

УДК 577.322.75

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМИЧЕСКОЙ ДЕНАТУРАЦИИ МОЛЕКУЛЫ ПЛАЗМИНОГЕНА ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ ОКИСЛЕНИИ

© 2024 г. Л. А. Вассерман¹, Е. С. Гаврилина¹, Л. В. Юрина^{1*},
А. Д. Васильева¹, М. А. Розенфельд¹¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: lyu.yurina@gmail.com

Поступила в редакцию 26.03.2024;
после доработки 24.04.2024;
принята в печать 20.05.2024

Статья посвящена исследованию термической денатурации молекулы плазминогена при индуцированном окислении гипохлоритом в концентрациях 30, 62.5, 125 и 250 мкМ. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии было определено, что в присутствии окислителя энтальпия денатурации молекулы плазминогена понижается. Наиболее заметно это проявляется для пика, показывающего плавление крингл-доменов K4–K5. Эти результаты согласуются с полученными ранее данными по окислительной модификации аминокислотных остатков плазминогена, обработанного гипохлоритом в разных концентрациях, с использованием метода tandemной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС). В совокупности полученные данные и результаты предыдущих исследований показывают, что структура полноразмерного плазминогена адаптирована к умеренному окислению, индуцированному HOCl.

Ключевые слова: плазмин(оген), окисление, термическая денатурация, дифференциальная сканирующая микрокалориметрия.

DOI: 10.31857/S0207401X24110058

1. ВВЕДЕНИЕ

Плазминоген является предшественником сериновой протеазы плазмина. Полноразмерный плазминоген (Glu-плазминоген) состоит из 791 аминокислотного остатка и семи доменов — N-концевого PAN-apple домена (PAr), пять крингл-доменов (K1–K5) и серинового протеазного (SP) домена. В физиологических условиях плазминоген превращается в плазмин путем расщепления пептидной связи в петле активации (между Arg561 и Val562) тканевым активатором плазминогена (tPA) или урокиназным активатором плазминогена (uPA) [1, 2]. Плазминоген может принимать две различные конформации, называемые закрытой и открытой. Полноценный плазминоген циркулирует в закрытой конформации и может принимать открытую конформацию при связывании с фибрином или поверхностью клетки. Отщепление PAr-домена от молекулы плазминогена приводит к образованию его альтернативной формы, называемой Lys-плазминогеном, которая принимает открытую конформацию [1]. Плазминоген в открытой конформации принимает гибкую

форму “бусинок на нити”, в которой активационная петля более доступна для расщепления tPA или uPA.

Плазмин(оген) рассматривают в качестве ключевого участника процессов фибринолиза, гемостаза, деградации внеклеточного матрикса и заживления ран. Помимо этого, существуют как прямые, так и косвенные способы, при использовании которых плазминоген и белки системы активации способствуют воспалению, и в последнее время особое внимание уделяется роли плазминогена в регуляции, развитии и прогрессировании заболеваний с воспалительным компонентом. Образование активных форм кислорода (АФК) играет центральную роль в прогрессировании многих воспалительных заболеваний. Нарушение баланса между генерацией АФК и работой антиоксидантных систем организма приводит к чрезмерной выработке АФК. Хлорноватистая кислота (HOCl — OCl) — основной сильный окислитель, вырабатываемый нейтрофилами, и мощный бактерицидный агент. *In vitro* один миллион стимулированных нейтрофилов может произво-

доть 0.1 мкМ HOCl. Такая концентрация HOCl может уничтожить около 15 миллионов бактерий *Escherichia coli* менее чем за 5 мин [3]. Хотя HOCl обладает мощными бактерицидными свойствами и играет важную роль в иммунном ответе, этот окислитель также вызывает повреждение биологических молекул. Концентрации HOCl *in vivo* оцениваются в диапазоне 12–250 мкМ [4].

В ранее проведенных работах нами были выявлены участки окислительных модификаций молекулы плазминогена при индуцированном окислении. Был проанализирован вклад этих модификаций в нарушение структуры и функции исследуемого белка. Был выявлен ряд модификаций функционально значимых остатков ароматических аминокислот (Trp235, Trp417, Trp427, Tyr672 и Trp761), предположительно ответственных за снижение биологической активности плазмина, образованного из окисленного плазминогена. Легко окисляемые остатки метионинов Met57, Met182, Met385, Met404, Met585 и Met788, расположенные в различных частях плазминогена, вероятно, служат перехватчиками АФК. В совокупности данные предыдущих исследований показывают, что структура Glu-плазминогена адаптирована к умеренному окислению, индуцированному HOCl [5].

Цель данной работы — исследование влияния индуцированного гипохлоритом окисления плазминогена на устойчивость структуры его отдельных областей к тепловой денатурации. В данной работе результаты, полученные методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСК) были сопоставлены с полученными ранее результатами масс-спектрометрии по идентификации окислительных сайтов в белке при его обработке вышеупомянутым окислителем [5]. Это позволит глубже понять механизм повреждения структуры и функции модифицированного белка.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы

Объединенный пул образцов донорской плазмы крови был получен от ФГБУ “НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева” Минздрава России.

Полноразмерный плазминоген выделяли из плазмы крови человека методом аффинной хроматографии на Lys-Sepharose 4B, производства компании (Amersham, Britain) при 4 °C и pH 8.0

[6]. Концентрирование и замену буфера на 50 мМ фосфатный буфер, содержащий 150 мМ NaCl при pH 7.4, осуществляли с помощью центробежных фильтров Amicon Ultra (10 кДа, UFC501096, Merck, Germany) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию белка измеряли спектрофотометрически на длине волны $\lambda = 280$ нм. Гомогенность плазминогена оценивали методом электрофореза в полиакриламидном геле (4%-ый концентрирующий гель, 12%-ный разделительный гель) восстановленных образцов в присутствии 1%-ного β -меркаптоэтанола в буфере Лэммли [7].

Фибриноген (ФГ) очищали из плазмы человека путем осаждения глицином [8–10] и растворяли в 50 мМ фосфатном буфере, содержащем 150 мМ NaCl, при pH 7.4.

Плазминоген (3 мг/мл) обрабатывали HOCl в разных концентрациях (30, 62.5, 125 и 250 мкМ на 1 мг плазминогена) в течение 1 ч при температуре 37 °C. Реакцию останавливали при десятикратном избытке L-метионина [11, 12].

Превращение плазминогена в плазмин осуществляли с помощью стрептокиназы (Beringwerke, Germany) в молярном соотношении плазминоген:стрептокиназа 100:1 [13]. Время инкубации смеси плазминогена и стрептокиназы составляло 40 мин при 37 °C.

Для оценки влияния окисления молекулы плазминогена на образование продуктов гидролиза фибрина к 125 мкл раствора фибриногена (2 мг/мл) добавляли 15 мкл плазмина (0.1 мг/мл) и инкубировали в течение 30 мин при 37 °C. Реакцию останавливали путем добавления буфера для образцов с додецилсульфатом натрия без β -меркаптоэтанола и нагреванием при 90 °C в течение 5 мин. Образование продуктов деградации фибрина в результате гидролиза плазмином определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (5%-ный концентрирующий гель, 8%-ный разделяющий гель) в присутствии додецилсульфата натрия.

Термодинамические параметры денатурации плазминогена (3.0 мг/мл) в отсутствие и в присутствии окислителя (гипохлорита натрия) в разных концентрациях определяли с помощью высокочувствительной ДСК на микрокалориметре ДАСМ-4 (Пушино, Россия). Объем образца составлял 0.5 мл в закрытой ячейке. Измерения проводили в области температур 10–90 °C при

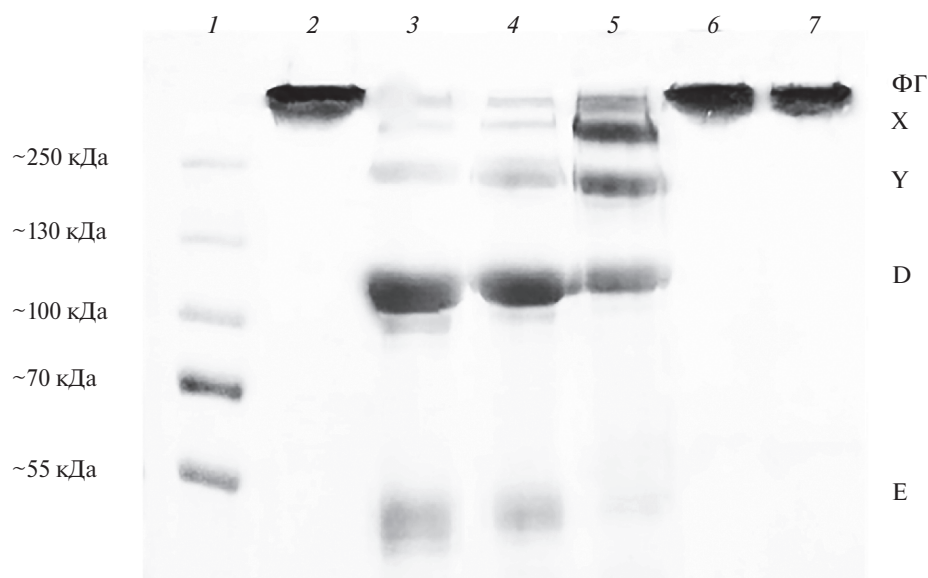


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов деградации фибриногена ФГ, образованных под воздействием плазмина (5%-ный концентрирующий гель, 8%-ный разделяющий гель). Дорожка 1 – маркерные белки; 2 – негидролизированный фибриноген; 3 – гидролиз фибриногена плазмином, образованным из неокисленного плазминогена; продукты распада фибриногена, продуцируемые плазмином, образованные из: 4 – плазминогена, обработанного 30 мкМ HOCl/OCl^- ; 5 – плазминогена, обработанного 62.5 мкМ HOCl/OCl^- ; 6 – плазминогена, обработанного 125 мкМ HOCl/OCl^- ; 7 – плазминогена, обработанного 250 мкМ HOCl/OCl^- .

постоянном давлении 2.5 МПа и скорости нагревания $1^\circ\text{C}/\text{мин}$. Шкалу избыточной теплоемкости для каждого эксперимента калибровали с помощью эффекта Джоуля–Ленца [14]. В качестве раствора сравнения при измерении использовали 50 мМ фосфатный буфер (150 мМ NaCl, pH 7.4).

Средние значения термодинамических параметров денатурации определяли из не менее чем трех параллельных измерений. Значение температуры денатурации каждого перехода соответствовало его максимуму на термограмме. Значение экспериментальной энтальпии денатурации соответствовало площади под пиком кривой избыточной теплоемкости как функции температуры. Энтальпию денатурации и температуры переходов определяли с помощью программы НАИРТА, ИНЭОС РАН. Расчет молярной энтальпии денатурации (ΔH) проводили на 1 моль плазминогена.

Для деконволюции термограмм применяли программу Peak Fit (AISN Software Incorporated, Vers. 4). Рассчитывали термодинамические параметры, соответствующие каждому термодинамическому переходу.

Результаты

Опосредованный плазмином гидролиз фибриногена приводил к накоплению продуктов распада

фибриногена – фрагментов X, Y, D и E. Окисление плазминогена 30 мкМ HOCl/OCl^- (рис.1, дорожка 4) практически не влияло на накопление продуктов распада фибриногена по сравнению с таковыми для контрольного образца (дорожка 3). При окислении плазминогена 62.5 мкМ HOCl/OCl^- (дорожка 5), наблюдалось снижение активности образованного из него плазмина, о чем свидетельствует снижение содержания позднего продукта распада фибриногена, фрагмента E, и увеличение количества ранних и промежуточных продуктов, фрагментов X и Y; при этом сохраняется часть исходного фибриногена. В то же время при более высокой дозе окислителей (125 и 250 мкМ HOCl/OCl^-) ферментативная активность молекул плазмина практически исчезает, о чем свидетельствовала сохранность большей части исходного фибриногена (дорожки 6 и 7).

На рис. 2 представлены ДСК-термограммы, а в табл. 1 приведены термодинамические параметры денатурации интактного плазминогена и в присутствии окислителя при разных его концентрациях. В качестве окислителя использовали гипохлорит натрия.

Из приведенных на рис. 2 ДСК-термограмм видно, что на кривых денатурации плазминогена наблюдаются три перехода: низкотемпературный

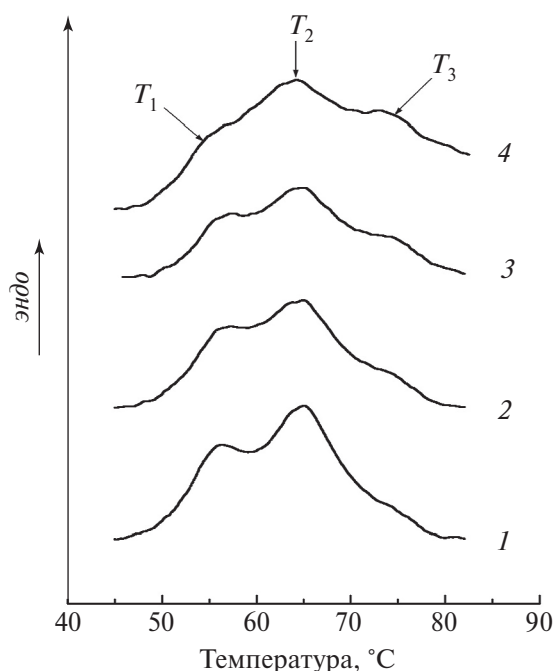


Рис. 2. ДСК-Термограммы денатурации контрольного образца плазминогена (1) и образцов, обработанных гипохлоритом натрия в разных концентрациях: 62.5 мкМ (2), 125 мкМ (3), 250 мкМ (4), 50 мМ фосфатный буфер, pH 7.4, 150 мМ NaCl, концентрация плазминогена – 3 мг/мл; T_1 , T_2 , T_3 – температуры денатурации переходов.

в области 56–58 °С, промежуточный (второй) в области 65 °С и высокотемпературный в области 74 °С. Наличие нескольких температурных переходов на ДСК-термограммах наблюдали и ранее [15]. Следует отметить, что при повторном сканировании на ДСК-термограмме не наблюдается каких-либо температурных переходов, что коррелирует с литературными данными для применяемых условий (pH 7.4) [15]. Ранее было показано, что в нейтральных средах денатурация плазминогена происходит необратимо, тогда как в кислых средах она является обратимым процессом [15, 16].

Таблица 1. Термодинамические параметры денатурации контрольного и обработанных HOCl образцов плазминогена 50 мМ (фосфатный буфер, pH 7.4, 150 мМ NaCl)

Концентрация окислителя, мкМ	ΔH , кДж/Моль	T_1 , °С	T_2 , °С	T_3 , °С
0	1.48 ± 0.13	56.3 ± 0.1	65.1 ± 0.1	74.2 ± 0.1
62.5	1.25 ± 0.13	57.1 ± 0.1	65.0 ± 0.2	73.6 ± 0.1
125	1.02 ± 0.11	57.3 ± 0.1	63.7 ± 0.1	74.0 ± 0.1
250	0.78 ± 0.13	57.7 ± 0.1	65.1 ± 0.2	74.1 ± 0.1

Примечание: T_1 , T_2 и T_3 – температуры денатурации переходов (доменов); ΔH – суммарная энтальпия денатурации плазминогена.

При окислении плазминогена гипохлоритом натрия наблюдается уменьшение общей молярной энтальпии денатурации. При этом температура низкотемпературного перехода с увеличением концентрации окислителя немного возрастает, а температуры второго и высокотемпературного переходов близки к соответствующим значениям для контрольного образца плазминогена. Очевидно, что окислительная модификация плазминогена гипохлоритом натрия сопровождается нарушениями структуры белка. Причем, чем больше концентрация окислителя, тем больше окислительная модификация плазминогена.

Известно, что деконволюция функции избыточной теплоемкости позволяет разрешить все температурные переходы и оценить их термодинамические параметры (температуру и энтальпию) [17]. Деконволюцию кривых теплоемкости делали, исходя из модели независимых переходов “все или ничего”. Результаты деконволюции приведены на рис. 3 и в табл. 2.

Показано, что в нейтральной среде структура молекулы плазминогена представлена в виде семи доменов, которые соединены пептидными связями [6]. В плазминогене присутствуют пять крингл-структур между аминокислотными остатками 79–560. Каждая крингл-структура является независимой единицей и может плавиться кооперативно или более-менее независимо от других доменов плазминогена.

Из приведенных данных видно, что температура денатурации низкотемпературного перехода при увеличении концентрации окислителя практически не меняется, что сопровождается уменьшением доли молярной энтальпии перехода в общей экспериментальной энтальпии денатурации и значения энтальпии перехода по сравнению с соответствующими значениями для контрольного образца плазминогена. Можно предположить, что

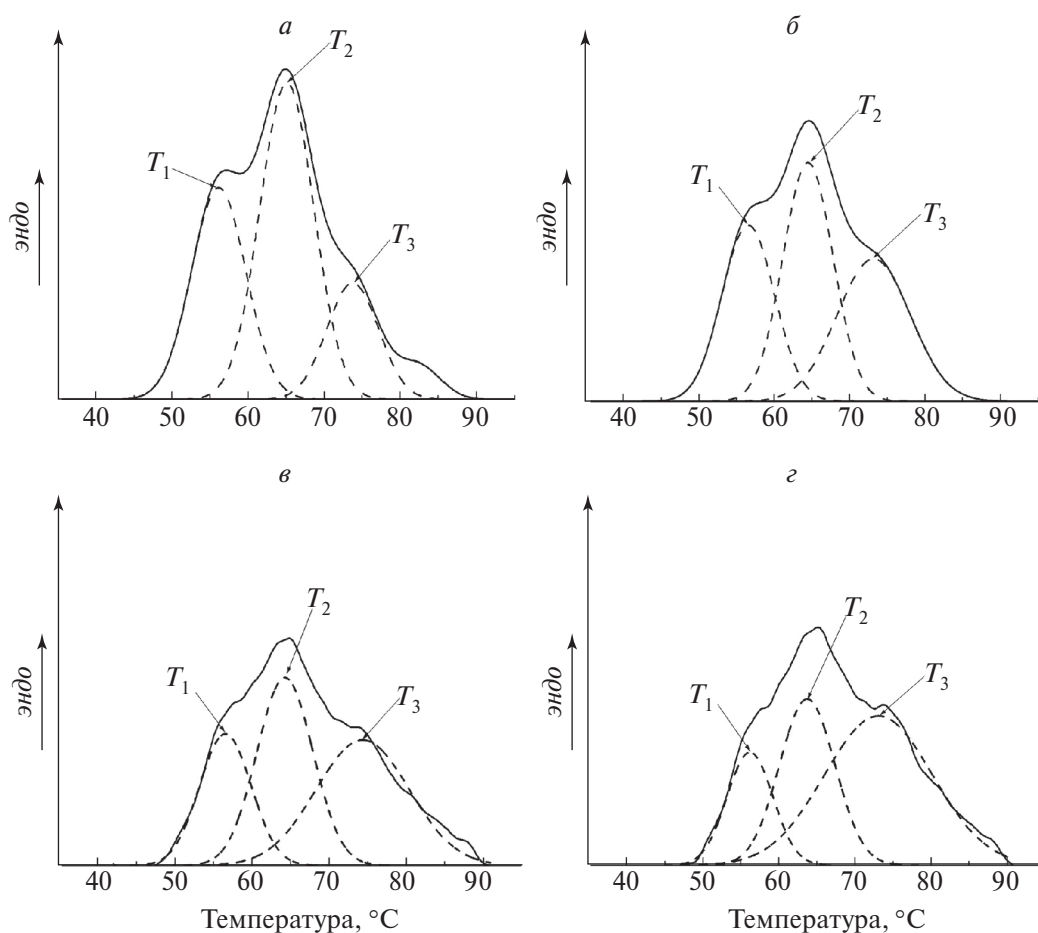


Рис. 3. Деконволюция ДСК-термограмм денатурации контрольного образца плазминогена (а) и образцов, обработанных гипохлоритом натрия в разных концентрациях: 62.5 мкМ (б), 125 мкМ (в); 250 мкМ (г) на 1 мг белка; 50 мМ фосфатный буфер, рН 7.4, 150 мМ NaCl, концентрация плазминогена – 3 мг/мл. Сплошные линии – экспериментальная ДСК-термограмма, штриховые – результат деконволюции ДСК-термограмм, где T_1 , T_2 и T_3 соответствуют температурным переходам.

с увеличением концентрации окислителя происходит большее нарушение структуры доменов, ответственных за низкотемпературный переход, что сопровождается уменьшением их доли в общей молярной экспериментальной энтальпии денату-

рации и энтальпии низкотемпературного перехода плазминогена. Температура денатурации, как и доли молярной энтальпии перехода в общей экспериментальной энтальпии денатурации, а также значения энтальпии перехода второго темпера-

Таблица 2. Результаты деконволюции термограмм денатурации контрольного образца плазминогена и образцов, обработанных HOCl 50мМ (фосфатный буфер, рН 7.4, 150 мМ NaCl)

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	56.1	32.0	0.47	65.0	46.6	0.69	74.0	21.4	0.32
62.5	56.5	29.3	0.37	64.4	37.8	0.47	73.2	33.0	0.41
125	56.4	23.5	0.24	64.3	36.3	0.37	74.4	40.2	0.41
250	56.2	17.1	0.13	63.7	30.3	0.24	73.1	52.6	0.41

Примечание: T_1 , T_2 и T_3 – температуры денатурации переходов (доменов); α_1 , α_2 и α_3 – доли молярной энтальпий переходов(доменов) в общей экспериментальной энтальпии денатурации; ΔH_1 , ΔH_2 , ΔH_3 – энтальпии переходов, полученные исходя из общей экспериментальной молярной энтальпии плавления.

турного пика с увеличением концентрации гипохлорита натрия уменьшаются по сравнению с соответствующими показателями для контрольного образца плазминогена. Таким образом, в результате действия окислителя также происходят нарушения в структуре доменов, ответственных за этот температурный переход. Температура перехода в области 74 °С практически не меняется с увеличением концентрации окислителя, но доли молярной энтальпии перехода в общей экспериментальной энтальпии денатурации возрастают. При этом значение энтальпии денатурации незначительно увеличивается при концентрации гипохлорита натрия 62.5 мкМ по сравнению с соответствующим значением для контрольного образца плазминогена, и дальнейшее увеличение концентрации окислителя не влияет на данную характеристику. Поэтому можно предположить, что некоторые домены, ответственные за данный температурный переход, проявляют большую устойчивость к воздействию окислителя.

Таким образом, при окислении плазминогена наблюдается нарушение структуры доменов, ответственных за низкотемпературный и второй температурный переход. В то же время домены, ответственные за высокотемпературный переход, более устойчивы к окислению.

Согласно [15], низкотемпературный переход соответствует плавлению крингл-доменов K1–K3, второй переход соответствует плавлению K4–K5, а также PAr-домена, высокотемпературный – серинового протеазного домена.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По данным ДСК известно, что в присутствии окислителя энтальпия денатурации молекулы плазминогена понижается. Наиболее заметно это проявляется для пика, показывающего плавление доменов K4–K5, что согласуется с полученными ранее методом ВЭЖХ-МС/МС данными по окислительной модификации аминокислотных остатков плазминогена, обработанного гипохлоритом в разных концентрациях. Наибольшему окислению подвергается крингл-домен K–4. В этом домене были идентифицированы следующие окисленные аминокислотные остатки: Met385, Tyr397, Met404 и Trp417. В крингл-доме K-5 были обнаружены два окисленных аминокислотных остатка триптофана – Trp486 и Trp523. В

PAN-apple домене был идентифицирован только окисленный Met57 [5].

Доля молярной энтальпии низкотемпературного перехода, соответствующего плавлению крингл-доменов 1–3, снижается несколько меньше. Согласно данным масс-спектрометрии в K-1 были обнаружены окисленные Tyr80 и Trp 108. В K-2 были выявлены окислительные модификации следующих аминокислотных остатков: Met182, Trp190, Trp235. В крингл-доме K-3 были идентифицированы окисленные Tyr304 и Trp 325 [5]. При этом известно, что Trp235 играет роль в междоменных взаимодействиях молекулы плазминогена и, следовательно, отвечает за поддержание конформации молекулы. Изменение конформации молекулы белка может привести к нарушению его стабильности, что может вызвать понижение молярной энтальпии температурных переходов, характеризующих плавление некоторых доменов.

Доля молярной энтальпии высокотемпературного перехода, соответствующего плавлению SP-домена, в общей экспериментальной энтальпии денатурации растет. Это свидетельствует о том, что даже при окислении этого домена он остается устойчивым к тепловой денатурации. SP-домен содержит каталитическую триаду (His603, Asp646 и Ser741) и является наиболее значимым для ферментативной активности плазмин(огена). В SP-доме были обнаружены следующие окисленные аминокислотные остатки: Met585, Tyr672, Trp685, Trp761 и Met788. Известно, что Tyr672, так же, как и Trp235 из K-2, отвечает за поддержание междоменных взаимодействий в молекуле плазминогена [5].

При окислении плазминогена небольшими концентрациями НОСl первыми в окислительные модификации вовлекаются аминокислотные остатки метионина, расположенные на поверхности белка. Окисление остатков метионина до метионинсульфооксида может приводить к нарушению конформации молекулы белка. При этом наблюдается нарушение укладки полипептидной цепи, что, в свою очередь, приводит к обнажению более гидрофобных, чем метионин, аминокислотных остатков, которые теперь также доступны для окислителя [18]. Такое нарушение конформации может приводить к дальнейшей дестабилизации белка, а также к его агрегации.

Данная работа выполнена при бюджетном финансировании по госзаданию (тема № 01201253311).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Miles L.* // Trends in Cardiovascular Medicine. 2003. V. 13. № 1. P. 21; doi: 10.1016/S1050-1738(02)00190-1
2. *De Souza L.R., Melo P.M., Paschoalin T. et al.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun.. 2013. V. 433, № 3. P. 333. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.001
3. *McKenna S.M., Davies K.J.A.* // Biochem. J. 1988. V. 254. № 3. P. 685; doi: 10.1042/bj2540685
4. *Ulfig A., Leichert L.I.* // Cell. Mol. Life Sci. 2021. V. 78. № 2. P. 385; doi: 10.1007/s00018-020-03591-y
5. *Vasilyeva A., Yurina L., Ivanov V. et al.* // Intern. J. of Biolog. Macromol. 2022. V. 206. P. 64; doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.02.128
6. *Deutsch D.G., Mertz E.T.* // Science. 1970. V. 170. № 3962. P. 1095; doi: 10.1126/science.170.3962.1095
7. *Laemmli U.K.* // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680; doi: 10.1038/227680a0
8. *White N.J., Wang Y., Fu X. et al.* // Free Radical Biol. and Med. 2016. V. 96. P. 181; doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.023
9. *Васильева А.Д., Юрина Л.В., Азарова Д.Ю. и др.* // Хим. физика. 2022. Т. 41. № 2. С. 51; doi: 10.31857/S0207401X220201455
10. *Юрина Л.В., Васильева А.Д., Евтушенко Е.Г. и др.* // Хим. физика. 2024. V. 43. № 4. С. 81.
11. *Lau W.-H., White N.J., Yeo T.-W. et al.* // Sci. Rep. 2021. V. 11. № 1. 15691; doi: 10.1038/s41598-021-94401-3
12. *Шайтан К.В.* // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 6. С. 40; doi: 10.31857/S0207401X23060109
13. *Васильева А.Д., Юрина Л.В., Щеголихин А.Н. и др.* // Докл. АН. 2019. Т. 488. №5. С. 560; doi: 10.31857/S0869-56524885560-566
14. *Шишкина Л.Н., Козлов М.В., Константинова Т.В. и др.* // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 1. С. 28; doi: 10.31857/S0207401X23010107
15. *Castellino F.J., Ploplis V.A., Powell J.R., Strickland D.K.* // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 10. P. 4778.
16. *Novokhatny V.V., Kudinov S.A., Privalov P.L.* // J. of Mol. Biol. 1984. V. 179. № 2. P. 215; doi: 10.1016/0022-2836(84)90466-2
17. *Freire E., Biltonen R.L.* // Biopolymers. 1978. V. 17. № 2. P. 481; doi: 10.1002/bip.1978.360170213
18. *Розенфельд М.А., Юрина Л.В., Васильева А.Д.* // Успехи соврем. биологии. 2021. Т. 141. № 4. С. 315; doi: 10.31857/S0042132421040050

STUDY OF THERMAL DENATURATION OF THE PLASMINOGEN MOLECULE UNDER INDUCED OXIDATION

L. A. Wasserman¹, E. S. Gavrilina¹, L. V. Yurina^{1*}, A. D. Vasilyeva¹, M. A. Rosenfeld¹

¹*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*E-mail: lyu.yurina@gmail.com

The article is devoted to the study of thermal denaturation of the plasminogen molecule during induced oxidation by hypochlorite in a concentration range (30, 62.5, 125 and 250 μM). By differential scanning calorimetry, it was determined that in the presence of an oxidizing agent, the enthalpy of denaturation of the plasminogen molecule decreases. This is most noticeable for the peak showing the melting of the K4-K5 domains. These results are consistent with previously obtained data on the oxidative modification of amino acid residues of plasminogen treated with different concentrations of hypochlorite using the HPLC-MS/MS method. Taken together, these data and the results of previous studies indicate that the structure of Glu-plasminogen is adapted to moderate HOCl-induced oxidation.

Keywords: plasmin(ogen), oxidation, thermal denaturation, differential scanning calorimetry (DSC).

REFERENCES

1. L. Miles, Trends in Cardiovascular Medicine. **13**(1), 21–30 (2003).
doi: 10.1016/S1050-1738(02)00190-1
2. L.R. De Souza, P.M. Melo, T. Paschoalin, et al., Biochemical and Biophysical Research Communications. **433**(3), 333–337 (2013).
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.001
3. S.M. McKenna, K.J.A. Davies, Biochemical Journal. **254**(3), 685–692(1988).
doi: 10.1042/bj2540685
4. A. Ulfig, L.I. Leichert, Cell. Mol. Life Sci. **78**(2), 385–414 (2021).
doi: 10.1007/s00018-020-03591-y
5. A. Vasilyeva, L. Yurina, V. Ivanov, et al., International Journal of Biological Macromolecules. **206**, 64–73 (2022).
doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.02.128
6. D.G. Deutsch, E.T. Mertz, Science. **170**(3962), 1095–1096 (1970).
doi: 10.1126/science.170.3962.1095
7. U.K. Laemmli, Nature. **227**(5259), 680–685 (1970).
doi: 10.1038/227680a0
8. N.J. White, Y. Wang, X. Fu, et al., Free Radical Biology and Medicine. **96**, 181–189 (2016).
doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.023
9. A.D. Vasilyeva, L.V. Yurina, D.Y. Azarova, et al., Russ. J. Phys. Chem. B. **16**, 118–122 (2022).
doi: 10.1134/S1990793122010316
10. L.V. Yurina, A.D. Vasilyeva, E.G. Evtushenko, et al., Russ. J. Phys. Chem. B. **18**(2), 521–526 (2024).
doi: 10.1134/S1990793124020349
11. W.H. Lau, N.J. White, T.W. Yeo, et al., Sci Rep. **11**(1), 15691 (2021).
doi: 10.1038/s41598-021-94401-3
12. K.V. Shaitan, Russ. J. Phys. Chem. B. **17**(3), 550–571 (2023).
DOI: 10.1134/S1990793123030259
13. A.D. Vasilyeva, L.V. Yurina, A.N. Shchegolikhin, et al., Dokl Biochem Biophys. **488**(1), 332–337 (2019).
doi: 10.1134/S1607672919050144
14. L.N. Shishkina, M.V. Kozlov, T.V. Konstantinova, et al., Russ. J. Phys. Chem. B. **17**(1), 141–147 (2023).
doi: 10.1134/S1990793123010104
15. F.J. Castellino, V.A. Ploplis, J.R. Powell, D.K. Strickland, J Biol Chem. **256**(10), 4778–4782 (1981).
16. V.V. Novokhatny, S.A. Kudinov, P.L. Privalov, Journal of Molecular Biology. **179**(2), 215–232 (1984).
doi: 10.1016/0022-2836(84)90466-2
17. E. Freire, R.L. Biltonen, Biopolymers. **17**(2), 481–496 (1978).
doi: 10.1002/bip.1978.360170213
18. M.A. Rosenfeld, L.V. Yurina, A.D. Vasilyeva, Biology Bulletin Reviews. **11**(7), 647–664 (2021).
doi: 10.1134/S2079086421070070