гидролиза фибриногена с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) по методике Laemmli.

2.2.7 Хромато-масс-спектрометрический анализ (ВЭЖХ-МС/МС)

Эксперименты по ВЭЖХ-МС/МС выполняли с помощью хроматографа Agilent 1100 с системой автоматического отбора проб ("Agilent Technologies Inc.", США) и tandemного масс-спектрометра 7T LTQ-FT Ultra ("ThermoFisher Scientific"). Для хроматографического разделения 1 мкл каждого образца впрыскивали в колонку C18 (75 мкм × 12 см, Reprosil-Pur Basic C18, Ammerbuch-Entringen, Германия). Использовали следующую подвижную фазу: растворитель А: 0,1% муравьиная кислота в H₂O; растворитель В: ацетонитрил. Хроматографию осуществляли с линейным градиентом путем увеличения относительного содержания растворителя В с 3% до 50% в течение 60 минут. Масс-спектрометрический анализ пептидных фракций проводили с использованием программного обеспечения Xcalibur (Thermo Electron, Бремен, Германия) с автоматическим измерением спектров в 2-стадийном режиме. На первом этапе точные массы пептидов были измерены в ячейке ICR в диапазоне $m/z = 300-1600$ с разрешением $R = 50$ при $m/z = 400$ (количество ионов в ячейке ICR было установлено 5×10^6). На втором этапе пять наиболее интенсивных пиков первой стадии подвергались столкновительной диссоциации (CID), спектры фрагментов регистрировались в линейной ионной ловушке (число ионов в LTQ было установлено равным 3×10^4). После фрагментации соответствующие массы родительских пептидов были динамически исключены из рассмотрения в течение следующих 30 с. Для каждого типа образцов

выполняли три биологических повторения, для каждого из которых измерения проводились трижды.

Триптические пептиды образцов 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., Canada). Точность определения массы для иона-предшественника была установлена равной 15ч/млн. Точность массы фрагментов MS/MS – до 0,50 Да.

Фильтрация результатов по средней доле ложных отклонений (FDR) для пептидов была установлена на уровне $<0,1\%$. Пептиды от 6 аминокислотных остатков и максимум 3 модификациями рассматривались для идентификации.

Идентификация программой PEAKS достигается путем интеграции результатов поиска в выбранной базе данных и результатов анализа спектров с помощью алгоритма *de novo*. Алгоритм поиска в базе данных используется для идентификации белков. При поиске в базе данных в качестве переменных модификаций указывается только ограниченное число посттрансляционных модификаций (ПТМ) для максимизации чувствительности (например, окисление (+15,99); диокисление (+31,99)). Алгоритм поиска модификаций используется для выявления большего количества ПТМ. На этом этапе анализируются только спектры с высокими показателями достоверности при анализе *de novo*, но не идентифицированные при поиске в базе данных. Список переменных модификаций расширяется и включает более специфические модификации из находящихся в базе данных UNIMOD.

Точные сайты модификации определялись наличием сайт-определяющих фрагментов ионов. Определение достоверных сайтов модификаций было достигнуто с помощью параметра Ascore, включающего доверительную оценку идентификации модификации пептида в конкретной позиции (аминокислотного остатка), рассчитанной с

помощью программного обеспечения PEAKS, в качестве $-10\log$ вероятности того, что модификация произошла в сообщенной позиции, сравнительно с другими возможными позициями. В этой работе мы использовали порог фильтрации для параметра $\text{Ascore} > 100$.

Все эксперименты повторялись трижды. Аминокислотный остаток, который оказывался модифицированным только в одном из образцов, исключался из дальнейшего анализа. Каждый из аминокислотных остатков, окисленных, по меньшей мере, на 1% (степень модификации $> 1\%$), считался модифицированным.

2.2.8 Инфракрасная спектроскопия

ИК спектры образцов исходного и окисленного плазминогена регистрировали на Фурье-ИК-спектрометре «Spectrum Two» (Perkin-Elmer, США), усредняя 16-25 аккумулярованных сканов с оптическим разрешением 4 см^{-1} (цифровое разрешение 1 см^{-1}) под управлением ПО «Spectrum v.10.3».

В работе использовано оборудование ЦКП ИБХФ РАН. Масс-спектрометрические данные получены при поддержке Российского научного фонда 16-14-00181.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Результаты проверки активности плазминогена (электрофорез)

Плазминоген активировали стрептокиназой (1:100 стрептокиназа:плазминоген) в течении 20 минут. Затем активированный плазмин добавили к раствору фибриногена в концентрации 2мг/мл (1:20). (рис. 14).

а 0 3 6 9 12 15 20 25 30

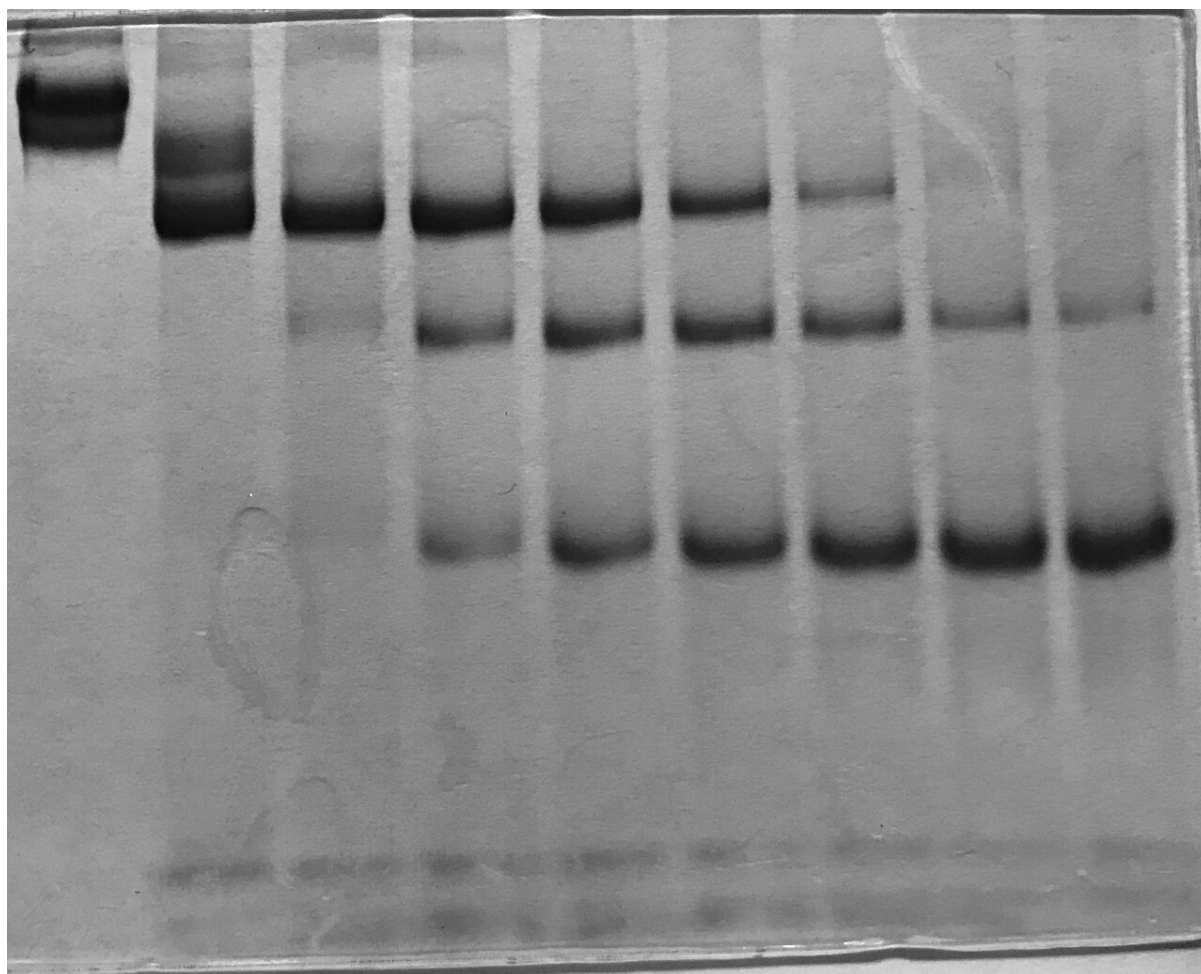


Рисунок 14. Продукты гидролиза фибриногена. 1 – нативный фибриноген
2 – фибриноген, инкубирующийся 3 мин.

3.2 Результаты проверки методом электрофореза эффекта HOCl/OCI^- на плазминоген

Результаты электрофореза свидетельствуют о том, что при обработке белка окислителем в диапазоне концентраций 25–150 μM плазминоген сохранял исходную гомогенность, т.е. не наблюдалась ни фрагментация белка, ни межцепочечное сшивание (рис. 15 (а)). Этот результат хорошо согласуется с полученными ранее электрофоретическими данными, которые также демонстрировали сохранение целостности полипептидной цепи плазминогена, обработанного гипохлоритом [32]. Действие HOCl/OCI^- на плазминоген в концентрациях 50 и 150 μM вызывало снижение ферментативной активности плазмина. Это проявлялось в ингибировании реакции накопления продуктов гидролиза фибриногена, о чем свидетельствовало уменьшение содержания конечного фрагмента D, практически полное отсутствие фрагмента E и сохранение остаточного фибриногена (рис. 15 (б)).

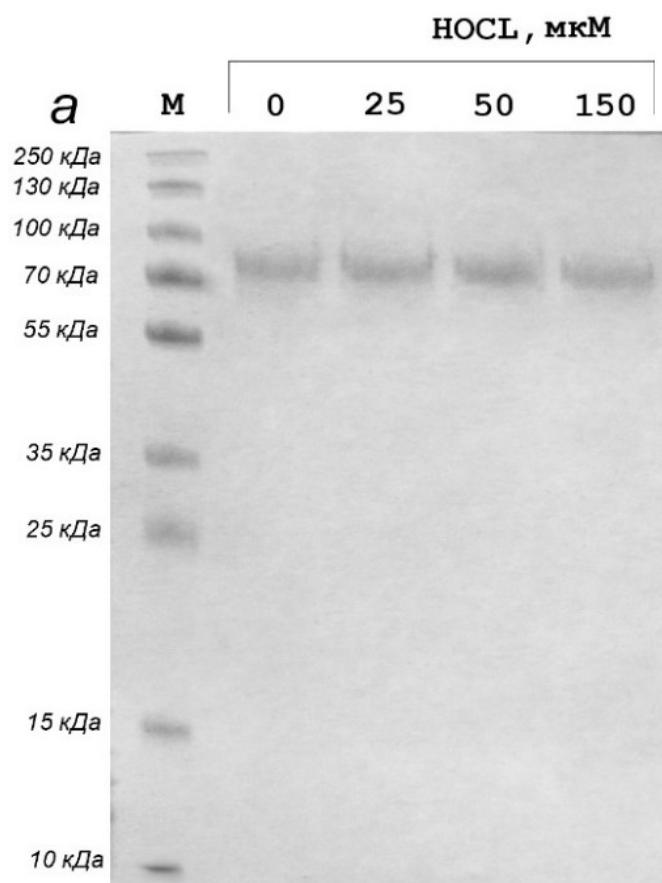


Рисунок 15 (а). Эффект HOCl/OCI^- на плазминоген.

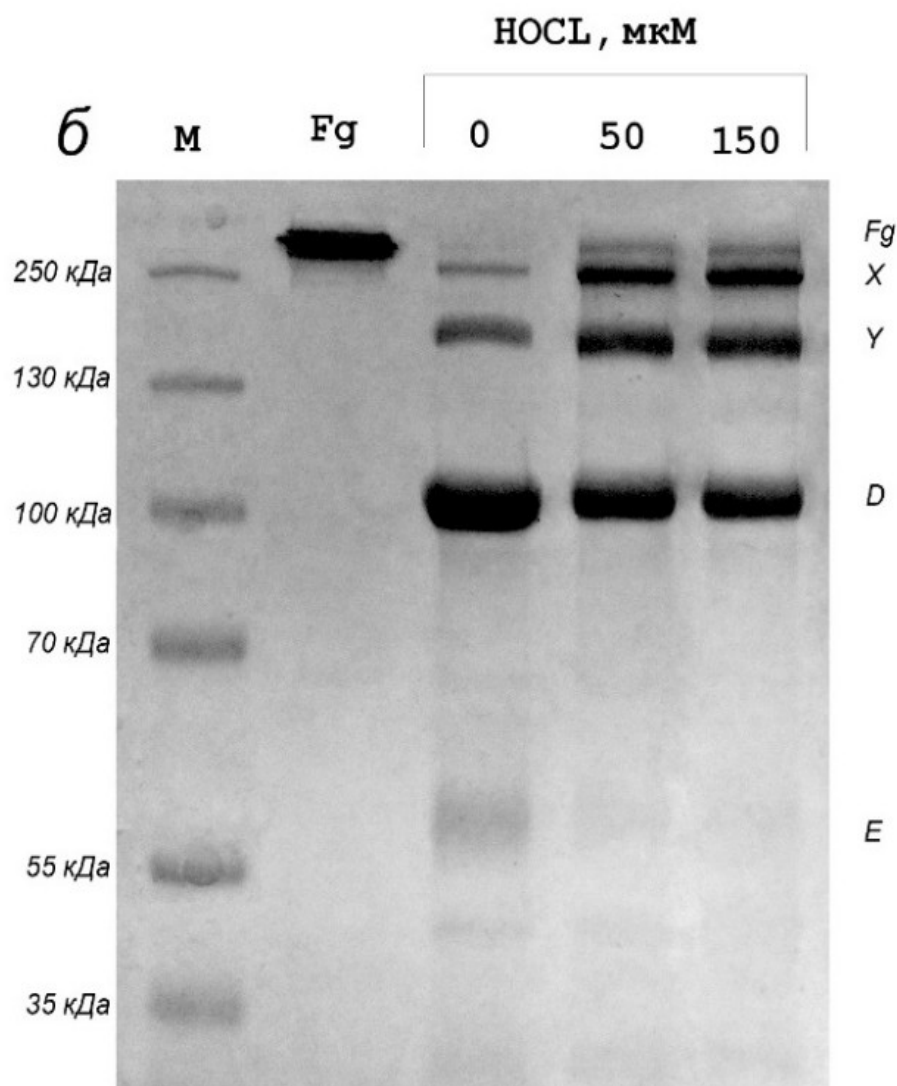


Рисунок 15 (б). Плазминовый гидролиз фибриногена.

(а) – никаких существенных изменений в структуре плазминогена не выявляется методом электрофореза; (б) – образующиеся под действием плазмина на фибриноген продукты гидролиза, так называемые фрагменты X, Y, D и E. Ферментативная активность плазмина, образованного из окисленного плазминогена, обработанного нарастающими количествами HOCl/OCl⁻, как видно, снижается. Это проявляется в уменьшении содержания конечного продукта, фрагмента D, в присутствии фрагмента E и сохранении остаточного фибриногена.

3.3 Результаты проверки кинетическим анализом активности плазмина при увеличении количества HOCl/OCl^-

Кинетический анализ также выявил снижение амидолитической активности плазмина при увеличении количества HOCl/OCl^- (рис. 16).

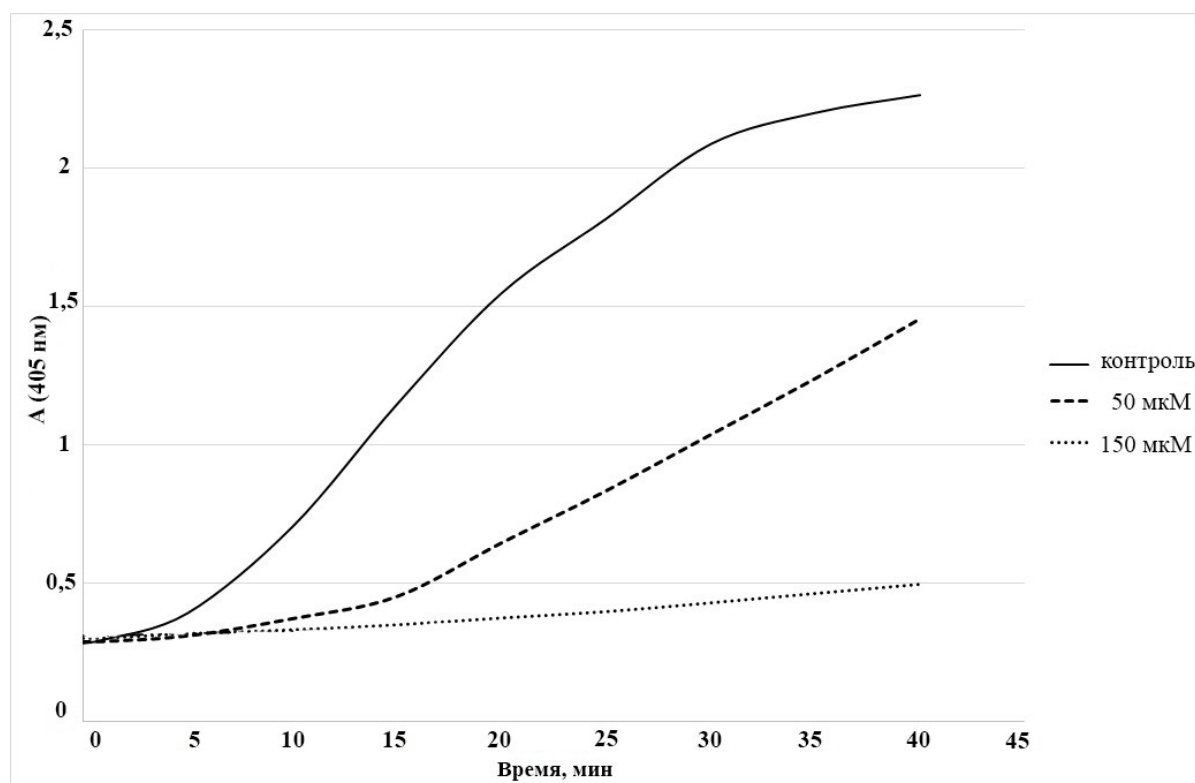


Рисунок 16. Снижение амидолитической активности плазмина, образованного из плазминогена, обработанного различными количествами HOCl/OCl^- .

Даже при самом высоком количестве окислителя плазмин сохранял частичную способность гидролизовать хромогенный субстрат.

3.4 Результаты проверки методом ИК-спектроскопии влияния на вторичную структуру белка окисление плазминогена

ИК-спектры образцов исходного и окисленного (образец 2) плазминогена регистрировали на Фурье-ИК-спектрометре «Spectrum Two» (Perkin-Elmer, США), усредняя 16-25 аккумулярованных сканов с оптическим разрешением 4 см^{-1} (цифровое разрешение 1 см^{-1}) под управлением ПО «Spectrum v.10.3» [20]. Образцы для измерений готовили, нанося 5–10 мкл водного раствора пробы на поверхность пластин ZnSe (диам. 12.7 мм, толщина 2 мм). После высушивания от воды при комнатной температуре до постоянного веса получали в центральной части поверхности ZnSe-диска пятно сухого материала пробы диаметром 4-6 мм и толщиной несколько мкм. Для записи ИК-спектров в режиме «на пропускание» использовали двух-линзовую (MgF_2) фокусирующую приставку «Microfocus» (Perkin-Elmer, Англия), установленную в стандартном слайдовом держателе образцов в измерительном отсеке прибора. Диск ZnSe с нанесенной пробой помещали вертикально в специальный пост приставки «Microfocus» между двумя MgF_2 -линзами на пути горизонтального зондирующего ИК-луча спектрометра. Фоновый спектр прибора обновляли в тех же условиях непосредственно перед записью спектра пробы, используя для этого идентичную чистую пластину ZnSe. Обработку полученных ИК-спектров (коррекция базовых линий, вычитание спектров и т.п.) осуществляли в рамках специализированного пакета ПО OPUS v.6.5 (Bruker GmbH, ФРГ), а для более углубленной обработки данных (деконволюции сложных пиков на составляющие с описание формы сигналов стандартными функциями) использовали программу «PeakFit v.4.11» (Systat, США). В частности, для разделения полос Амид I плазминогена на составляющие, отвечающие различным компонентам вторичной структуры плазминогена, использовали комплексную спектральную стандартную функцию «Гауссиан+Лоренциан», описываемую формулой:

$$y = a_0 \left[\frac{\frac{a_3 \sqrt{\ln 2}}{a_2 \sqrt{\pi}} \exp \left(-4 \ln 2 \left(\frac{x - a_1}{a_2} \right)^2 \right) + \frac{1 - a_3}{\pi a_2 \left[1 + 4 \left(\frac{x - a_1}{a_2} \right)^2 \right]}}{\frac{a_3 \sqrt{\ln 2}}{a_2 \sqrt{\pi}} + \frac{1 - a_3}{\pi a_2}} \right]$$

где a_0 – амплитуда сигнала; a_1 – пиковая частота полосы; a_2 – ширина полосы; a_3 – фактор формы полосы. На стадии предварительной деконволюции огибающей полосы Амид I использовали вторую производную сигнала, которая указывала на наличие 13 индивидуальных компонент. Затем итерационный процесс описания исходной огибающей набором стандартных полос продолжали до достижения критерия среднеквадратичных отклонений ANOVA r^2 порядка 0.9999+. Все статистические и физические параметры выделенных полос могут быть получены от авторов в виде файла Supporting Information.rtf.

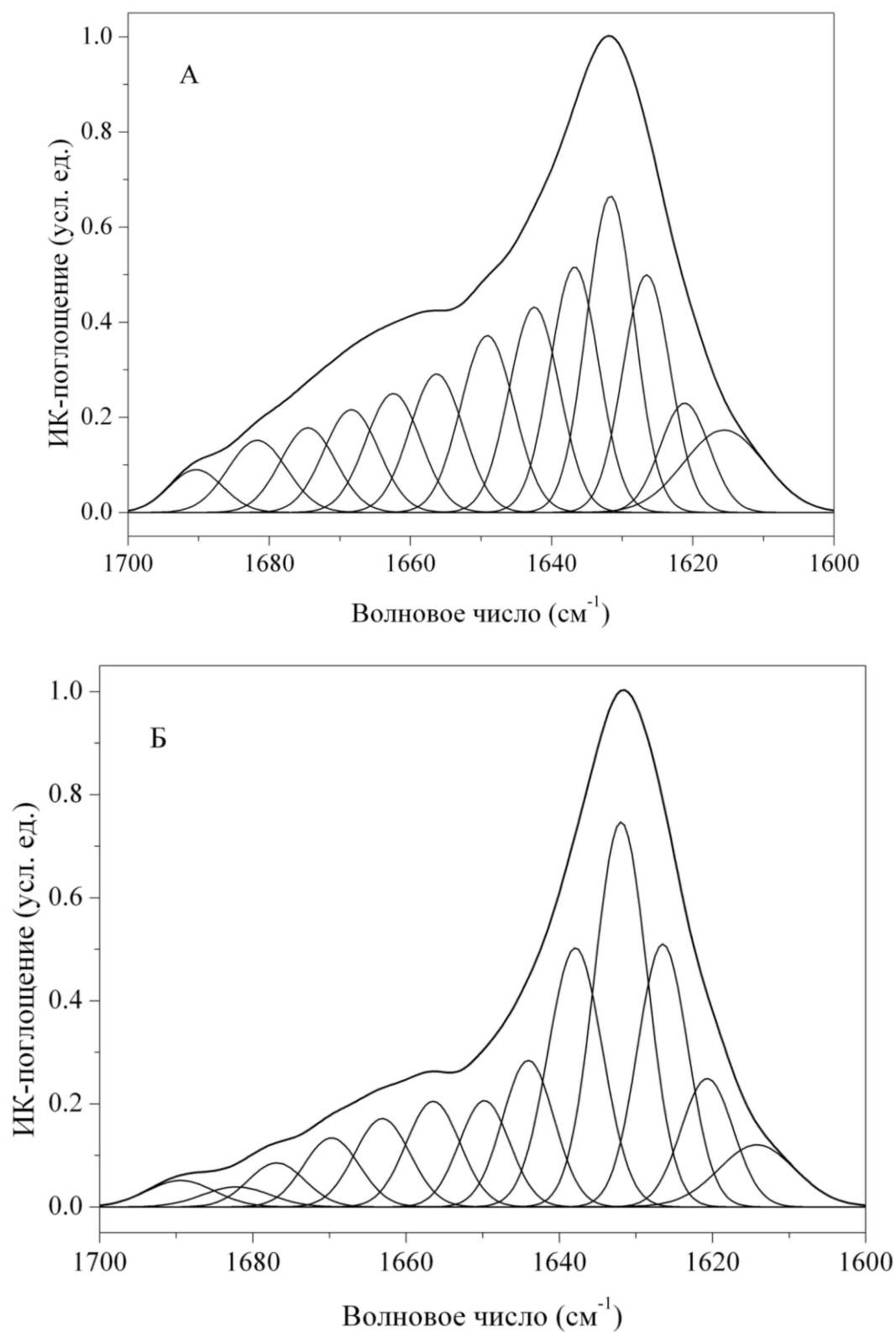


Рисунок 17. Результаты разделения полос Амид I плазминогена на составляющие полосы поглощения, характеризующие компоненты вторичной структуры плазминогена: А – плазминоген, не обработанный HOCl/OCl^- ; Б – плазминоген, обработанный $150 \mu\text{mol}$ HOCl/OCl^- .

Компоненты вторичной структуры, имеющие в ИК-спектрах поглощение в интервале 1656 ± 2 см⁻¹, можно классифицировать как α -helices; несколько полос в интервале $1624-1642 \pm 2$ см⁻¹ характеризуют внутримолекулярные β -sheets; полосы поглощения в интервале $1667-1685 \pm 2$ см⁻¹ характерны для β -turns; полоса вблизи 1648 ± 2 см⁻¹ весьма характерна для random coils, а полоса при 1663 ± 3 см⁻¹ указывает на наличие 310-helices. Дополнительно, β -sheets дают еще слабые полосы в интервале $1691-1696 \pm 2$ см⁻¹. Сопоставление величин относительных площадей полос для каждого из компонентов вторичной структуры свидетельствуют о том, что под действием окислителя во вторичной структуре плазминогена произошло существенное увеличение суммарного содержания структур типа β -sheet (с 55.8% до 69.1%) и заметное снижение относительного содержания random coils (от 9.3% до 5.8%). При этом относительное содержание структур α -helix в плазминогене уменьшилось с 7.4% до 6.2% и практически пропорционально ему в 1.2 раза снизилось относительное содержание структур типа 310-helix (с 6.5% до 5.3%). Следует отметить, что наибольший ущерб гипохлорит-индуцированное окисление нанесло элементам вторичной структуры плазминогена, соответствующим β -turn, общее относительное содержание которых уменьшилось с 14.5% до 8.4%.

В белках плазмы крови из-за полного отсутствия метионин сульфоксид редуктазы метионины, будучи не способными к обратимому окислению, являются «жертвенными» антиоксидантными остатками, которые способны нейтрализовать токсическое действие АФК на другие остатки. Причем антиоксидантные остатки метионинов, расположенные на поверхности белков, являются пространственно легко доступными для молекул окислителя, что делает их особо уязвимых к действию любых АФК. В противоположность им, функционально значимые остатки метионинов, которые погружены внутрь белковой глобулы, являются существенно более резистентными к атаке АФК. В связи с выше

изложенным, можно предположить, что шесть наиболее легко окисляемых остатков метионинов Met57, Met182, Met385, Met404, Met585 и Met788, расположенных в различных частях плазминогена, служат ловушками АФК. Остающиеся не окисленными, т.е. более резистентные к действию АФК, Met69 в *PAp* домене, Met96 в *KR-1*, Met167 в *KR-2* и Met463 в *KR-5*, вероятно, локализованы в менее доступных областях белка и поэтому, по всей видимости, не наделены антиоксидантной функцией. Однако их точная функциональная принадлежность не ясна.

Типичные ИК-спектры плазминогена до и после окисления HOCl показаны на рисунке 17 А. Простое визуальное сравнение двух ИК-спектров указывает на довольно хорошее отношение «сигнал/шум» в обоих спектрах, но и на отсутствие сколько-нибудь ярких изменений в молекулярной структуре плазминогена в результате обработки HOCl . За исключением, по всей видимости, заметного изменения интенсивности полосы поглощения вблизи 3190 см^{-1} , которая принадлежит валентным колебаниям N-H в составе фрагмента $-\text{NH}(\text{CO})-$ в пептидной цепи. В то же время, в обоих спектрах можно видеть существенное искажение (уход от горизонтали и искривление) базовой линии вследствие непредсказуемого рассеяния, зондирующего ИК луча на различающихся по своему гранулометрическому составу частицах твердого вещества в анализируемых «на пропускание» пробах. С обозначенными выше проблемами в ИК-спектроскопии принято бороться с помощью т.н. разностной спектроскопии или с помощью различных процедур предварительной обработки исходных сигналов для улучшения суммарного качества ИК-спектра. Пример тривиального вычитания спектра, не окисленного плазминогена из соответствующего спектра окисленной пробы с подбором поправочных коэффициентов показан на Рис.5 (кривая 1). Очевидно, что разностный спектр дает существенно больше информации об изменениях в молекулярной структуре плазминогена под действием HOCl . Однако из-за кривизны базовых линий в исходных ИК-спектрах и, следовательно, непредсказуемости нулевой линии

в разностном спектре, надежно отнести разнонаправленные (положительные и отрицательные) полосы поглощения, соответствующие прибыли или убыли конкретных молекулярных фрагментов плазминогена, весьма затруднительно, если это вообще возможно. Поэтому до расчета разностных спектров проводили тщательную коррекцию базовых линий обоих спектров в интерактивном режиме, используя до 100 базовых точек в спектре и до 100 последовательных итераций. Из-за отсутствия в исходных ИК-спектрах некой неизменной полосы поглощения, пригодной для нормировки двух спектров к одинаковой интенсивности, спектры нормировали к единичной суммарной площади всех полос поглощения. В данном случае, с учетом сравнительно небольших изменений в ИК-спектрах плазминогена в результате воздействия HOCl , такой подход представляется оправданным. После этого рассчитывали разностный спектр без использования поправочных коэффициентов. Наконец, чтобы увеличить разрешение или «контрастность» разностного спектра, содержащего множество полос поглощения малой интенсивности, брали вторую производную от этого спектра. Результат такой обработки данных представлена на рисунке 17 Б (кривая 2).

3.5 Результаты проверки методом масс-спектрометрии возникновения модификаций при окислении плазминогена гипохлоритом

Методом масс-спектрометрии были проанализированы образцы плазминогена, не подвергавшиеся воздействию гипохлорита (контроль) и обработанные 50 и 150 мкМ гипохлорита, образцы 1 и 2, (Таблица 2).

Как видно из таблицы 2, различающиеся по структуре аминокислотные остатки повреждаются гипохлоритом с образованием, главным образом, продуктов окисления.

При исследовании окислительной модификации плазминогена методом масс-спектрометрии были проанализированы образцы, не

подвергавшиеся окислению гипохлоритом (контроль), и индуцировано-окисленный белок (опыт).

Таблица 2 – Типы модификаций, обнаруженные методом масс-спектрометрии при окислении плазминогена гипохлоритом.

Тип модификации	Изменение моноизотопной массы пептида	Аминокислоты, в которых обнаружена модификация
Окисление	+15.99	Met
		Pro
		Arg
		Trp
		Tyr
Диокисление	+31.99	Lys
		Met
		Trp
Окисление аргинина до глутаминового полуальдегида	-43.05	Arg
Окисление до нитро-соединения	+44.99	Trp
Хлорирование	+33.96	Tyr
	+67.92	His
Окисление тирозина до 2-аминотирозина	+15.01	Tyr
Окисление триптофана до кинуренина	+3.99	Trp
Окисление триптофана до оксолактона	+13.98	Trp
Окисление триптофана до гидроксикинуренина	+19.98	Trp

В контрольных образцах покрытыми участками оказались: Glu1-Lys90, Gly94-Lys98, Asn101-His168, Lys180-Lys208, Lys212-Arg216, Glu221-Lys329, Gly368-Arg389, Thr393-Gly469, Arg474-Lys509, Asn514-Arg530, Pro551-Lys556, Val562-Arg580, Phe583-His603, Ser608-Lys708, Tyr713-Arg776, Phe780-Arg789, что составляет около 86 % всей первичной структуры белка. В то же время, в образце 1 были идентифицированы следующие пептидные фрагменты: Glu1-Lys19, Gln21-Lys33, Ala44-Arg61, Lys78-Lys90, Asn101-His168, Lys180-Lys204, Gln221-Lys329, Gly368-Lys377, Cys379-Arg389, Thr393-Gly469, Arg474-Lys509, Asn514-Lys556, Val562-Arg580, Phe583-His603, Val616-Lys708, Tyr713-Arg776, Phe780-Arg789 (671аминокислотных остатка, около 85%). Для образца 2 были идентифицированы следующие пептидные фрагменты: Glu1-Lys62, Lys78-Lys90, Asn101-His168, Thr181-Lys208, Gln221-Lys329, Gly368-Arg389, Thr393-Gly469, Arg474-Lys509, Asn514-Lys556, Val562-Arg580, Phe583-Lys708, Tyr713-Arg776, Phe780-Arg789. Таким образом, для всех образцов плазминогена различия в покрытии были крайне незначительные и не выходили за пределы 1-2%. Интересно, что для всех образцов наиболее высокое покрытие было выявлено для серинового, протеазного домена, составляющее около 94%.

В контрольном образце за счет автоокисления в процессе препаративного выделения плазминогена оказались умеренно окисленными четыре метиониновых остатка: Met182 в домене *KR-2*, Met404 в домене *KR-4*, Met585 и Met788 в *SP* домене. При слабом окислении плазминогена гипохлоритом эти остатки были окисленными в той же степени, но был обнаружен дополнительно только один модифицированный остаток Met57, локализованный в *N*-концевом *Par*-домене, который в контрольном образце оставался химически неповрежденным. Полученные масс-спектрометрические данные свидетельствовали о том, что обработка плазминогена большим количеством HOCl/OCl^- вовлекала в окисление значительное количество

аминокислотных остатков, принадлежащих всем структурным частям плазминогена. Кроме упомянутого ранее Met57 в *Pap*-домене, были идентифицированы остатки Tyr80 в домене *KR-1*, Met182 и Trp235 в домене *KR-2*, Trp325 в домене *KR-3*, Met385, Tyr397, Met404 в домене *KR-4*, Trp523 в домене *KR-5*, Met585, Trp685, Trp761, Met788 в каталитическом домене. Что касается остатков Met182, Met404, Met585 Met788, степень их окислительной модификации существенно выросла по сравнению с таковой в образце 1 (рис. 18).

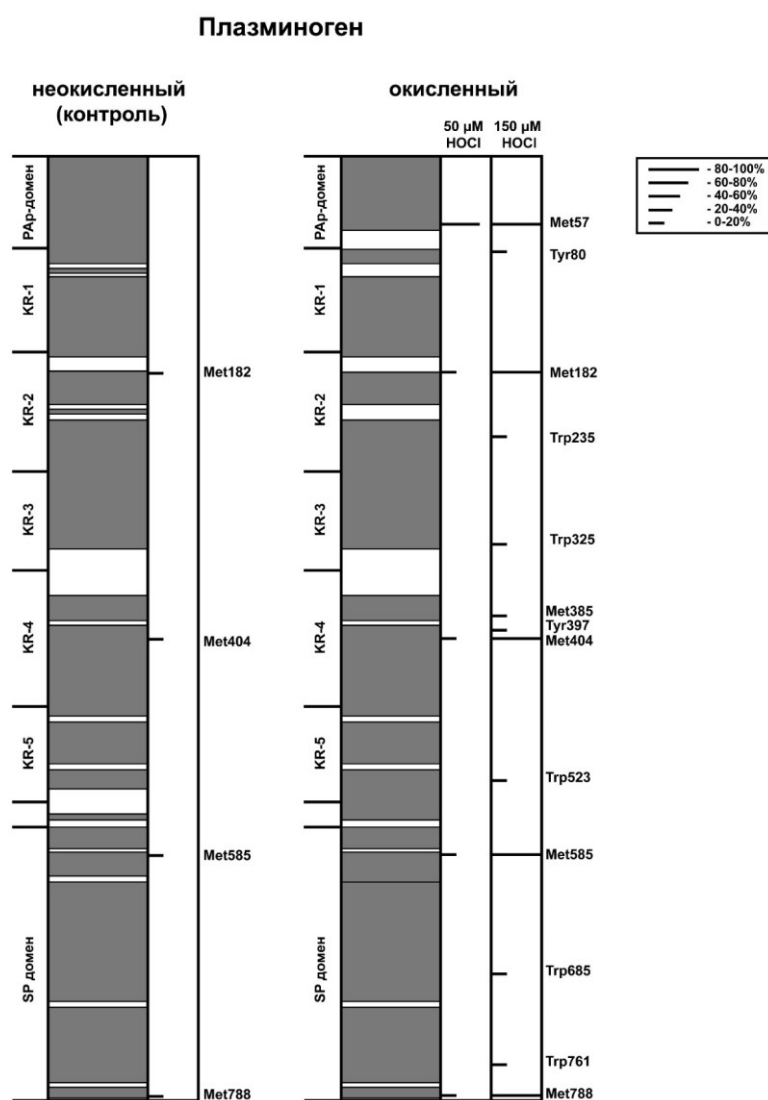


Рисунок 18. Картирование аминокислотных остатков плазминогена в контрольных образцах и при индуцированном окислении белка. % – отношение количества модифицированной аминокислоты к общему количеству данной аминокислоты в пептидном фрагменте. Серым цветом обозначены участки молекулы, детектируемые при анализе.

Как видно, основная доля модифицированных остатков в плазминогене приходится на остатки метионинов и циклических аминокислот, среди которых триптофаны оказались наиболее уязвимыми для окислителя, что хорошо согласуется с реакционной способностью различных аминокислотных остатков в белках к действию HOCl/OCl^- , 150 мкМ/л, вовлекала в окисление значительное количество аминокислотных остатков, принадлежащих всем структурным частям плазминогена (рис. 19). Кроме упомянутого ранее Met57 в *Par*-домене, были идентифицированы остатки Tyr80 в домене *KR-1*, Met182 и Trp235 в домене *KR-2*, Trp325 в домене *KR-3*, Met385, Tyr397, Met404 в домене *KR-4*, Trp523 в домене *KR-5*, Met585, Trp685, Trp761, Met788 в каталитическом домене. Что касается остатков Met182, Met404, Met585 Met788, степень их окислительной модификации существенно выросла по сравнению с таковой в образце 1. Как видно, основная доля модифицированных остатков приходится на метиониновые остатки и циклические аминокислоты, среди которых триптофаны оказались наиболее доступными к окислителю. Обращает на себя внимание тот факт, что лишь один из множественных лизиновых остатков плазминогена, имеющих в покрытии, был подвержен окислительной модификации. Возможные причины этого будут рассмотрены в следующем разделе.

Анализ результатов окисления плазмина показал присутствие новых модификаций, как в контрольном образце, так и в опытных образцах. Среди дополнительных окислительных сайтов в образце 5, отсутствующих в неокисленном плазмине, идентифицированы Tyr132 в домене *KR-1*, Trp190 и Arg234, в домене *KR-2*, Arg408 и Trp417 в домене *KR-4*, Asp485, Trp486 в домене *KR-5*, Tyr672 в каталитическом *SP* домене. Хочется отметить, среди новых окислительных модификаций отсутствуют остатки метионинов.

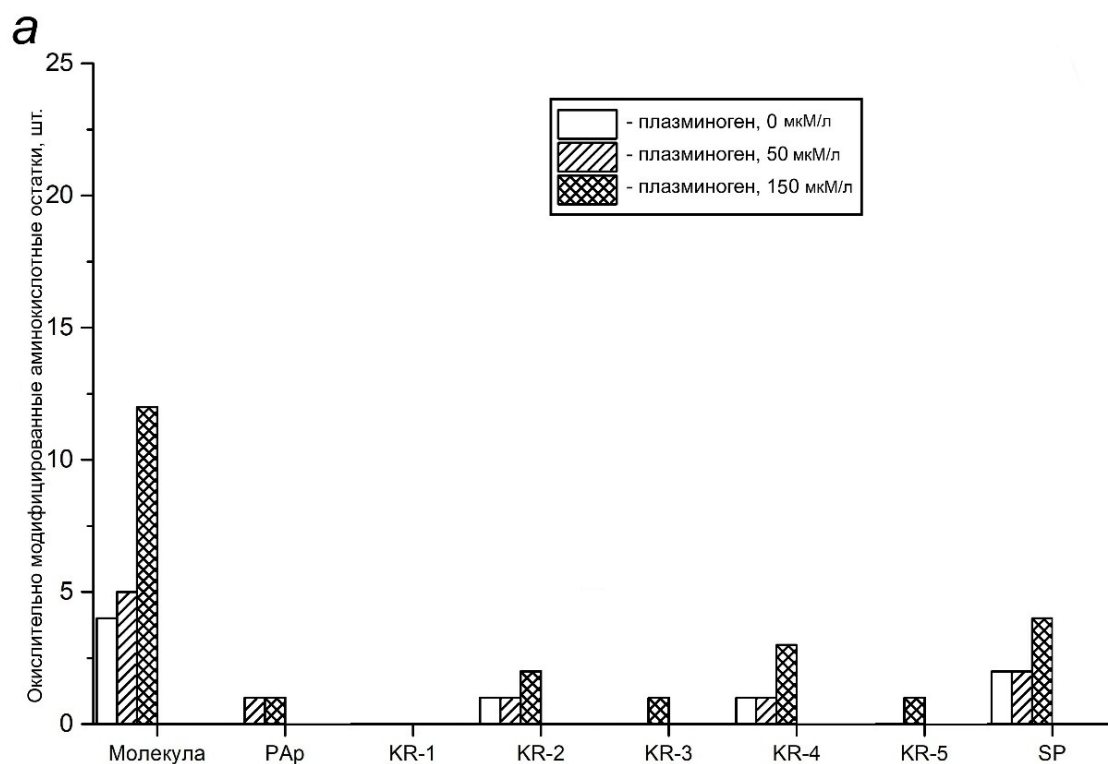
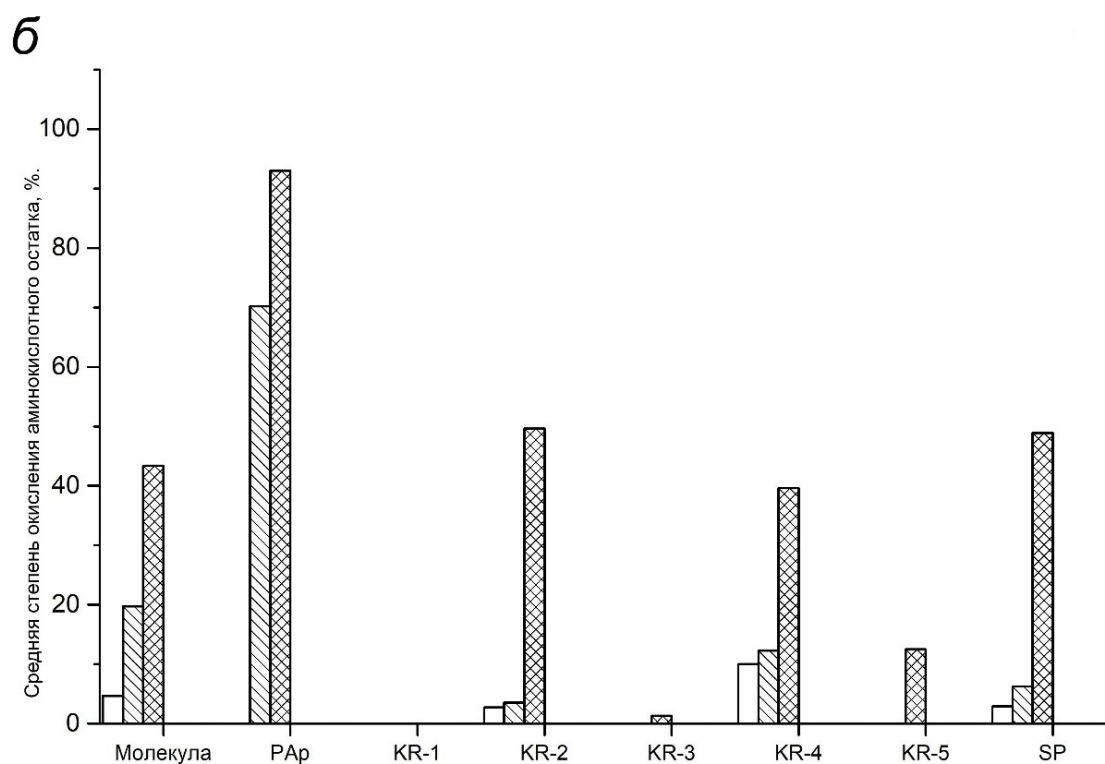


Рисунок 19. Распределение окисленных аминокислотных остатков (а) и их средней степени окисления (б) по структурным элементам молекулы плазминогена.

Средняя степень окисления аминокислотного остатка рассчитывалась как отношение суммы степеней окисления аминокислотных остатков к количеству окисленных аминокислотных остатков в структурном элементе, либо в целой молекуле плазминогена.

Масс-спектрометрические данные показывают, что при обработке плазмينا HOCl обнаруживаются дополнительные окислительные сайты, отсутствующие в окисленном плазминогене (рис. 20). Это является индикатором разрыхления структуры фермента, делающего его более уязвимым к окислению.

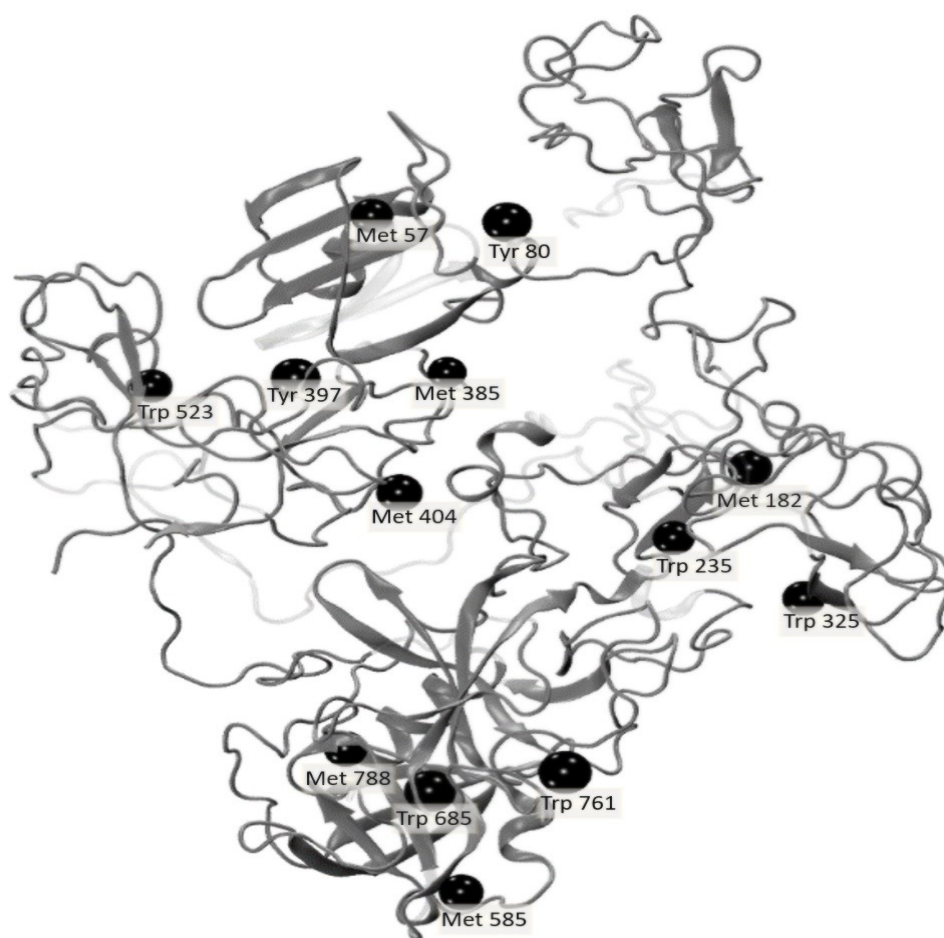


Рисунок 20. Структура молекулы плазминогена человека, основанная на данных рентгеноструктурного анализа (PDB ID: 4DUR).

Черные кружки на рисунке 29 – окислительные сайты, идентифицированные методом масс-спектрометрии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения бакалаврской работы было исследовано индуцированное гипохлоритом окисление плазминогена.

По результатам исследования можно сделать следующие **выводы**:

1. Выделен плазминоген и оценены его гомогенность и функции. Снижение протеолитической активности плазмина, полученного из окисленного плазминогена, подтверждается результатами фотометрии и электрофореза.

2. Произведено картирование молекул исследуемых белков методом масс-спектрометрии высокого разрешения и определено окислительно модифицированные аминокислотные остатки. Показано, что 50 мкМ окислителя вовлекало в процесс окисления только крингл-домены *KR-2*, *KR-4* и сериновый, протеазный домен *SP*, в то время как при количестве окислителя 150 мкМ все структурные области плазминогена были окислены. Основная доля модифицированных остатков в плазминогене приходится на остатки метионинов и триптофанов.

3. Сопоставлены локализации окислительных модификаций в аминокислотных остатках исследуемого белка с возможными функциональными и структурными нарушениями. Данные ИК спектроскопии показывают, что под действием окислителя на Glu-плазминоген его вторичная структура подверглась перестройкам, отражающимся в снижении содержания α - и 310-helices, β - turns, random coils на фоне существенного увеличения β -sheets.

4. Показанно влияние физиологического окислителя – гипохлорита на молекулу плазминогена. Достаточно высокая толерантность плазминогена к окислению обусловлена как его закрытой конформацией, так и способностью некоторых из остатков метионинов служить ловушками АФК.

Совокупность полученных результатов позволяет сделать вывод о том, что молекула плазминогена проявляет достаточно высокую толерантность к действию окислителя, что может быть обусловлено как его закрытой конформацией, делающей недоступными для окисления ключевые в функциональном отношении аминокислотные остатки, так и способностью некоторых из остатков метионинов служить ловушками АФК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айсина Р. Б., Мухаметова Л. И. структура и функции системы плазминоген/плазмин // Биоорганическая химия. 2014. С. 642-657.
2. Арцукевич А.Н., Мальцев А.Н., Зинчук В.В. // Биохимические аспекты жизнедеятельности биологических систем. Сбор. науч. трудов съезда биохимиков Беларуси. Гродно. 2000. С. 19-23.
3. Болдырев А.А., Юнева М.О. Сорокина Е.В. Антиоксидантные системы в тканях мышей с ускоренным темпом старения // Биохимия. 2006. С. 1157-1163.
4. Гриценко Т. В., Деградация стрептокиназы и каталитические свойства комплекса плазмин-стрептокиназа // Биохимия. 2002. С. 50-57.
5. Дубинина Е. Е., Гавровская С.В, Кузьмич Е.В. Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование битирозина в очищенных белках с использованием системы Фентона // Биохимия. 2002. С. 413-421.
6. Кузник Б. И. Система гемостаза // Физиология человека М.: Медицина. 2000. С. 313-325.
7. Ласточка А.Ю. Влияние ионизирующего излучения на белки, группы RCO, расщепление пептидной связи, инактивацию, окисление -SH // Радиационная химия органических соединений. 2000. С. 211-224.
8. Матсука И.В. Локализация и структурная характеристика лизинсвязывающих участков молекулы плазминогена // Украинский биохимический журнал. 1990. С. 83-86.
9. Розенфельд М.А., Юрина Л.В, Васильева А.Д. Свободно-радикальное окисление фрагментов d и e фибриногена // Доклады академии наук. 2014. С. 106-120.
10. Фархутдинова Л.М. Окислительный стресс, история вопроса // Вестник академии наук. 2015. С. 123-125.

11. Юсова Е.И. Низкомолекулярная стрептокиназа и эффект фибрина, Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев: 2013. С. 20.
12. Aebersold, R., M. Mann. Mass spectrometry-based proteomics // Nature. 2003. P. 198-207.
13. Annesley T, Rockwood A.L. Mass Spectrometry – Of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. USA: 2006. – Chapter 7. P. 165-190.
14. Armstrong R.C. Pulsed and gamma radiolysis of aqueous solutions of tryptophan // Radiation Research. 2009. P. 563-579.
15. Binder B.R. Fibrinolysis // The journal of immunology. 1995. P. 3-8.
16. Burcham P.C., Kuhan Y.T. The introduction of carbonyl groups in the products of lipid peroxidation of malonic dialdehyde // Biochemical and Biophysical Research. 2006. P. 220.
17. Castellino F.J., Ploplis V.A. Structure and function of the plasminogen/plasmin system // Thrombosis and Haemostasis 2005. P. 647-654.
18. Cederholm-Williams S.A., Ponting C.P. Kinetics of the reactions between streptokinase, plasmin, alpha 2-antiplasmin // Biochemistry. 1979. P. 125-132.
19. Chuenstein E., Esterbauer H. Formation and properties of reactive aldehydes // CIBA Found Symp. 2010. P. 225-244
20. Closer B.M., Kalebic T. Developmental of the Vascular System // BMC Part of Springer nature. 2008. P. 150-162.
21. Collen D., Lijnen H. R. The fibrinolytic system in man // Critical reviews in oncology. 2006. P. 249-301.
22. Collen D., Lijnen H. R. Tissue-type plasminogen activator, mechanism of action and thrombolytic properties // Blood. 2003. P. 25-32.
23. Crawley J.T., Zanardelli S. The central role of thrombin in hemostasis // Thrombosis and Haemostasis. 2007. P. 95-101.
24. Deutsch, D. G., Mertz E. J. // Science. 1970. V. 170. P. 1095-1096.
25. Fenn J.B. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules // Science. 1989. P. 64-71.

26. Friguet B, Stadman E.R. Modification of glucose-6-phosphate dehydrogenase 4-hydroxy-2-nonenal // *Biological Chemistry*. 2007. P. 639-643.
27. Furie B.C. Mechanisms of thrombus formation // *Journal of Medicine*. 2008. P. 938-949.
28. Fuss C., Palmaz J.C. Fibrinogen: structure, function, and surface interactions // *Vascular Interventional Radiology*. 2001. P. 677-682.
29. Galetskiy, D., Lohscheider, J. N., Kononikhin, A. S., Popov, I. A., Nikolaev, E. N., Adamska I. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2011. V. 25. P. 184-190.
30. Garrison W.M. Reaction mechanisms during radiolysis of peptides, polypeptides and proteins // *Chemical Reviews*. 2004. P 381-398.
31. Garrison W.M., Bennett W. Radiation induced protein oxidation in aqueous solution // *Radiation Research*. 2011. P. 483-502.
32. Gugliucci A. // *Clinical Chemistry Lab. Med.* 2008. V. 46. P. 1403-1409.
33. Guptasarma P, Matsugo S. Hydroxyl radical mediated - protein derivatives with a special focus on crystalline properties // *Biochemistry*. 1992. P. 296-302.
34. Handin R.I. Bleeding and thrombosis // *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 2005. P. 110-115.
35. Herbst K.D., Rapaport S.I. Syndrome of an acquired inhibitor to factor VIII responsive to cyclophosphamide and prednisone // *Annals of Internal Medicine*. 1998. P. 575-578.
36. Jensen, O.N. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry // *Current Opinion in Chemical Biology*. 2004. P. 33-41.
37. John F. K. Kearney J. *Oxidative Stress and Vascular Disease*. – USA: 2000. P. 80-90.
38. Karas, M., Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons // *Analytical Chemistry*. 1988. P. 2299-2301.
39. Kristal B.S. Synergistic Induction of Aging by Free Radicals and Reactions // *Gerontology*. 1992. P. 104-107.

40. Lehrer M. Mass Spectrometry: Theory and Practice in Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation. – USA: 2003. P. 171-86.
41. Lijnen H.R., Collen D. // Biological Chemistry. – USA: 2005. P. 214-222.
42. Mann, M., O.N. Jensen. Proteomic analysis of post-translational modifications // Nature Biotechnology. 2003. P. 255-261.
43. Marx V. Making sure PTMs are not lost after translation // Nature Methods. 2013. P. 201-204.
44. Meisenhelder J., Phosphopeptide mapping and identification of phosphorylation sites. Current Protocols in Protein Science. 2001. P. 21-25.
45. Meng F. Detection and localization of protein modifications by high-resolution tandem mass spectrometry // Mass Spectrometry Reviews. 2005. P. 126-134.
46. Mills J.D. Ariens R.A. Altered fibrin clot structure in the healthy relatives of patients with premature coronary artery disease // Circulation. 2002. P.138 – 42.
47. Monnier V. Nonenzymatic glycosylation, Maillard reaction and the aging process // Gerontolю. 1990. P. 106-111.
48. Novohatny V.V. Biochemistry of animals and humans // Chemical Reviews. 1981. P. 31-46
49. Parrado J., Smith R. The domain organization of streptokinase: nuclear magnetic resonance, circular dichroism, and functional characterization of proteolytic fragments // Protein Science. 1996. P. 693-704.
50. Ponting C.P., Marshall J.M. Fibrinolysis // Blood. 2002. P. 605-614.
51. Praior W.A. Uppu R.M. Kinetic model of competitive reactions of ozone with amino acid residues in proteins in reverse micelles // Biological Chemistry. 2003. P. 120-126.
52. Raha S., Robinson B.H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and aging // Trends Biochemical Sciences. 2000. P. 502-508.
53. Ranby M., Bergsdorf N. Enzymatic properties of the one- and two-chain form of tissue plasminogen activator // Thrombosis Research 2002. P. 175-183.

54. Reddy K., Markus G. Esterase activities in the zymogen moiety of the streptokinase-plasminogen complex // *Biological Chemistry*. 2004. P. 851-857.
55. Sadygov, R.G. Large-scale database searching using tandem mass spectra: looking up the answer in the back of the book // *Nature Methods*. 2004. P. 195-202.
56. Siefring G., Castellino F. Interaction of streptokinase with plasminogen. Isolation and characterization of a streptokinase degradation product // *Biological Chemistry*. 2006. P. 913-920.
57. Torr S. R., Nachowiak D.A. Plasminogen steal and clot lysis // *American College Cardiology*. 1992. P. 1085-1090.
58. Uchida K, Stadman E.R. Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: the possible involvement of intra- and intermolecular cross-links // *Biological Chemistry*. – 1993. P. 388-393.
59. Uchida K, Stadman E.R. New mechanism of oxidative damage to prolyl peptides induced by hydroxyl radicals // *Biochemistry Biophysics Research Communications* 1990. P. 265-271.
60. Uchida K., Stadtman E.P. Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: the possible involvement of intra- and intermolecular crosslinking // *Biological Chemistry* 1993. P. 388-393.
61. Vasilyeva A. D., Yurina L.V. Proteins and Proteomics // *BBA*. 2018. P. 875-884.
62. Vlassara H, Brownlee M. Glucose and aging // *Medical Biochemistry*. 1987. P. 90-96.
63. Walker, J. B., Nesheim, M. E. The Molecular Weights, Mass Distribution, Chain Composition, and Structure of Soluble Fibrin Degradation Products Released from a Fibrin Clot Perfused with Plasmin // *Biological Chemistry*. 1999. P. 5201-5212.
64. Wang S., Reed G. Zymogen activation in the streptokinase-plasminogen complex. Ile1 is required for the formation of a functional active site // *Biochemistry*. 2000. P. 394-401.

65. Weigandt K. M., White, N., Chung, D., Ellingson, E., Wang, Y., Fu, X., Pozzo D.C. // Biophys. J. 2012. V. 103. P. 2399-2407.
66. Wells M.C., Huggins T.G. Oxidized amino acids in the protein of the lens with age // Biological Chemistry. 2003. P. 234-252.
67. Winchester R.V, Leenn K.R. Radiolysis of some tryptophan dipeptides // Radiate Biology. 2007. P. 541-549.
68. Wolf S.P., Dean R.T. Free radicals, lipid and protein breakdown // TIBS. 2009. P. 27-33.
69. Wun T. C. Plasminogen activation: biochemistry, physiology and therapeutics // Critical Reviews. Biotechnology. 1988. P. 131-148.
70. Yates, J.R. Proteomics of organelles and large cellular structures // Nature Reviews Molecular Cell Biol. 2005. P. 702-714.
71. Hang L, Fowler B.J. Plasminogen has a broad extrahepatic distribution // Thromb Haemostasis. 2002. P. 493-501.
72. Zuev Y. F. Conformational Flexibility and Self-Association of Fibrinogen in Concentrated Solutions // Physical Chemistry. 2017.P. 833-843