

## ПОСТ-ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ ГЕМОСТАЗА: СТРУКТУРА, ФУНКЦИЯ, РЕГУЛЯЦИЯ

©2024 г. М. А. РОЗЕНФЕЛЬД, Л. В. ЮРИНА,  
Е. С. ГАВРИЛИНА, А. Д. ВАСИЛЬЕВА

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля  
Российской академии наук, Москва*

I. Введение. II. Влияние окисления на структуру и функцию коагуляционных белков. III. Эффект окисления на структуру и функцию антикоагулянтных белков. IV. Окислительная модификация белков фибринолитической системы: нарушение структуры и функции. V. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

В живом организме постоянно происходит генерация активных форм кислорода (АФК), включая перекись водорода ( $H_2O_2$ ), гидроксильный радикал ( $HO\cdot$ ), супероксидный анион-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ) наряду с гипогалоидными кислотами ( $HOCl$ ,  $HOBr$ ,  $HOI$ ), образующимися в присутствии гемсодержащих пероксидаз. Лейкоциты и тромбоциты являются главными источниками генерации АФК [1, 2]. Дисбаланс между

---

*Принятые сокращения:* АФК – активные формы кислорода; Met – метионин; MetO – метионин сульфоксид; MSRs – метионин сульфоксид редуктазы (англ. – methionine sulfoxide reductases); СОД – супероксиддисмутаза; ВЭЖХ-МС/МС – масс спектрометрия высокого разрешения; ПТОМ – пост-трансляционные окислительные модификации; а. о. – аминокислотный остаток; ФГ – фибриноген; ТР – тромбин; FVII – коагуляционный фактор VII; ТФ – тканевой фактор; ТМ – тромбомодулин; ПС – протеин С; АПС – активированный протеин С; ПГ – плазминоген; ПЛ – плазмин; ТАП – тканевый активатор плазминогена; УАП – урокиназный активатор плазминогена; ИАП-1 – ингибитор активатора ПГ первого типа; ЭРПС – эндотелиальный рецептор протеина С;  $HOCl$  – хлорноватистая кислота; миелопероксидаза – МПО;  $H_2O_2$  – пероксид водорода; ТБГП – трет-бутил-гидропероксид.

*Адрес для корреспонденции:* e-mail: rosenfeld41@mail.ru (Марк Александрович Розенфельд)

Работа была профинансирована Минобрнауки РФ в рамках государственного задания ИБХФ РАН (проект № 122041300210–2).

количеством генерируемых АФК в организме и их разрушением (последнее регулируется антиоксидантной защитой) приводит к развитию окислительного стресса [3, 4] атеросклероз, ишемия/реперфузия миокарда, заболевания легких, туберкулез, сахарный диабет, старение.

АФК при низких концентрациях служат клеточными сигнальными молекулами [5]. Однако при высоких концентрациях АФК их действие может вызывать не только позитивные эффекты, убивая вторгшиеся в организм патогены и микробы, но и негативные, повреждая компоненты клетки, включая белки, липиды и ДНК [6]. Неопровержимые доказательства указывают на то, что окислительный стресс участвует в патофизиологии широкого спектра заболеваний человека, включая рак [7], сердечно-сосудистые заболевания [8], хроническую обструктивную болезнь легких [9], сахарный диабет [10] и нейродегенеративные расстройства, такие как старение [11], болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера [12, 13].

Белки являются высокочувствительными мишенями для молекул АФК, которые вызывают окислительные модификации аминокислотных остатков, нарушая, тем самым, структуру и функцию внутри- и внеклеточных белков. Сульфосодержащие остатки цистеина и метионина в белках проявляют высокую чувствительность ко всем видам АФК по сравнению с другими аминокислотными остатками. Поэтому неудивительно, что их окисление относится к наиболее распространенным в белках модификациям при воздействии различных АФК.

В плазме крови молекулы  $\text{HOCl}$ , образуемые миелопероксидазой, являются важнейшими природным и предшественниками свободных радикалов в организме [14, 15]. Концентрации  $\text{HOCl}$  *in vivo* оцениваются в пределах 12–250 мкМ [16]. Боковые цепи некоторых аминокислотных остатков особенно чувствительны к модификации  $\text{HOCl}$  [17, 18] (Таблица). Остатки  $\text{Cys}$  быстро реагируют с молекулами  $\text{HOCl}$  с образованием оксикислот и цистина [19], а остатки  $\text{Met}$  превращаются в  $\text{MetO}$  [20], дальнейшее окисление которого может привести к образованию метионинсульфона, хотя в значительно меньшей степени [21].

Хорошо известно, что окислительный стресс вызывает различные модификации белков, включая карбонилирование [22, 23]. Прямое окисление остатков лизина, аргинина, пролина и треонина может являться обычным механизмом образования карбониллов в белках [23, 24]. Карбонилирование, являющееся необратимой окислительной модификацией аминокислотных остатков, рассматривается как один из важных маркеров развития окислительного стресса [25].

Таблица. Кажущиеся константы скорости второго порядка для реакции НОСІ с боковыми цепями аминокислот

Аминокислотный остаток	Кажущаяся константа скорости второго порядка ( $M^{-1} \cdot s^{-1}$ )
Цистеин	$3.6 \times 10^8$
Метионин	$3.4 \times 10^7$
Цистин	$1.6 \times 10^5$
Гистидин	$1.2 \times 10^5$
Глицин	$1.0 \times 10^5$
Лизин	$7.9 \times 10^3$
Триптофан	$7.8 \times 10^3$

Данные в таблице представлены согласно [18].

В частности, повышенный уровень карбонилирования белков был обнаружен как при нормальном старении [26, 27], так и при некоторых заболеваниях таких, как миелодиспластические синдромы [28], болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и боковой амиотрофический склероз [26, 27] и некоторые другие.

Накапливающиеся данные подтверждают гипотезу, согласно которой обратимое окисление остатков Met (главным образом локализованных на поверхности белка) обеспечивает надежный механизм, способный удалять АФК, таким образом создавая цикл с каталитической эффективностью для противодействия или смягчения вредного действия АФК на другие функционально важные аминокислотные остатки. Другими словами, остатки Met во внутриклеточных белках могут служить эндогенными антиоксидантами, защищая белковую структуру от повреждения при окислительном стрессе [22, 29–31]. Однако, в некоторых случаях, как будет нами показано в рамках данного обзора, поверхностно локализованные Met, вовлекающиеся в окисление, вызывают изменение функциональной активности белка. Благодаря полной обратимости процесса превращения MetO в исходную структуру Met во внутриклеточных белках, катализируемого MSR, Met-связанный антиоксидантный ресурс белков обусловлен активностью редуктаз, скорее, чем количеством антиоксидантных Met [32]. Из-за отсутствия MSR в плазме крови [33] окисление Met во внеклеточных белках является фактически необратимым. Окислительная модификация поверхностно локализованных Met истощает антиоксидантный ресурс молекулы и, следовательно, способность Met служить перехватчиками молекул оксиданта без нарушения структуры и функции белков плазмы остается дискуссионным.

Что касается остатков Cys, они участвуют в каталитическом цикле многих ферментов, образуют дисульфидные связи, которые вносят важный вклад в стабилизацию структуры белка, а также являются сайтами связывания металлов таких, как цинк или железо [34]. Действие АФК на остатки Cys в белках часто сопровождается необратимыми модификациями, приводящими к дисфункции белков [35]. Окисление белковых тиолов с помощью АФК первоначально приводит к образованию нестабильной сульфеновой кислоты (R-SOH), которая затем может образовывать внутримолекулярные или межмолекулярные дисульфидные связи. Хотя сульфеновые кислоты могут временно сохранять стабильность в некоторых белковых средах [36], они чаще всего реагируют с другими тиолами или вовлекаются в дальнейшее окисление, которое приводит к необратимому образованию сульфиновой (R-SOOH) или сульфоновой (R-SO<sub>3</sub>H) кислот [37]. Решающая роль в системе антиоксидантной защиты клеток связана с наличием в высоких концентрациях глутатиона, который является наиболее распространенным небелковым тиолом и способен защитить остатки Cys от окисления до сульфиновых и сульфокислот [38]. В плазме крови концентрация глутатиона существенно ниже, чем в клетках, поэтому антиоксидантный потенциал плазменных белков связан не только с наличием антиоксидантных Met, но также с сульфгидрильными группами белков. Наиболее ярким примером этого является сывороточный альбумин, который рассматривается как важнейшим белковый антиоксидант, главным образом, благодаря наличию единственной сульфгидрильной группы, Cys34, способной выступать в качестве ловушки АФК [39].

Репарация повреждений в белках ограничивается восстановлением окисленных производных серосодержащих аминокислотных остатков цистеина и метионина. Повреждения во всех других аминокислотных остатках является полностью необратимым, что подробно отражено в работе [40].

Идентификация окислительных модификаций в белках играет важную роль в понимании нарушения структуры белка и механизма его функционирования. Развитие метода ВЭЖХ-МС/МС существенно расширило возможности в анализе ПТОМ в белках как при индуцированном окислении, так и *in vivo* при окислительном стрессе. Многие исследования направлены на выявление в белках крови окислительных сайтов, которые, как предполагают, могут быть маркерами развития различного рода заболеваний [41, 42].

В данном обзоре будут проанализированы различные ПТОМ, возникающие во внутриклеточных и плазменных белках гемостаза в условиях *in vitro* и *in vivo* и их влияние на структуру и функцию белков

В обзоре будут представлены такие белки, как ФГ, протромбин/ТР, FVII, являющиеся представителями коагуляционного звена гемостаза; антикоагулянтные белки – ПС и ТМ; и белки фибринолитической системы – ПГ, его физиологические активаторы и ингибиторы. Будут описаны структура и функция белков, окислительные модификации и их влияние на функциональную активность. Будет обобщена и систематизирована информация о возможном влиянии ПТОМ белков системы гемостаза *in vitro* и *in vivo* на нарушение механизмов коагуляции и фибринолиза и проанализирована возможность компенсаторного механизма в поддержании гемостаза при окислительном стрессе.

## **II. ВЛИЯНИЕ ОКИСЛЕНИЯ НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИЮ КОАГУЛЯЦИОННЫХ БЕЛКОВ**

Система свертывания крови представляет собой сложно организованную, многокомпонентную сеть взаимодействующих белков и кофакторов, в которой каждый фермент, образованный в предыдущей реакции, активирует последующий белок-профермент. Каскадная активация белков коагуляционного звена гемостаза, протекающая по внешнему или внутреннему механизмам в ответ на повреждение эндотелия сосудов [43–45], направлена на каталитическое превращение протромбина в ТР, фермента способного превращать растворимый плазменный ФГ в фибриновый гель. В последние годы был сформулирован новый взгляд на механизм свертывания крови, основанный на системе пространственно разнесенных реакций, в которых диффузия ферментов играет такую же существенную роль в регуляции свертывания крови, как и химический катализ [46, 47].

Окисление является важным фактором, влияющим на состояние системы свертывания крови. В данном разделе мы проанализируем последствия окисления на химическую модификацию первичной структуры и функциональные нарушения коагуляционных белков: ФГ, ТР и FVII.

### **ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ФИБРИНОГЕНА**

ФГ человека играет ключевую роль в физиологической реакции образования фибрина, обеспечивая плазменный гемостаз. Помимо своей важной роли в гемостазе, ФГ участвует в заживлении ран, воспалении, ангиогенезе и других важных физиологических и патологических процессах [48]. В последние годы был опубликован ряд обзорных статей, в которых дается очень подробное описание биохимии ФГ [49,

50]. Поэтому в настоящем разделе приводится лишь краткая информация о структуре ФГ, необходимая для понимания последствий окислительных модификаций ФГ на его функционирование.

Молекула ФГ представляет собой гомодимер 340 кДа, содержащий два идентичных набора трех полипептидных цепей, А $\alpha$ , В $\beta$  и  $\gamma$ , которые соединены вместе 29 дисульфидными связями. Первичная структура всех трех полипептидных цепей не имеет свободных остатков Сус, но содержит множественные Met и циклические остатки, многие из которых могут проявлять высокую чувствительность по отношению к АФК. NH<sub>2</sub>-концевые части всех трех пар полипептидных цепей (А $\alpha$ 1–49, В $\beta$ 1–80 и  $\gamma$ 1–23) составляют центральную область E [49]. Две идентичные дистальные части молекулы ФГ образуют области D (А $\alpha$ 161–220, В $\beta$ 193–461 и  $\gamma$ 135–427), в которых СООН-терминальные участки полипептидных В $\beta$  и  $\gamma$  цепей образуют  $\beta$ - и  $\gamma$ -узлы, соответственно (Рис. 1а). СООН-концевые части А $\alpha$  цепей формируют  $\alpha$ С области (221–610), каждая из которых включает в себя  $\alpha$ С-домен (392–610), который прикреплен к основной части молекулы ФГ гибким  $\alpha$ С-коннектором (221–391) [48]. А $\alpha$ , В $\beta$  и  $\gamma$  цепи в каждой из субъединиц образуют так называемые суперспиральные коннекторы (А $\alpha$ 50–160, В $\beta$ 81–192 и  $\gamma$ 24–134), которые связывают центральную область E с дистальными областями D [49].

ФГ считается основной мишенью для различных видов АФК и мощным белковым антиоксидантом наряду с сывороточным альбумином [51, 52]. Являясь высоко уязвимой потенциальной мишенью для оксидантов, ФГ подвергается пост-трансляционным сайт-специфическим модификациям, которые могут возникать как в результате индуцированного окисления различными оксидантами [53–57], так и в результате окислительного стресса в организме [58]. Показано, что окислительные модификации ФГ способствуют структурным повреждениям и нарушениям свойств как самого белка [59–61], так и фибрина, образующегося из окисленного ФГ [53, 61] и др.

Исследования показали, что окислительная модификация молекул ФГ влияет на гемостаз, вызывая изменения в архитектуре фибриновой сети. Воздействие на молекулы ФГ различных реагентов, в том числе НОС1, вызывало альтернативную сборку структуры фибрина с более тонкими волокнами, снижение их прочности и эластичности по сравнению с нормальным фибриновым гелем [53, 55, 62]. Также увеличивалась резистентность фибрина к его гидролизу, катализируемому ПЛ [61, 63].

Используя метод масс спектрометрии, в структуре молекулы ФГ, подвергнутого индуцированному окислению, удалось обнару-

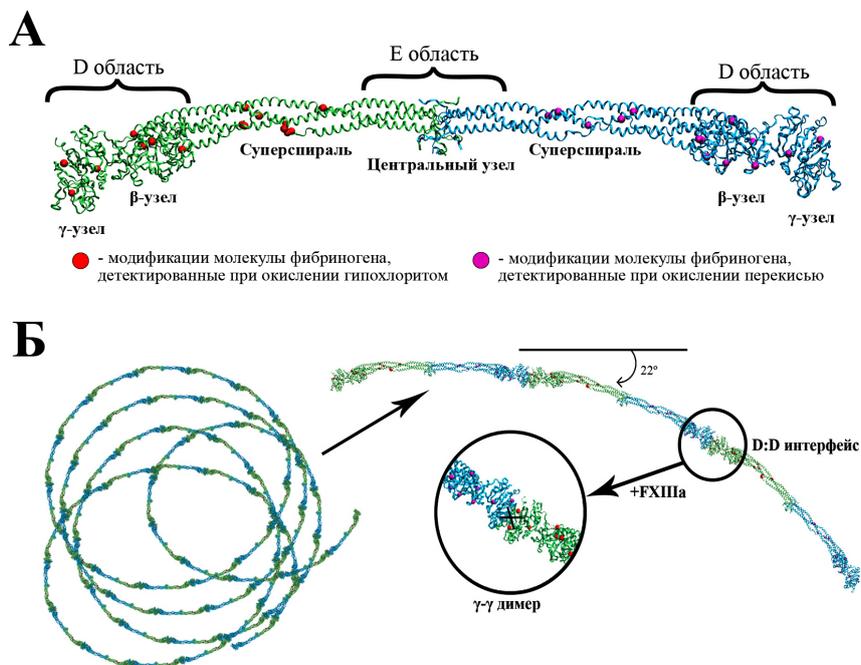


Рис. 1. а) Топография окисленных остатков Met в молекуле фибриногена (PDB ID: 3GHG) при его индуцированном окислении гипохлоритом [53, 54] и перекисью водорода [57]. Отсутствующая Aα-область (остатки 221–610) не имеет кристаллографического изображения. Рисунок выполнен с помощью программы VMD1.9.3 (University of Illinois at Urbana–Champaign, USA);

б) Графическое изображение ковалентно сшитых гибкоцепных олигомеров, в которых окисленные молекулы фибриногена соединяются «конец к концу» [59]. С увеличением длины полимерной цепи гибкие гомополимеры фибриногена имеют тенденцию к сворачиванию в довольно компактную структуру, сходную с глобулярной частицей [59]. FXIIIa катализирует образование межмолекулярных  $\gamma$ - $\gamma$ -димеров, которые возникают в виде поперечных связей между остатком лизина  $\gamma$ 406 одной  $\gamma$ -цепи и остатком глутамина  $\gamma$ 398 или  $\gamma$ 399 другой [70]. Согласно данным [65], максимальный угол изгиба, который количественно определяет изменения относительной продольной ориентации молекул ФГ, может составлять 22°.

жить значительное количество окислительных модификаций, локализованных в различных областях белка [53, 54, 56, 57]. Однако условия, используемые *in vitro*, сильно различались как в выбранном окислителе, так и в его дозе. Так при  $\text{HOCl}$  (1.25 mM)-индуцированном окислении ФГ было идентифицировано 84 пост-трансляционных модификаций [56]. Очевидно, что анализ такого огромного количества сайтов является очень сложной задачей. Кроме того, многие из функционально значимых сайтов в ФГ исходно могут быть локализованы в белковом ядре и становятся экспонированными при TP-индуцированной активации ФГ. Такие сайты едва ли доступны для окислителей. Поэтому остается существенный пробел в наших знаниях в понимании функциональной роли отдельных модифицированных сайтов. Остановимся кратко на нескольких модификациях аминокислотных остатках, функция которых в достаточной степени описана. Особое к себе внимание привлекает остаток Met476, находящийся в  $\alpha\text{C}$ -домене. Межмолекулярные взаимодействия  $\alpha\text{C}$ -доменов при самосборке фибрина усиливают латеральную агрегацию цепей фибрина, способствуя образованию более толстых фибрилл [49, 64]. Окисление Met476 в  $\alpha\text{C}$ -домене, как полагают [53], повреждает его структурную целостность, и, тем самым, нарушает взаимодействия соседних  $\alpha\text{C}$ -доменов друг с другом. С другой стороны, как показано многочисленными исследованиями [53, 54, 56–58], этот остаток проявляет повышенную чувствительность к окислителям по сравнению с другими остатками Met в ФГ. Это свидетельствует о том, что Met476 экспонирован на поверхности белка. Как упоминалось выше, остатки Met, расположенные на поверхности белка, выполняют антиоксидантную роль, являясь ловушкой АФК. Понимание причин этого противоречия в функциональной принадлежности Met476 требует дальнейших исследований. Met367, который превращается в метионин сульфоксид (MetO) в ФГ, обработанным различными окислителями, принадлежит к структуре 'b' hole. Дадим краткие пояснения. Действие тромбина на ФГ приводит к отщеплению фибринопептидов А (FrA) и фибринопептидов В (FrB) с последующим обнажением сайтов связывания, расположенных в области E, так называемых knobs 'A' and 'B'. Они комплементарны сайтам связывания, holes 'a' и 'b', всегда исходно экспонированных в D областях [49]. 'B–b' knob-hole взаимодействия обуславливают латеральную ассоциацию фибриновых протофибрилл. Мы предполагаем, что окисление Met367 (наряду с Met476) также вносит свой вклад в образование более тонких фибрилл относительно контроля.

Другим важным модифицированным остатком является  $\gamma$ Met264, входящий в состав структуры  $\gamma$ -узла. Набор сайтов, включая  $\gamma$ Met264, ответственные за формирование 'D : D' интерфейса, возникающего между соседними D областями, описан в работе [65]. Можно предположить, что наблюдаемое окисление  $\gamma$ Met264 при действии различных окислителей ведет к усилению 'D : D' интерфейса. Ранее было экспериментально обнаружено, что окисление молекулы ФГ влияет на самосборку молекул по типу «конец к концу», образуя одноцепочечные структуры [59]. В присутствии коагуляционного фактора FXIIIa  $\gamma$  цепи примыкающих D доменов сшиваются, образуя  $\gamma$ - $\gamma$ -димеры [70]. Как видно из Рис. 1б, одноцепочечные структуры, благодаря наличию углов изгиба между соседними молекулами ФГ, образуют гибкоцепные олигомеры. Наличие одноцепочечных гибкоцепных олигомеров ФГ было выявлено также атомно-силовой микроскопией высокого разрешения (АСМ) [65]. Образование растворимых высокомолекулярных комплексов фибриногена при его обработке НОС1 было описано недавно в работе [52].

В заключение хотелось бы отметить, что функция многих окисленных сайтов в фибриногене, в том числе многочисленных модифицированных Met остатков, до сих пор остается невыясненной. Во многих белках удалось доказать наличие антиоксидантных Met [29, 30, 66–69] и др. Однако антиоксидантных Met в структуре белка до настоящего времени не обнаружено. Может быть, такие метионины отсутствуют в структуре белка. Показано, что, перехватывая молекулы гипохлорита, окисленный фибриноген способен образовывать в плазме крови растворимые высокомолекулярные структуры [52], что хорошо согласуется с таковыми, образующимися при индуцированном окислении [59]. Истощение «мономерного» фибриногена, как полагают [52], повышает иммуностимулирующие свойства плазмы крови после добавления в нее гипохлорита и потенциально снижает накопление других модифицированных гипохлоритом соединений.

#### ПРОТРОМБИН/ТРОМБИН: ОКИСЛЕНИЕ, СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ

Протромбин, предшественник тромбина, циркулирует в плазме крови в концентрации 0,1 мг/мл с периодом полужизни около 60 часов. На предпоследней стадии каскада коагуляции протромбин протеолитически превращается в активную протеазу ТР под действием протромбиназного комплекса, включающего фактор Ха и кофактор Va, собранных на фосфолипидной мембране в присутствии  $Ca^{2+}$ .

ТР человека является двуцепочечной молекулой, состоящей из А-цепи (36 а. о.) и каталитической В-цепи (259 а. о.), которые ковалентно

связаны между собой дисульфидным мостиком между остатками Cys1 и Cys122 [71]. Было показано, что В-цепь является гомологичной каталитическим цепям других коагуляционных/фибринолитических трипсин-подобных протеиназ [72]. В-цепь свернута в два  $\beta$ -barrel домена, асимметрично соединенные между собой, так что на границе расположены остатки каталитической триады, His57, Arg102 и Ser195 [73]. Два остатка, His57, Arg102 принадлежат N-концевому домену, в то время как нуклеофильный серин принадлежит С-концевому домену (Рис. 2). Цепь А способствует стабилизации цепи В за счет многочисленных ионных взаимодействий [74]. Как активный центр, так и экзосайты тромбина участвуют во взаимодействиях с субстратами, ингибиторами и эффекторами. Экзосайт I ТР представляет собой кооперативный участок в распознавании, главным образом, молекул ФГ [75] и ТМ [76], тогда как экзосайт II белка предназначен для связывания молекулы гепарина [77,78].

Система МПО/ $H_2O_2$ /хлорид или НОСI были использованы, чтобы изучить биохимические и функциональные эффекты окисления на ТР [79]. Окисление ТР характеризовалось снижением его ферментативной активности по отношению к различным субстратам. Окисленный ТР показал сильное снижение каталитической активности в гидролизе протеина С. ТР, обработанный системой МПО/ $H_2O_2$ /хлорид, демонстрировал снижение скорости ТР-индуцированного высвобождения как FpA, так и FpB фибриногена. Активирующая способность ТР по отношению к тромбоцитам снижалась при обработке белка обоими вышеуказанными окислителями. Авторы показали [79], что аффинность связывания окисленного ТР с ТМ по сравнению с нативным ТР была примерно в 2 раза ниже. Также наблюдалось сильное снижение константы специфичности модифицированного ТР для комплекса антитромбин III-гепарин.

Обработка фермента МПО или НОСI приводила к модификации остатков лизина и триптофана наряду с образованием хлораминовых, карбонильных и дитиозиновых групп. Четыре модифицированных остатка лизина (Lys36, Lys70, Lys169 и Lys240) были обнаружены в окисленном ТР [79]. Остатки Lys36, Lys70 являются критически важными для распознавания ФГ, в то время как Lys169 и Lys240 участвуют в распознавании молекулы гепарина [71]. Ослабление связывания окисленного ТР с субстратами дало возможность предположить авторам [78], что Trp60, и Trp215 локализованные в так называемых каталитических субсайтах S3 и S2, также могли подвергаться окислительной модификации, способствуя тем самым изменению каталитической специфичности окисленного ТР.

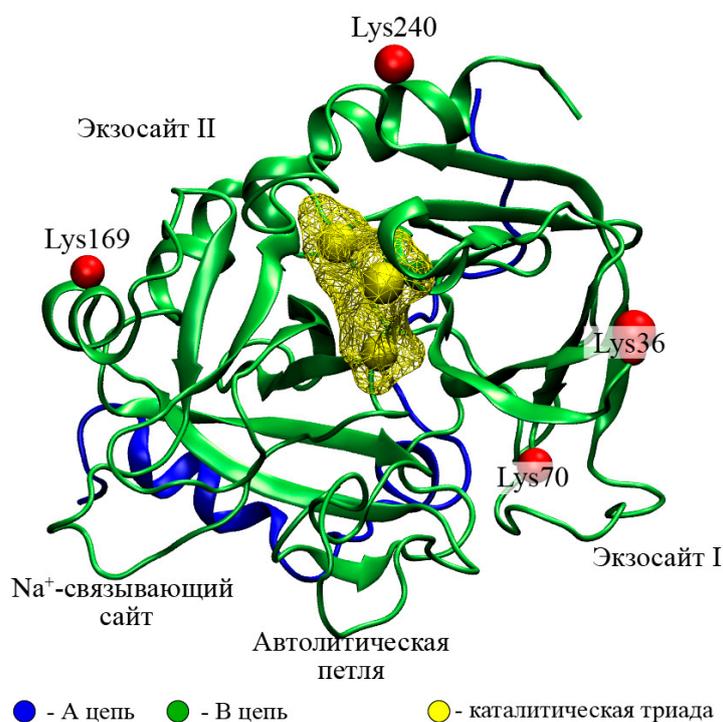


Рис. 2. Пространственная структура TP (PDB ID: 1PPB) с отмеченными участками окислительной модификации (Lys36, Lys70, Lys169 и Lys240).

Рисунок выполнен с помощью программы VMD 1.9.3 (University of Illinois at Urbana-Champaign, USA).

Приведенные выше результаты указывают на высокую чувствительность TP к окислительным модификациям миелопероксидазой и HOCl. В этой связи хотелось бы отметить, что ферменты проявляют существенно более низкую резистентность к окислению по сравнению с их предшественниками, проферментами. К сожалению, в доступной нам литературе мы не обнаружили ни одной публикации, посвященной окислительной модификации протромбина. Однако конформационные превращения, происходящие в процессе превращения профермента в фермент, сопровождающиеся при этом экспонированием каталитического центра в протеазном домене, делают фермент уязвимой мишенью для АФК. Это было убедительно продемонстрировано на примере окисления коагуляционного белка XIII [68].

## ОКИСЛЕНИЕ ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ VII

FVII представляет собой белок свертывания крови, ответственный за запуск каскада протеолитических процессов в системе гемостаза, приводящих к образованию TP, отложению фибрина и активацию тромбоцитов [80]. FVII циркулирует в плазме в низкой концентрации (5 нМ), однако только около 1% находится в активной форме (FVIIa) [81]. Из-за своей слабой ферментативной активности свободный FVIIa в плазме практически не распознается ингибиторами протеазы и поэтому циркулирует с периодом полувыведения ~ 90 минут [82].

FVII – одноцепочечный полипептид, состоящий из 406 а. о. с молекулярной массой ~ 50 кДа. Структура FVII образует несколько доменов: GLA-домен (кальций-связывающий N-концевой домен, богатый  $\gamma$ -карбоксиглутаминовой кислотой), два домена EGF1 и EGF2, подобных эпидермальному фактору роста, необходимых для взаимодействия с мембранами и другими белками коагуляционного каскада, и C-концевой трипсин-подобный протеазный домен (SP), содержащий каталитическую триаду His193, Asp242 и Ser344 [83], (Рис. 3). Активная форма фермента, состоящая из легкой цепи (152 остатка) и тяжелой цепи (254 остатка), связанных вместе дисульфидной связью (Cys135–Cys262), образуется при расщеплении пептидной связи в положении Arg152–Ile153 [84]. FVIIa слабо активен в свободном состоянии в растворе и для обеспечения физиологически значимой активности необходимо его связывание с ТФ, мембранным рецептором, экспонируемым после повреждения сосудов [85]. Как только зимоген FVII связывается с ТФ, он быстро превращается в FVIIa путем ограниченного протеолиза, в результате чего образуется активный комплекс ТФ-FVIIa. Образование комплекса ТФ-FVIIa значительно увеличивает ферментативную активность FVIIa за счет аллостерических взаимодействий между ТФ и FVIIa и увеличивает активность белка до  $10^6$  раз [86]. Поверхностно экспонированная  $\alpha$ -спираль в протеазном домене (остатки 307–312), расположена в участке связывания FVIIa с кофактором ТФ. FVII содержит четыре остатка Met, Met298, Met306, Met327 и Met391, локализованных в SP [84]. Полагают, что Met306, примыкающий к остаткам 307–312  $\alpha$ -спирали играет ключевую роль во взаимодействиях FVIIa с ТФ при образовании комплекса FVIIa-ТФ [84]. Было показано, что амидолитическая активность мутантных FVIIa с серином, треонином и аспарагином в положении 306, стимулированная растворимым ТФ, была существенно сниженной по сравнению с FVIIa дикого типа [87]. Замена единственной специфической аминокислоты, Met306 на аспарагиновую кислоту практически полностью предотвращала аллостерические изменения, вызванные ТФ [87].

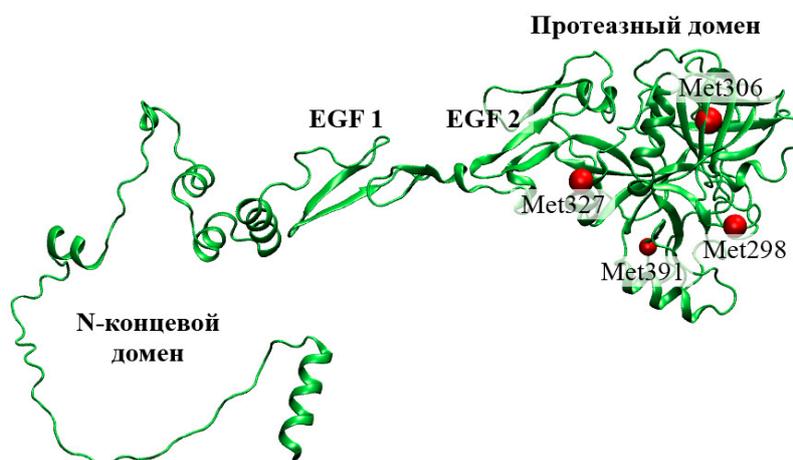


Рис. 3. Структура человеческого фактора VII (FVII) (AlphaFold ID: AF-P00750\_5 [88, 89] с отмеченными участками окислительной модификации (Lys36, Lys70, Lys169 и Lys240). Все четыре остатка Met в положениях Met298, Met306, Met327 и Met391 локализованы в протеазном домене. Два из четырех остатков Met, Met298 и Met306 являются поверхностно экспонированными и способны вовлекаться в окислительную модификацию, в то время как Met327 и Met391, расположенные внутри протеазного домена, не подвержены окислительной модификации [90].

Рисунок выполнен с помощью программы VMD1.9.3 (University of Illinois at Urbana–Champaign, USA).

$H_2O_2$ -индуцированное окисление активированной формы рекомбинантного фактора свертывания крови VII (rFVIIa) вовлекало два из четырех остатков Met, Met298 и Met306, в окислительную модификацию [90] (Рис. 3). Met остатки были охарактеризованы как MetO. Иницированное перекисью водорода превращение Met298 и Met306 в структуре rFVIIa в MetO298 и MetO306, также было подтверждено в исследовании [91]. Окисление FVIIa избирательно влияет на те остатки Met, которые легко доступны для растворителя. Вовлечение остатков Met327 и Met391 в окислительную модификацию не наблюдалось, потому что эти остатки расположены внутри белковой глобулы [90]. В отсутствие ТФ окисленный и контрольный FVIIa имели одинаковую амидолитическую активность, что свидетельствует о том, что окисление не влияло на активность белка [90]. С другой стороны, связывание окисленного FVIIa с ТФ было слабее, чем для неокисленного FVIIa, что проявлялось в увеличении константы диссоциации и снижении амидолитической активности. Было показано, что

замены остатков Met в положениях 298 и 306 на аланины вызывали снижение сродства мутантного белка к ТФ и выработке фактора Ха [92]. Снижение амидолитической и протеолитической активности окисленного FVIIa в комплексе с ТФ предполагает, что окисление Met306 может быть ответственно за этот незначительный функциональный дефект [90].

Основываясь на концепции, согласно которой Met, экспонированные на поверхности, главным образом, выступают как первичные мишени для окислителей, ключевая роль окисления Met306 в нарушении активности окисленного FVIIa в комплексе с ТФ кажется неоднозначной и требует дальнейших исследований.

### **III. ЭФФЕКТ ОКИСЛЕНИЯ НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИЮ АНТИКОАГУЛЯНТНЫХ БЕЛКОВ**

#### **ОКИСЛЕНИЕ ТРОМБОМОДУЛИНА И АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ АКТИВНОСТЬ**

ТМ – экспрессируемый на клеточной поверхности трансмембранный гликопротеин. ТМ является важной частью антикоагулянтной системы гемостаза, действуя как рецептор тромбина на поверхности эндотелиальных клеток сосудов, изменяющий его субстратную специфичность [92, 93].

ТМ состоит из 557 аминокислот, образующих пять структурных областей: N-концевая область белка, представляющая собой сильно заряженный лектин-подобный домен, (а. о. 1–154) (D1) с небольшим гидрофобным перешейком, (а. о. 155–222); модуль с шестью структурами, подобными EGF-доменам, (а. о. 223–462) (D2); домен D3, богатый остатками серин/треонин, (а. о. 463–497); трансмембранный домен (D4), (а. о. 498–521) и цитоплазматический домен (D5), (а. о. 499–557) [94]. Функциональная область ТМ, включающая четвертый, пятый и шестой EGF-домены, ответственна за связывание ТР и активацию ПС [95] (Рис. 4). В четвертом EGF-домene присутствует сайт связывания кальция (Asp349), благодаря которому происходит взаимодействие комплекса ТМ-ТР с Gla-доменом ПС [96]. Домен D1 не играет роли в антикоагулянтных свойствах ТМ, но обладает противовоспалительной активностью [97].

Наряду с трансмембранной формой ТМ существует его растворимый гомолог (pТМ), состоящий только из EGF-подобных доменов и сохраняющий способность связывать ТР и активировать ПС [98]. Наименьший фрагмент ТМ, обладающий кофакторной антикоагулянтной активностью, состоит из четвертого и пятого EGF-доменов

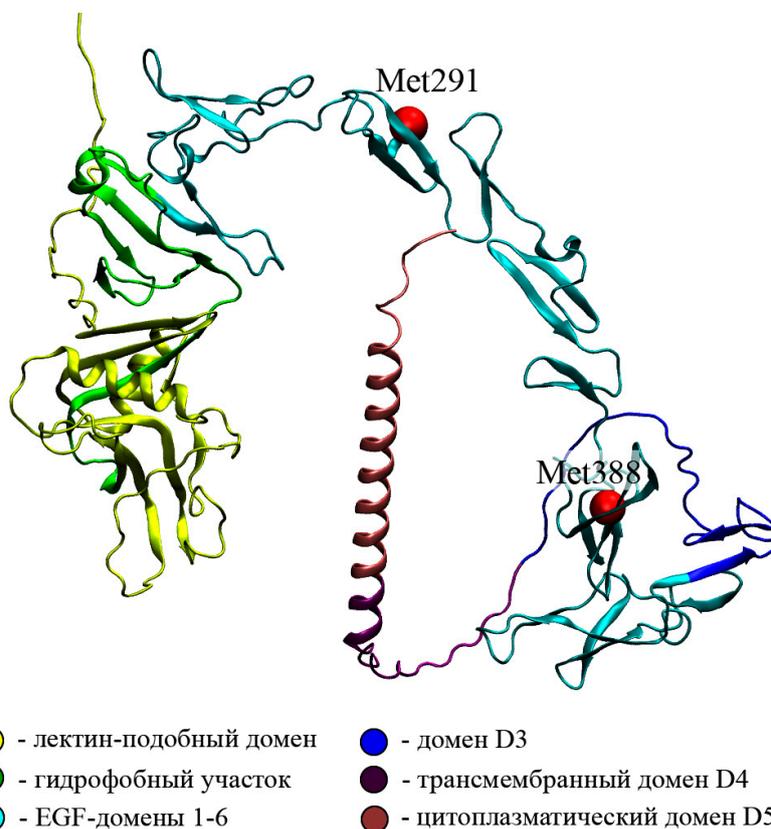


Рис. 4. Структура тромбомодулина (ТМ) (AlphaFold ID: AF-P07204-F1 [88, 89] с обозначенными окислительно модифицированными Met291 и Met388.

Рисунок выполнен с помощью программы VMD 1.9.3 (University of Illinois at Urbana-Champaign, USA).

(TMEGF45). Короткий линкер соединяет четвертый и пятый EGF-подобные домены ТМ. Так как Met388, локализованный в пятом EGF домене, образует обширные гидрофобные контакты как с четвертым, так и с пятым EGF доменами, окисление этого остатка может иметь большое влияние на структуру и функцию обоих доменов [99, 100].

Хлорамин- или  $H_2O_2$ -индуцированное окисление растворимого аналога ТМ человека, состоящего только из шести EGF-подобных доменов, (TMEGF1-6) сопровождалось быстрой потерей антикоагулянтной активностью белка [101]. Поскольку (TMEGF1-6) не содержит ни триптофана, ни свободного Cys, авторы предположили, что

этот эффект связан с окислительной модификацией остатков Met в положениях Met291 и Met388, которые окислялись, проявляя близкую реактивность к хлорамину или  $H_2O_2$  [101]. Авторы показали, что в растворе из пяти образцов нативного и мутантных аналогов ТМ<sub>E</sub>: Met291 и Met388 (1); Met291 и Leu388 (2); Leu291 и Met388 (3); Met291 и Gln388 (4); Leu291 и Leu388 (5) только первый и третий образцы, содержащие Met388, катастрофически теряли свою биологическую активность после окисления. Представленные результаты предполагают, что Met291, окисляющийся с незначительными последствиями на функционирование белка, можно отнести к антиоксидантным Met, в то время как Met388 является функциональным остатком.

Используя метод масс спектрометрии для количественной оценки окисления Met в ТМ человека, было обнаружено, что вызванное  $O_2^-$  ингибирование антикоагулянтной активности рекомбинантного ТМ человека *in vitro* было связано со значительно повышенным уровнем MetO388. Как окисление Met388, так и потеря антикоагулянтной активности ТМ частично предотвращались инкубацией с СОД [102].

Три дополнительных остатка Met в ТМ (Met42, Met205 и Met291) также подвергались окислению после воздействия на белок  $O_2^-$ . Однако эти окисленные остатки Met с меньшей вероятностью влияют на антикоагулянтную активность ТМ, поскольку они находятся за пределами критических EGF-подобных доменов ТМ, необходимых для активации ПС [102]. Эти результаты демонстрировали, что Met388 является ключевым остатком, участвующим в окислительно-восстановительной регуляции его антикоагулянтной активности [99, 103].

Проведенные методом ЯМР сравнительные исследования структур двух фрагментов ТМ, TMEGF45, в которой Met388 был в окисленной форме (TMEGF45ox), и структуры TMEGF45, в которой Met388 был замещен на лейцин (TMEGF45ML) [99], показали, что пятый домен имеет несколько иную структуру в зависимости от остатка в положении 388. Несколько остатков, отвечающих за связывание TP, находятся внутри пятого домена в окисленном белке, в то время как они исходно являются экспонированными и могут взаимодействовать с TP в нативной структуре TMEGF45 и в структуре мутанта Met → Leu. В структуре TMEGF45ox, которая имеет уменьшенный  $k_{cat}$  (каталитическая константа, отражающая эффективность превращения субстрата в активном центре фермента) активации ПС комплексом TP–TMEGF45ox, взаимодействие между двумя доменами утрачено. Наоборот, более тесная связь наблюдается между двумя доменами

в TMEGF45ML, который имеет более высокий  $k(\text{cat})$  активации ПС комплексом TP-TMEGF45ML.

Результаты работы [99] позволяют окончательно прояснить роль Met388, который влияет на локальную TP-связывающую структуру ТМ. Его окисление провоцирует конформационные перестройки в домене D5, затрудняющие взаимодействия между TP-связывающими сайтами и, таким образом, снижающие антикоагулянтную активность белка. Таким образом, структура и функция ТМ изменяются при окислении Met388 [103].

#### ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПРОТЕИНА С

ПС циркулирует в плазме в концентрации  $\sim 70$  нМ в форме зимогена антикоагулянтной сериновой протеазы, АРС, концентрация которой составляет в среднем 40 пМ (2,3 нг/мл) в нормальной плазме [104] activated protein C (АРС). ПС играет важную роль в патофизиологии человека [105]. Дефицит ПС связан с фатальной, стремительно развивающейся пурпурой новорожденных [106], а легкий дефицит или мутации, нарушающие активацию ПС, вызывают венозную тромбоэмболию [107]. С другой стороны, аномально низкие уровни АПС связаны с опасными для жизни состояниями, такими как атеросклероз, инсульт, сепсис и диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови [108]. Будучи плазменным витамин К-зависимым зимогеном, ПС при активации TP в комплексе с ТМ действует как антикоагулянт, разрушая путем ограниченного протеолиза факторы свертывания Va и VIIa (FVa и FVIIa [109, 110]). Эти реакции требуют наличия отрицательно заряженной фосфолипидной поверхности, белка S и ионов кальция [111].

Доменная структура ПС аналогична другим витамин К-зависимым белкам свертывания крови [112]. Легкая цепь ПС содержит N-концевой домен, богатый  $\gamma$ -карбоксиглутаминовой кислотой (Gla-домен) (а. о. 1–46), за которым следуют два EGF-подобных домена, EGF1 (а. о. 55–90) и EGF2 (а. о. 96–136) и сильно заряженный C-концевой участок легкой цепи (остатки 137–155). Тяжелая цепь содержит активационный пептид (остатки 158–169) и SP-домен (остатки 170–419) [113]. Три линкерных участка соединяют Gla-домен с EGF1-доменом (остатки 47–54), два EGF-домена (остатки 91–95) и EGF2-домен с SP-доменом протеазы (остатки 137–169) [105]. Дипептидная последовательность Lys156–Arg157 удаляется во время синтеза белка с образованием двуцепочечного зимогена, в котором легкая и тяжелая цепи остаются связанными посредством дисульфидной связи между Cys141 и Cys277.

ТР-индуцированное протеолитическое удаление активационного пептида в SP-домене при активации зимогена запускает структурные изменения, ответственные за формирование активного сайта [113]. Фактически, половина всех аминокислот в активационном пептиде РС имеет кислые боковые цепи, локализованные в непосредственной близости от связи Arg169-Leu170, которая расщепляется ТР во время активации зимогена [105, 114]. Активация ПС под действием комплекса ТР/ТМ происходит на поверхности эндотелиальных клеток, с которыми протеин С связывается с помощью специфического эндотелиального рецептора ПС (ЭРПС) [95, 115, 116], облегчающего превращение ПС в активную форму фермента АПС (Рис. 5).

Полагают, что связывание ТМ с ТР подавляет способность ТР расщеплять так называемый эндотелиальный «protease activated receptor 1» (PAR1) [74]. Однако благодаря конформационным изменениям участка активации ПС, улучшающим доступность Arg169 для эффективной протеолитической атаки ТР [117], ТМ более чем в 1000 раз повышает специфичность фермента по отношению к ПС [74, 97]. Таким образом, субстратная специфичность ТР, связанного с ТМ, принципиальным образом переключается с расщепления фибриногена на расщепление ПС. Это кардинальным образом меняет роль ТР в каскаде свертывания крови с прокоагулянтной на антикоагулянтную [115].

АПС, связанный с ЭРПС-1, проявляет цитопротекторную и противовоспалительную свойства, активируя PAR1. Однако, чтобы функционировать как антикоагулянт, АПС должен диссоциировать из комплекса АПС/ЭРПС и связываться с кофактором антикоагулянта, белком S через его Gla-домен. АПС, находясь в комплексе с белком S, приобретает способность расщеплять пептидные связи в тяжелых цепях как FVa, так и FVIIIa на отрицательно заряженных поверхностях мембран [118]. Эти протеолитические расщепления комплексом АПС/белок S предотвращают сборку кофакторов с компонентами их соответствующих активационных комплексов, что приводит к ингибированию образования ТР как во внешнем, так и во внутреннем пути каскада реакций свертывания крови. Таким образом, Gla-домен ПС/АПС играет ключевую роль в активации зимогена и в специфичности функции протеазы при коагуляции и воспалении.

Исследуя возможное влияние окислительного стресса на нарушение гемостаза, был определен вклад  $O_2^-$  в повышенную восприимчивость к экспериментальному тромбозу *in vivo* с использованием мышей, генетически дефицитных по СОД1 [102]. СОД1 представляет собой медь- и цинксодержащий фермент, являющийся основной

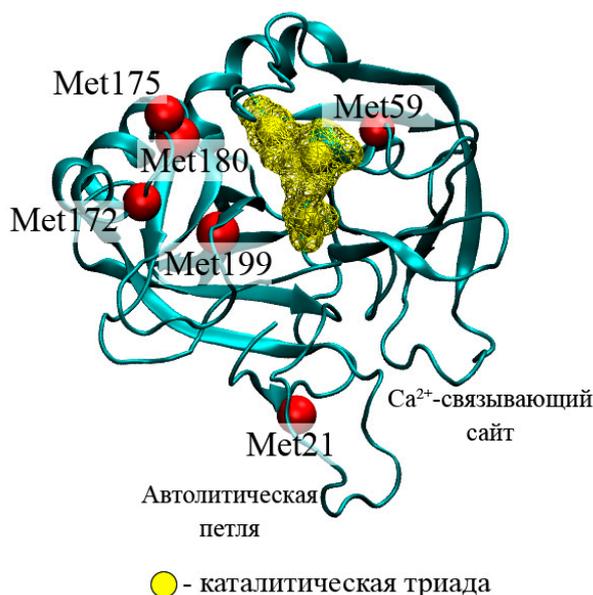


Рис. 5. Структура протеазного домена протеина С (ПС) (PDB ID: 1AUT) с отмеченными остатками метионина.

Рисунок выполнен с помощью программы VMD 1.9.3 (University of Illinois at Urbana–Champaign, USA).

цитозольной формой СОД, которая катализирует превращение  $O_2^-$  в  $H_2O_2$ . Авторы установили, что СОД1 защищает от опосредованного  $O_2^-$  окисления ТМ и, тем самым, нарушения антикоагулянтной системы РС. Как было показано [102], повышение уровня  $O_2^-$  из-за дефицита СОД1 может частично привести к тромбозу за счет угнетения ТМ-зависимой активации ПС [102].

АПС, обработанный  $H_2O_2$  или  $HOCl$ , демонстрировал заметное ингибирование расщепления АПС-специфического хромогенного субстрата, что позволило авторам предположить, что оксиданты могут вызывать изменения в структуре активного центра белка [119]. Устойчивость обработанных окислителем АПС к химическому расщеплению бромистым цианом ( $CNBr$ ) подразумевало, что окисление Met может, по крайней мере, частично отвечать за ингибирование АПС. Поскольку остатки Met в белках являются основными мишенями для различных АФК, кажется маловероятным включение Met в активный центр АПС. Поэтому авторами [119] был сделан вывод, что окисление вызывает аллостерические изменения в архитектуре каталитической

триады: cAsp102–cHis57–cSer195 (буква 'c' перед названием остатка обозначает нумерацию на основе химотрипсиногена и соответствует принятой номенклатуре, используемой для описания структуры АПС [113] в его активном центре. Методом молекулярной динамики (МД) было исследовано влияние одновременного окисления всех шести остатков Met, содержащихся в протеазном SP-доме АПС (cMet21, cMet59, cMet172, cMet175, cMet180, cMet199), на архитектуру каталитической триады, а также влияние окисления отдельного Met59, который отделен от активного центра His57 только одним остатком [119].

Результаты МД позволили предположить, что одним из следствий окисления Met является увеличение расстояния между атомом OγSer195 и имидазолом His57 в активном центре АПС. Это может привести к неэффективному переносу протона между этими остатками, что вызывает снижение каталитической активности окисленного АПС и, следовательно, к неэффективному гидролизу субстрата. Результаты также показывают, что окисление некоторых остатков Met может оказывать более сильное влияние на активность АПС по сравнению с окислением других остатков. Это следует из эффекта окисления Met59 по сравнению с комбинированным окислением cMet59 и cMet180. Таким образом, суммируя полученные данные по окислению Met, авторы [119] пришли к выводу, что инактивация АПС обусловлена окислением cMet59, наиболее близко расположенного к каталитической триаде. Механизм инактивации АПС HOCl, сопряженный с окислением cMet59, представляется потенциально патофизиологически значимым в изменении функциональной стабильности АПС, подверженного окислительному стрессу.

#### **IV. ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ: НАРУШЕНИЕ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ.**

##### **ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПЛАЗМИНОГЕНА**

Система ПГ/ПЛ играет фундаментальную роль в широком спектре физиологических и патологических процессов, которая помимо фибринолиза [120, 121], включает деградацию внеклеточного матрикса [122], ремоделирование тканей и заживление ран [123], сердечно-сосудистые заболевания [124,125], воспаление [126, 127], миграции опухолевых клеток [128, 129] и некоторые другие.

ПГ человека, известный как Glu-ПГ, циркулирует в плазме крови в виде одноцепочечного белка, содержащего 791 аминокислотный остаток. Полипептидная цепь свернута в семь глобулярных доменов,

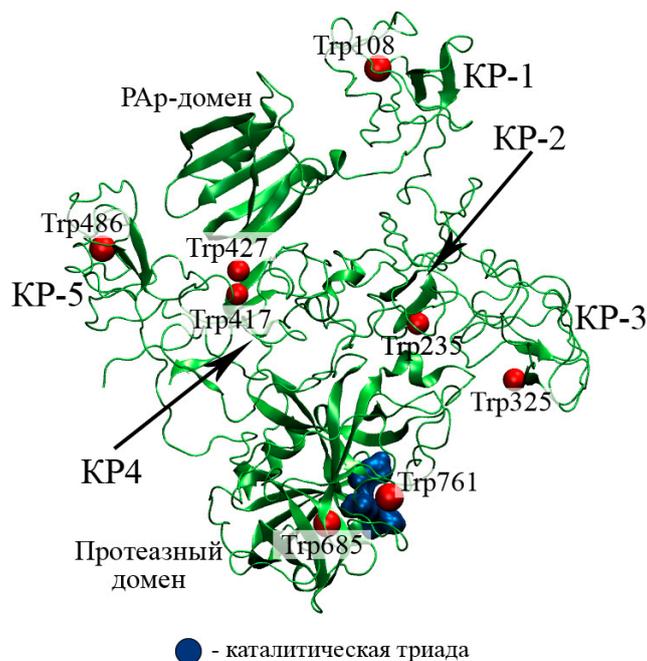


Рис. 6. Структура плазминогена (ПГ) (PDB ID: 4A5T) с модифицированными остатками триптофана (Trp108, локализованный в KP-1; Trp235 в KP-2; Trp325 в KP-3; Trp417 и Trp427 в KP-4; Trp486 в KP-5; Trp685 и Trp761 в протеазном домене. В структуре ПГ плазмы крови у пациентов с острой легочной эмболией остатки Trp108 и Trp417 [132] перекрываются с таковыми в ПГ, модифицированным *in vitro* [69].

Рисунок выполнен с помощью программы VMD1.9.3 (University of Illinois at Urbana-Champaign, USA) program).

включая N-концевой домен (Pan-apple domain), Pap (Glu1–Lys77), пять последовательных KR-доменов, KP-1 (Lys78–Glu164), KP-2 (Glu165–Tyr264), KP-3 (Arg265–Ala347), KP-4 (Pro348–Asp461), KP-5 (Cys462–Ala542) и SP-домен, включающий остатки Val562–Asn791 (Рис. 6). В свою очередь SP связан с KP-5 активационной петлей (Ala543–Arg582), часть которой (Val562–Arg582) структурно принадлежит SP-домену [130, 131]. Протеолитическая активация ПГ в ПЛ происходит за счет разрыва пептидной связи Arg561–Val562 в SP-домене [130], что приводит к образованию двухцепочечной структуры. Тяжелая цепь ПЛ (Glu1–Arg561) связана двумя дисульфидными мостиками с легкой цепью (Ala562–Asn791), которая содержит каталитическую триаду фрагментов: His603, Asp646 и Ser741.

ПГ может принимать две различные конформации. Глу-ПГ имеет наиболее компактную, закрытую конформацию [131]. Домен Pap, содержащий лизиловые и аргиниловые остатки (в частности, Lys50, Arg68 и Arg70), взаимодействует с сайтами связывания лизина КР-4 и КР-5. Считается, что эти взаимодействия играют критическую роль в поддержании закрытой конформации Glu-ПГ [130]. В условиях *in vitro* удаление Pap домена в ПЛ путем расщепления ковалентной связи между Lys77 и Lys78 приводит к образованию Lys-ПГ (Lys78–Asn791), который может быть дополнительно активирован в ПЛ с большей скоростью, чем Glu-ПГ [133]. Для превращения ПГ в ПЛ *in vivo* необходимо образование тройного комплекса ПГ с фибрином и тканевым активатором ПГ ТАП [131].

При окислительном стрессе ПГ легко подвергается ПТОМ, что приводит к изменению структуры и функции белка [69, 134]. Было показано, что индуцированное хлорамином окисление Glu-ПГ, но не Lys-ПГ, приводит примерно к 3-кратному увеличению образования ПЛ, используя как активатор УАП [135]. Эти данные позволили авторам предположить профибринолитическое действие хлораминов [135]. В другом исследовании [134] было показано, что ПГ, обработанный НОС1, сохранял свою структурную целостность, проявляющуюся в отсутствии димеризации или фрагментации белка, однако наблюдалась потеря его активности, зависящая от концентрации окислителя.

Масс-спектрометрия ПГ, обработанного небольшим количеством НОС1 или  $H_2O_2$ , обнаружила модификацию только остатков Met в положениях Met57, Met182, Met385, Met404, Met585 и Met788. Тот факт, что окисление этих остатков Met не влияло на функциональные свойства белка [69], привело к предположению, что эти легко окисляемые остатки Met обеспечивают эффективную антиоксидантную защиту белка. Выявленные с помощью масс-спектрометрии ПТОМ, возникающие в ПГ, выделенным из объединенной плазмы пациентов, которые страдали острой легочной эмболией, также свидетельствовало о значительном количестве окисленных остатков Met в белке [132], из которых шесть остатков Met перекрываются с таковыми, модифицированными *in vitro* [69]. Более детальную информацию, касающуюся антиоксидантной роли Met, можно найти в недавно опубликованной обзорной работе [32].

При увеличении концентрации окислителей наблюдалась частичная потеря активности Glu-ПГ, что, как предполагается авторами [69], связано с окислительным повреждением остатков триптофана. При окислении ПГ 100  $\mu$ M НОС1 в окислительную модификацию вовлекались: Trp108, Trp235, Trp325, Trp417, Trp486, Trp685 и

Trp761, в то время как окисление ПГ, обработанного 300 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, сопровождалось вовлечением в окислительную модификацию остатков триптофана Trp108, Trp325, Trp417 и Trp427 (Рис. 6). Четыре модифицированных остатка триптофана (Trp108, Trp315, Trp417, Trp783) были обнаружены *in vivo* [132], из которых два остатка триптофана (Trp108 и Trp417) перекрываются с таковыми в ПГ, модифицированным *in vitro* [69]. Так как общие при НОС1- или H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированном окислении ПГ модифицированные остатки Trp108, Trp325 и Trp417 являются функционально важными для ПГ [136], можно заключить, что их окисление ответственно за снижение биологической активности белка.

Сопоставление данных, полученных в работах [69] и [132], позволяет сделать два важных вывода. Во-первых, судя по повреждению структуры ПГ, уровень АФК в плазме крови больных при окислительном стрессе сопоставим с тем, который был использован *in vitro*. Во-вторых, антиоксидантный «ресурс» ПГ за счет превращения антиоксидантных Met в MetO истощается при относительно умеренном окислении белка. Можно предположить, что это является следствием компенсаторного механизма, регулирующего функциональную активность белков, участвующих в поддержании динамики свертывания крови и фибринолиза при окислительном стрессе в живом организме.

#### ОКИСЛЕНИЕ ТКАНЕВОГО АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА

ТАП (наряду с УАП) является важным компонентом фибринолитической системы крови, ответственным за растворение тромба. В условиях окислительного стресса экзогенный ТАП часто требуется для искусственной активации фибринолиза и используется клинически при лечении острого инфаркта миокарда [137].

ТАП экспрессируется эндотелиальными и гладкомышечными клетками в нормальных кровеносных сосудах [138], тогда как УАП играет важную роль в регуляции тканевого ремоделирования и может экспрессироваться всеми клетками сосуда – эндотелиальными, гладкомышечными и фибробластами [139]. Таким образом, принято считать, что активация лизиса внутрисосудистых отложений фибрина обеспечивается преимущественно ТАП, т. к. он обладает сродством к фибрину, а протеолиз в межклеточном пространстве – УАП, связанным с рецепторами на клетках сосудистой стенки [138, 139].

ТАП секретируется в виде пре-протеина (одноцепочечная молекула) и, подвергаясь протеолитическому действию ПЛ или трипсина, превращается в двуцепочечную молекулу с образованием тяжелых и легких цепей. Интересно отметить, что в отличие от УАП, который

проявляет лишь минимальную активность в качестве сериновой протеазы, пока не превратится в двуцепочечную форму, как одноцепочечная, так и двуцепочечная формы ТАП активны как сериновые протеазы и активаторы ПГ [140]. Таким образом, активацию ПГ можно рассматривать как двунаправленную реакцию, в которой плазмин(оген) и его активаторы функционируют одновременно как ферменты и субстраты [139].

У человека ТАП состоит из 527 аминокислот с молекулярной массой 69 кДа. Структура ТАП включает пять различных доменов, четыре из которых локализованы в тяжелой цепи: «finger»-домен (остатки 1–50) отвечает за связывание фибрина и обеспечивает образование тройного комплекса с ПГ [141], EGF-домен (остатки 51–91) и два КР-домена (остатки 92–261) [142]. Функция домена КР-1 остается неясной [143]. Домен КР-2 содержит сайты связывания лизина, которые поддерживают взаимодействие между ТАП и ПГ [144]. КР-2 способствует активации ПГ путем стабилизации тройного комплекса, включающего ТАП, ПГ и фибрин. Показано, что стимулирующее действие фибрина на активность ТАП опосредовано КР-2 и, в меньшей степени, «finger»-доменом. Последним доменом ТАП является SP домен (а. о. 276–527), содержащий каталитическую триаду His322, Asp371 и Ser478 и обеспечивающий каталитическое превращение ПГ в ПЛ посредством расщепления одной пептидной связи Arg561–Val562 [145] (Рис. 7).

Молекула ТАП содержит пять остатков Met в положениях 13, 207, 455, 490 и 525 [146], а также один остаток Cys83, который, как полагают [147], может влиять на активацию ТАП при окислительном стрессе.

Было исследовано влияние экзогенной  $H_2O_2$  на уровень экспрессии белков фибринолитической системы, в том числе, ТАП в эндотелиальных клетках пупочной вены человека [148]. Экспрессия выбранных генов, участвующих в фибринолизе под влиянием окислительного стресса, была проанализирована на уровне активности мРНК, белка и промотора. Результаты проведенных исследований показали, что окислительный стресс в эндотелиальных клетках вызывает значительное увеличение экспрессии PAI-1 и умеренное повышение экспрессии ТАП и УАП [147]. Этот важный результат свидетельствует о том, что в процессе эволюции фибринолитическая система была адаптирована к действию окислительного стресса.

Индукцированное окисление ТАП, обработанного хлорноватистой кислотой, выявило существенную потерю аффинности связывания фибрина. Однако скорость реакции взаимодействия ТАП с ПГ оставалась такой же, как и у необработанного ТАП [149]. Было также

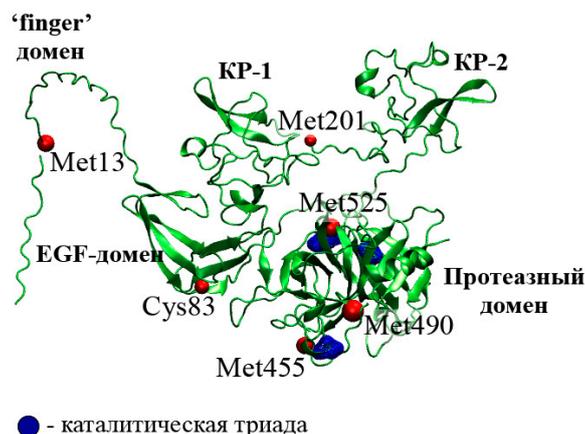


Рис. 7. Структура тканевого активатора плазминогена (ТАП) (AlphaFold ID: AF-P00750-F1 [88, 89] с отмеченными окисленными остатками метионина.

Рисунок выполнен с помощью программы VMD1.9.3 (University of Illinois at Urbana-Champaign, USA).

показано, что обработка ТАП хлорамином приводила к превращению Met207 в MetO без потери биологической активности белка [150]. Когда ТАП обрабатывали возрастающими количествами ТБГП, специфичного окислителя для Met, способного окислять только остатки Met, было обнаружено, что три из пяти остатков Met претерпевают модификации: Met13, Met207 и Met525 [146] и никакие другие остатки не могли подвергаться повреждению во время обработки ТБГП. Биологическая активность белковой молекулы не изменялась при обработке ТБГП. Тот факт, что окисление Met13, Met207 и Met525, не влияло на способность молекулы ТАП превращать ПГ в ПЛ и последующий гидролиз фибринового сгустка, указывает на то, что эти остатки Met являются ловушками АФК, выполняя, тем самым, антиоксидантную роль. Met13 расположен в 'finger'-домене, тогда как Met207 и Met525 находятся в KR-2-домене и в СООН-концевом участке протеазного SP-домена, соответственно [142]. Все три из этих легко окисляемых остатков Met экспонированы на поверхности белка, в то время как оставшиеся два устойчивых к окислению Met455 и Met490 локализованы внутри SP-домена [146]. То, что поверхностно экспонированный Met525 расположен в SP-домене, можно рассматривать как антиоксидантную адаптацию белка к действию АФК.

Установлено, что функциональная активность ТАП может снижаться при обработке белка пероксинитритом (OONO<sup>-</sup>) [151]. Моле-

кула ТАП содержит 23 остатка тирозина, из которых два тирозина содержатся в фибрин-связывающем «finger»-домене и девять тирозинов присутствуют в SP-домене [145]. Как показали авторы [150], инкубация ТАП с  $\text{OONO}^-$  вела к накоплению нитротирозинов в белке, что вызывало нарушение функции белка. В этой связи возникают некоторые вопросы. В данном исследовании положения конкретных тирозинов, подвергшихся модификации, не были идентифицированы и поэтому функциональная значимость образующихся производных тирозина в повреждении структуры и функции ТАП остается неясной. Кроме того, остатки Met и Tug, проявляющие высокую реакционную способность к взаимодействию с  $\text{OONO}^-$  [152], также могли быть мишенью для окислителя. Таким образом, природа ингибирования активности ТАП, по-прежнему, остается предметом дискуссии.

#### ОКИСЛЕНИЕ ИНГИБИТОРА АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА ПЕРВОГО ТИПА

ИАП-1, принадлежащий к семейству ингибиторов сериновых протеаз (серпины), является важным регуляторным белком, который действует как основной ингибитор ТАП и УАП [153, 154]. Будучи способным связывать активаторы ПГ, ИАП-1 также взаимодействует с такими мишенями, как витронектин, гепарин и эндоцитарные рецепторы, принадлежащие к семейству рецепторов липопротеинов низкой плотности [155]. Кроме того, ИАП-1 участвуют в физиологических и патофизиологических процессах таких, как заживление ран и ремоделирование тканей, сердечно-сосудистые заболевания, рак и возрастные заболевания [156]. Таким образом, ИАП-1 обладает уникальной ролью в плазме крови, поддерживая баланс между механизмами коагуляции и фибринолиза.

Концентрация ИАП-1 в плазме относительно низкая (5–50 нг/мл) [156]. Врожденный дефицит ИАП-1 увеличивает риск геморрагических осложнений. Увеличенный уровень ИАП-1 связан, главным образом, с сердечно-сосудистыми заболеваниями, такими как атеросклероз, инфаркт миокарда, тромбоз глубоких вен, послеоперационные тромбозы и др. [157].

Соотношение между компонентами системы ИАП/ТАП-УАП имеет решающее значение для физиологической активности ИАП-1, поскольку ингибитор быстро связывается с активаторами ПГ в кровотоке. Вопрос АФК-зависимой регуляции экспрессии ИАП-1 представляется еще более сложным, поскольку имеющиеся данные о ИАП-1 и активаторах ПГ противоречивы. Индукция ИАП-1,

сопровождающаяся снижением РА, может привести к снижению внутрисосудистой фибринолитической активности. Дисбаланс в системе ИАП/ТАП-УАП также может возникать, когда уровень одного компонента повышен, а уровень других остается без изменений.

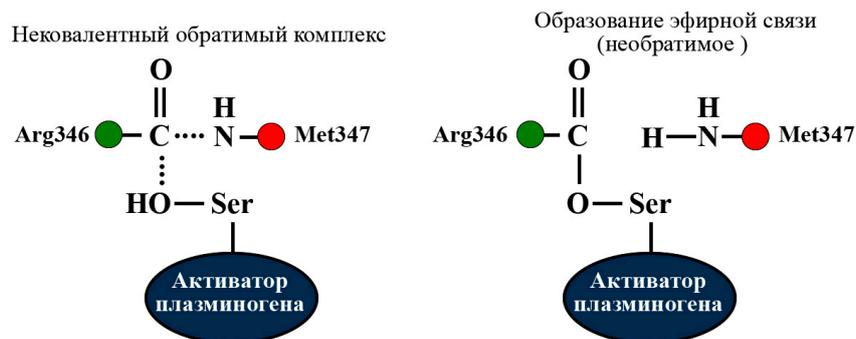
Различные стимулы, включая окислительный стресс, вызывают экспрессию гена ИАП-1 благодаря повышенной генерации АФК таких, как  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  и  $OH^\bullet$  [148, 158, 159]. Было показано, что эти эффекты блокируются применением антиоксидантов (например, N-ацетилцистеин) и антиоксидантных ферментов (каталаза, СОД). В зависимости от типа клеток и используемого стимула ИАП-1 может быть активирован либо всеми тремя формами АФК,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  и  $OH^\bullet$ , либо только за счет одной из них. Было показано, что окислительный стресс может увеличивать секрецию одновременно как ИАП-1, так и ТАП [148, 160]. Однако некоторые авторы отметили отсутствие усиления ИАП-1 за счет перепроизводства АФК [161]. Таким образом, в ряде исследований было отмечено участие АФК в регуляции гена ИАП-1 в эндотелиальных клетках, хотя эти данные пока носят противоречивый характер [162].

Будучи одноцепочечным гликопротеином массой ~50 кДа, ИАП-1 состоит из 379 аминокислот и не имеет остатков Cys [163]. Третичная структура белка включает три  $\beta$ -листа (А, В и С), девять  $\alpha$ -спиралей и открытую реакционную центральную петлю (RCL), которая содержит реактивный сайт Arg346-Met347, необходимый для связывания целевой сериновой протеазы [163] и обозначаемый как остаток P1-P1' [164] (Рис. 8а). ИАП-1 ингибирует ТАП или УАП путем образования ковалентного комплекса, тем самым блокируя их дальнейшее взаимодействие с субстратом [165].

Ингибирующий процесс включает образование нековалентного обратного комплекса, характеризующегося низким значением константы диссоциации ( $10^{10}$ – $10^{14}$  М), и последующее необратимое образование сложноэфирной связи между карбоксильной группой остатка P1 и гидроксильной группой серинового остатка протеазы [164]. Помимо активной (исходной) и расщепленной (комплексной) форм ИАП-1 существует латентная форма ИАП-1. В этой структуре вся N-концевая часть RCL (т. е. остатки P1-P16) располагается внутри белка, составляя центральную часть  $\beta$ -листа А (Рис. 8б). Это повышает стабильность ИАП-1, но снижает его ингибирующую активность.

ИАП-1 оказался чувствительным белком к окислительной инактивации, предположительно из-за окисления одного или нескольких остатков Met [166]. Поскольку окислители, высвобождаемые во

А



Б

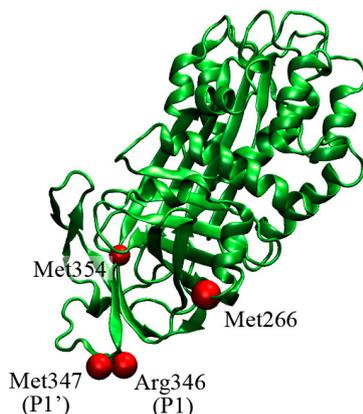


Рис. 8. а) Этапы процесса взаимодействия ингибитора активаторов плазминогена-1 (ИАП-1) с активатором плазминогена;

б) Структура ИАП-1 (PDB ID: 1B3K) с отмеченным реактивным сайтом Arg346–Met347 и метонинами 266 и 354.

Рисунок выполнен с помощью программы VMD1.9.3 (University of Illinois at Urbana–Champaign, USA).

время воспалительного процесса, могут инактивировать ингибиторы протеазы [167] и тем самым способствовать протеолизу, возможно, что окислительная инактивация ИАП-1 может играть важную роль в регуляции активации ПГ. Благодаря тому факту, что ИАП-1 имеет остаток Met в своем реакционном центре в положении P1' [164], было высказано предположение, что ИАП-1 может быть инактивирован путем специфического окисления этого остатка Met [166]. Индуцированное окисление (N-хлорсукцинимидом или хлорамином

Т) ИАП-1 вызывало окислительную модификацию остатка Met, Met347 в реактивном центре P1' [168]. Однако, как предположили те же авторы, наблюдаемая инактивация белка может быть обусловлена не окислением остатков Met, а масштабными конформационными изменениями в молекуле ИАП-1, которые были подтверждены методом кругового дихроизма [168].

Для исследования роли Met347 в реактивном центре P1' в окислительной инактивации ИАП-1 был использован сайт-направленный мутагенез [168]. Были созданы мутанты, в которых Met347 один или оба остатка Met, Met347 и Met266 или Met347 и Met354 были заменены на устойчивые к окислению остатки валина. Мутантные ингибиторы, экспрессированные *E. coli*, были очищены и биохимически охарактеризованы. Очищенные мутанты ИАП-1 не показали значительной разницы в специфической ингибирующей активности в отношении активаторов ПГ по сравнению с природным ИАП-1, что указывает на то, что замены Met на валин не вносят каких-либо существенных изменений в структуру ИАП-1. Эти данные также предполагают, что остаток Met347, а также остатки Met266, который вероятно, находится на поверхности молекулы, и Met354, расположенный близко к области молекулы ИАП-1, которая, как предполагается, взаимодействует с ТАП [169], не ответственны за окислительную инактивацию ИАП-1 [168]. Совокупность полученных данных позволила авторам сделать вывод о том, что окислительная инактивация ИАП-1 не вызвана специфическим окислением Met, а является результатом конформационных перестроек в структуре белка [168].

## V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре мы рассмотрели роль окисления некоторых белков гемостаза в повреждении их структуры и функции. Значительная часть белков гемостаза остается полностью неисследованной в отношении их окисления, в то время как окисление многих других белков гемостаза исследовано явно в недостаточной степени. Наблюдается острый дефицит применения масс спектрометрии для выявления ПТМО. Неоднозначность в трактовании роли отдельных окислительных сайтов в нарушении функционирования белков гемостаза, рассмотренных в данном обзоре, также может быть обусловлена недостаточностью использования масс спектрометрии. Дальнейшее накопление данных по окислительной модификации белков гемостаза *in vitro* и *in vivo* будет способствовать более глубокому пониманию последствий окисления на функционирование

белков гемостаза как общего механизма сохранения или нарушения баланса между коагуляционными, антикоагуляционными и фибринолитическими белками при окислительном стрессе.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Lankin, V.Z., Tikhaze, A.K. and Melkumyant, A.M. (2022) Dicarboxyl-Dependent Modification of LDL as a Key Factor of Endothelial Dysfunction and Atherosclerotic Vascular Wall Damage. *Antioxidants (Basel)*, **11**, 1565.
2. Гривенкова В.Г. и Виноградов А.Д. (2013) Генерация активных форм кислорода митохондриями. *Успехи биологической химии*, **53**, 245–296. <https://doi.org/10.1134/S0006297913130087/>
3. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. (2013) Окислительный Стресс. Патологические Состояния и Заболевания. Сибирское университетское издательство, Новосибирск. <https://books.google.ru/books?id=sktj-jYuQdgC>.
4. Беловолова Л.В. (2020) Активные формы кислорода в водных средах (обзор). *Журнал технической физики*, **129**, 923. <https://doi.org/10.21883/OS.2020.07.49565.64-20>.
5. Ray, P.D., Huang, B.-W. and Tsuji, Y. (2012) Reactive Oxygen Species (ROS) Homeostasis and Redox Regulation in Cellular Signaling. *Cellular Signalling*, **24**, 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>.
6. Ahire, J.J., Mokashe, N.U., Patil, H.J. and Chaudhari, B.L. (2013) Antioxidative Potential of Folate Producing Probiotic *Lactobacillus Helveticus* CD6. *Journal of Food Science and Technology*, **50**, 26–34. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0244-0>.
7. Cheung, E.C. and Vousden, K.H. (2022) The Role of ROS in Tumour Development and Progression. *Nature Reviews Cancer*, **22**, 280–297. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00435-0>.
8. Senoner, T. and Dichtl, W. (2019) Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? *Nutrients*, **11**, 2090. <https://doi.org/10.3390/nu11092090>.
9. Wiegman, C.H., Li, F., Ryffel, B., Togbe, D. and Chung, K.F. (2020) Oxidative Stress in Ozone-Induced Chronic Lung Inflammation and Emphysema: A Facet of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Frontiers in Immunology*, **11**, 1957. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01957>.
10. Rendra, E., Riabov, V., Mossel, D.M., Sevastyanova, T., Harmsen, M.C. and Kzhyshkowska, J. (2019) Reactive Oxygen Species (ROS) in Macrophage Activation and Function in Diabetes. *Immunobiology*, **224**, 242–253.

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных и участием людей в качестве объектов исследований.

- <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2018.11.010>.
11. Berlett, B.S. and Stadtman, E.R. (1997) Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 20313–20316. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.33.20313>.
  12. Tönnies, E. and Trushina, E. (2017) Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, **57**, 1105–1121. <https://doi.org/10.3233/JAD-161088>.
  13. Singh, A., KuKPeti, R., Saso, L. and KuKPeti, S. (2019) Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, **24**, 1583. <https://doi.org/10.3390/molecules24081583>.
  14. Panasenkov, O.M., Gorudko, I.V. and Sokolov, A.V. (2013) Hypochlorous Acid as a Precursor of Free Radicals in Living Systems. *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1466–1489. <https://doi.org/10.1134/S0006297913130075>.
  15. Ulfig, A. and Leichert, L.I. (2021) The Effects of Neutrophil-Generated Hypochlorous Acid and Other Hypohalous Acids on Host and Pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **78**, 385–414. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03591-y>.
  16. McCall, M.R., Carr, A.C., Forte, T.M. and Frei, B. (2001) LDL Modified by Hypochlorous Acid Is a Potent Inhibitor of Lecithin-Cholesterol Acyltransferase Activity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **21**, 1040–1045. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.21.6.1040>.
  17. Hawkins, C.L. and Davies, M.J. (1999) Hypochlorite-Induced Oxidation of Proteins in Plasma: Formation of Chloramines and Nitrogen-Centred Radicals and Their Role in Protein Fragmentation. *Biochemical Journal*, **340**, 539–548. <https://doi.org/10.1042/bj3400539>.
  18. Pattison, D.I. and Davies, M.J. (2001) Absolute Rate Constants for the Reaction of Hypochlorous Acid with Protein Side Chains and Peptide Bonds. *Chemical Research in Toxicology*, **14**, 1453–1464. <https://doi.org/10.1021/tx0155451>.
  19. Carr, A.C. and Winterbourn, C.C. (1997) Oxidation of Neutrophil Glutathione and Protein Thiols by Myeloperoxidase-Derived Hypochlorous Acid. *Biochemical Journal*, **327**, 275–281. <https://doi.org/10.1042/bj3270275>.
  20. Beck-Speier, I., Leuschel, L., Luipold, G. and Maier, K.L. (1988) Proteins Released from Stimulated Neutrophils Contain Very High Levels of Oxidized Methionine. *FEBS Letters*, **227**, 1–4. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)81401-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)81401-7).
  21. Nielsen, H.K., Löfger, J. and Hurrell, R.F. (1985) Reactions of Proteins with Oxidizing Lipids: 1. Analytical Measurements of Lipid Oxidation and of Amino Acid Losses in a Whey Protein-Methyl Linolenate Model System. *British Journal of Nutrition*, **53**, 61–73. <https://doi.org/10.1079/BJN19850011>.
  22. Stadtman, E.R. and Levine, R.L. (2006) Protein Oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **899**, 191–208. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x>.
  23. Temple, A., Yen, T.-Y. and Gronert, S. (2006) Identification of Specific Protein Carbonylation Sites in Model Oxidations of Human Serum Albumin. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **17**, 1172–1180. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2006.04.030>.

24. Requena, J.R., Levine, R.L. and Stadtman, E.R. (2003) Recent Advances in the Analysis of Oxidized Proteins. *Amino Acids*, **25**, 221–226. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0012-1>.
25. Fedorova, M., Bollineni, R.C. and Hoffmann, R. (2014) Protein Carbonylation as a Major Hallmark of Oxidative Damage: Update of Analytical Strategies: PROTEIN CARBONYLATION: AN ANALYTICAL UPDATE. *Mass Spectrometry Reviews*, **33**, 79–97. <https://doi.org/10.1002/mas.21381>.
26. Beal, M.F. (2002) Oxidatively Modified Proteins in Aging and Disease<sup>1,2</sup> Guest Editor: Earl Stadtman<sup>2</sup>This Article Is Part of a Series of Reviews on “Oxidatively Modified Proteins in Aging and Disease.” The Full List of Papers May Be Found on the Homepage of the Journal. *Free Radical Biology and Medicine*, **32**, 797–803. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00780-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00780-3).
27. Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R. and Milzani, A. (2003) Protein Carbonylation in Human Diseases. *Trends in Molecular Medicine*, **9**, 169–176. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(03\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(03)00031-5).
28. Hlaváčková, A., Štikarová, J., Pimková, K., Chrastinová, L., Májek, P., Kotlín, R., Čermák, J., Suttnar, J. and Dyr, J.E. (2017) Enhanced Plasma Protein Carbonylation in Patients with Myelodysplastic Syndromes. *Free Radical Biology and Medicine*, **108**, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.007>.
29. Levine, R.L., Mosoni, L., Berlett, B.S. and Stadtman, E.R. (1996) Methionine Residues as Endogenous Antioxidants in Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, 15036–15040. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15036>.
30. Lim, J.M., Kim, G. and Levine, R.L. (2019) Methionine in Proteins: It’s Not Just for Protein Initiation Anymore. *Neurochemical Research*, **44**, 247–257. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2460-0>.
31. Aledo, J.C. (2019) Methionine in Proteins: The Cinderella of the Proteinogenic Amino Acids. *Protein Science*, **28**, 1785–1796. <https://doi.org/10.1002/pro.3698>.
32. Rosenfeld, M.A., Yurina, L.V. and Vasilyeva, A.D. (2023) Antioxidant Role of Methionine-Containing Intra- and Extracellular Proteins. *Biophysical Reviews*, **15**, 367–383. <https://doi.org/10.1007/s12551-023-01056-7>.
33. Griffiths, H.R., Dias, I.H.K., Willetts, R.S. and Devitt, A. (2014) Redox Regulation of Protein Damage in Plasma. *Redox Biology*, **2**, 430–435. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.01.010>.
34. Poole, L.B. (2015) The Basics of Thiols and Cysteines in Redox Biology and Chemistry. *Free Radical Biology and Medicine*, **80**, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.013>.
35. Aoyama, K. (2021) Glutathione in the Brain. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, 5010. <https://doi.org/10.3390/ijms22095010>.
36. Poole, L.B., Karplus, P.A. and Clai-borne, A. (2004) Protein Sulfenic Acids in Redox Signaling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **44**, 325–347. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121735>.
37. Antelmann, H. and Hellmann, J.D. (2011) Thiol-Based Redox Switches and Gene Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, **14**, 1049–1063.

- <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3400>.
38. Forman, H.J., Zhang, H. and Rinna, A. (2009) Glutathione: Overview of Its Protective Roles, Measurement, and Biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, **30**, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>.
39. Bourdon, E., Loreau, N., Lagrost, L. and Blache, D. (2005) Differential Effects of Cysteine and Methionine Residues in the Antioxidant Activity of Human Serum Albumin. *Free Radical Research*, **39**, 15–20. <https://doi.org/10.1080/10715760400024935>.
40. Розенфельд М.А., Юрина Л.В. и Васильева А.Д. (2021) Функциональная роль окисления метионинов в белках: аргументы “за” и “против”. *Успехи современной биологии*, **141**, 315–335. <https://doi:10.31857/S0042132421040050>.
41. Suzuki, S., Kodera, Y., Saito, T., Fujimoto, K., Momozono, A., Hayashi, A., Kamata, Y. and Shichiri, M. (2016) Methionine Sulfoxides in Serum Proteins as Potential Clinical Biomarkers of Oxidative Stress. *Scientific Reports*, **6**, 38299. <https://doi.org/10.1038/srep38299>.
42. Momozono, A., Kodera, Y., Sasaki, S., Nakagawa, Y., Konno, R. and Shichiri, M. (2020) Oxidised Met147 of Human Serum Albumin Is a Biomarker of Oxidative Stress, Reflecting Glycaemic Fluctuations and Hypoglycaemia in Diabetes. *Scientific Reports*, **10**, 268. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57095-2>.
43. Podoplelova, N.A., Sulimov, V.B., Ilin, I.S., Tashilova, A.S., Panteleev, M.A., Ledeneva, I.V. and Shikhaliev, Kh.S. (2020) Blood Coagulation in the 21st Century: Existing Knowledge, Current Strategies for Treatment and Perspective. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology*, **19**, 139–157. <https://doi.org/10.24287/1726-1708-2020-19-1-139-157>.
44. Norris, L.A. (2003) Blood Coagulation. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, **17**, 369–383. [https://doi.org/10.1016/S1521-6934\(03\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S1521-6934(03)00014-2).
45. Grover, S.P. and Mackman, N. (2019) Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis: Insights From Animal Models. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **39**, 331–338. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.312130>.
46. Бутылин А.А., Пантелеев М.А. и Атауллаханов Ф.И. (2007) Пространственная динамика свертывания крови. *Российский химический журнал*, **51**, 45–50.
47. Ataullakhanov, F.I. and Rummyantsev, A.G. (2018) New Insights into the Blood Clotting. *Russian Journal of Children Hematology and Oncology*, **5**, 13–22. <https://doi.org/10.17650/2311-1267-2018-5-3-13-22>.
48. Medved, L. and Weisel, J.W. (2022) The Story of the Fibrin(Ogen) AC-Domains: Evolution of Our View on Their Structure and Interactions. *Thrombosis and Haemostasis*, **122**, 1265–1278. <https://doi.org/10.1055/a-1719-5584>.
49. Weisel, J.W. and Litvinov, R.I. (2017) Fibrin Formation, Structure and Properties. In: Parry, D.A.D. and Squire, J.M., Eds., *Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms*, Springer International Publishing, Cham, 405–456. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-49674-0\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-49674-0_13).
50. Litvinov, R.I., Pieters, M., De Lange-Loots, Z. and Weisel, J.W. (2021)

- Fibrinogen and Fibrin. In: Harris, J.R. and Marles-Wright, J., Eds., *Macromolecular Protein Complexes III: Structure and Function*, Springer International Publishing, Cham, 471–501.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-58971-4\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-030-58971-4_15).
51. Shacter, E., Williams, J.A., Lim, M. and Levine, R.L. (1994) Differential Susceptibility of Plasma Proteins to Oxidative Modification: Examination by Western Blot Immunoassay. *Free Radical Biology and Medicine*, **17**, 429–437.  
[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90169-4](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90169-4).
  52. Mañucat-Tan, N., Zeineddine Abdallah, R., Kaur, H., Saviane, D., Wilson, M.R. and Wyatt, A.R. (2021) Hypochlorite-Induced Aggregation of Fibrinogen Underlies a Novel Antioxidant Role in Blood Plasma. *Redox Biology*, **40**, 101847.  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101847>.
  53. Weigandt, K.M., White, N., Chung, D., Ellingson, E., Wang, Y., Fu, X. and Pozzo, D.C. (2012) Fibrin Clot Structure and Mechanics Associated with Specific Oxidation of Methionine Residues in Fibrinogen. *Biophysical Journal*, **103**, 2399–2407.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.10.036>.
  54. Yurina, L., Vasilyeva, A., Indeykina, M., Bugrova, A., Biryukova, M., Kononikhin, A., Nikolaev, E. and Rosenfeld, M. (2019) Ozone-Induced Damage of Fibrinogen Molecules: Identification of Oxidation Sites by High-Resolution Mass Spectrometry. *Free Radical Research*, **53**, 430–455.  
<https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1600686>.
  55. Martinez, M., Weisel, J.W. and Ischiropoulos, H. (2013) Functional Impact of Oxidative Posttranslational Modifications on Fibrinogen and Fibrin Clots. *Free Radical Biology and Medicine*, **65**, 411–418.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.039>.
  56. Sovová, Ž., Štikarová, J., Kaufmanová, J., Májek, P., Suttnar, J., Šácha, P., Malý, M. and Dyr, J.E. (2020) Impact of Posttranslational Modifications on Atomistic Structure of Fibrinogen. Lomonaco, T., Ed., *PLOS ONE*, **15**, e0227543.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227543>.
  57. Yurina, L.V., Vasilyeva, A.D., Kononenko, V.L., Bugrova, A.E., Indeykina, M.I., Kononikhin, A.S., Nikolaev, E.N. and Rosenfeld, M.A. (2020) The Structural–Functional Damage of Fibrinogen Oxidized by Hydrogen Peroxide. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, **492**, 130–134.  
<https://doi.org/10.1134/S1607672920020167>.
  58. White, N.J., Wang, Y., Fu, X., Cardenas, J.C., Martin, E.J., Brophy, D.F., Wade, C.E., Wang, X., St. John, A.E., Lim, E.B., Stern, S.A., Ward, K.R., López, J.A. and Chung, D. (2016) Post-Translational Oxidative Modification of Fibrinogen Is Associated with Coagulopathy after Traumatic Injury. *Free Radical Biology and Medicine*, **96**, 181–189.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.023>.
  59. Rosenfeld, M.A., Shchegolikhin, A.N., Bychkova, A.V., Leonova, V.B., Biryukova, M.I. and Kostanova, E.A. (2014) Ozone-Induced Oxidative Modification of Fibrinogen: Role of the D Regions. *Free Radical Biology and Medicine*, **77**, 106–120.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.018>.
  60. Paton, L.N., Mocatta, T.J., Richards, A.M. and Winterbourn, C.C. (2010) Increased Thrombin-Induced Polymerization of Fibrinogen Associated with High Protein Carbonyl Levels in Plasma from Patients Post Myocardial Infarction. *Free Radical Biology and Medicine*, **48**, 223–229.

- <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.10.044>.
61. de Vries, J.J., Snoek, C.J.M., Rijken, D.C. and de Maat, M.P.M. (2020) Effects of Post-Translational Modifications of Fibrinogen on Clot Formation, Clot Structure, and Fibrinolysis: A Systematic Review. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **40**, 554–569. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.313626>.
62. Štikarová, J., Kotlín, R., Riedel, T., Suttnar, J., Pimková, K., Chrastinová, L. and Dyr, J.E. (2013) The Effect of Reagents Mimicking Oxidative Stress on Fibrinogen Function. *The Scientific World Journal*, **2013**, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/359621>.
63. Undas, A., Szuldrzynski, K., Stepień, E., Zalewski, J., Godlewski, J., Tracz, W., Pasowicz, M. and Zmudka, K. (2008) Reduced Clot Permeability and Susceptibility to Lysis in Patients with Acute Coronary Syndrome: Effects of Inflammation and Oxidative Stress. *Atherosclerosis*, **196**, 551–557. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.05.028>.
64. Tsurupa, G., Hantgan, R.R., Burton, R.A., Pechik, I., Tjandra, N. and Medved, L. (2009) Structure, Stability, and Interaction of the Fibrin(Ogen) AC-Domains. *Biochemistry*, **48**, 12191–12201. <https://doi.org/10.1021/bi901640e>.
65. Zhmurov, A., Protopopova, A.D., Litvinov, R.I., Zhukov, P., Mukhitov, A.R., Weisel, J.W. and Barsegov, V. (2016) Structural Basis of Interfacial Flexibility in Fibrin Oligomers. *Structure*, **24**, 1907–1917. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.08.009>.
66. Van Patten, S.M., Hanson, E., Bernasconi, R., Zhang, K., Manavalan, P., Cole, E.S., McPherson, J.M. and Edmunds, T. (1999) Oxidation of Methionine Residues in Antithrombin. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 10268–10276. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.15.10268>.
67. Levine, R., Moskovitz, J. and Stadtman, E. (2001) Oxidation of Methionine in Proteins: Roles in Antioxidant Defense and Cellular Regulation. *IUBMB Life*, **50**, 301–307. <https://doi.org/10.1080/713803735>.
68. Vasilyeva, A., Yurina, L., Shchegolikhin, A., Indeykina, M., Bugrova, A., Kononikhin, A., Nikolaev, E. and Rosenfeld, M. (2020) The Structure of Blood Coagulation Factor XIII Is Adapted to Oxidation. *Biomolecules*, **10**, 914. <https://doi.org/10.3390/biom10060914>.
69. Vasilyeva, A., Yurina, L., Ivanov, V., Azarova, D., Gavrilina, E., Indeykina, M., Bugrova, A., Kononikhin, A., Nikolaev, E. and Rosenfeld, M. (2022) The Effect of Hypochlorite and Peroxide-Induced Oxidation of Plasminogen on Damage to the Structure and Biological Activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, **206**, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.128>.
70. Chen, R. and Doolittle, R.F. (1971)  $\gamma$ - $\gamma$  Cross-Linking Sites in Human and Bovine Fibrin. *Biochemistry*, **10**, 4486–4491. <https://doi.org/10.1021/bi00800a021>.
71. Bode, W. (2006) Structure and Interaction Modes of Thrombin. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **36**, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.12.027>.
72. Jackson, C.M. and Nemerson, Y. (1980) Blood Coagulation. *Annual Review of Biochemistry*, **49**, 765–811. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.49.070180.004001>.
73. Page, M.J. and Di Cera, E. (2008) Serine Peptidases: Classification, Structure and Function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **65**, 1220–1236.

- <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7565-9>.
74. Di Cera, E. (2008) Thrombin. *Molecular Aspects of Medicine*, **29**, 203–254.  
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.01.001>.
  75. Pechik, I., Madrazo, J., Mosesson, M.W., Hernandez, I., Gilliland, G.L. and Medved, L. (2004) Crystal Structure of the Complex between Thrombin and the Central “E” Region of Fibrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**, 2718–2723.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0303440101>.
  76. Xu, H., Bush, L.A., Pineda, A.O., Caccia, S. and Di Cera, E. (2005) Thrombomodulin Changes the Molecular Surface of Interaction and the Rate of Complex Formation between Thrombin and Protein C. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 7956–7961.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M412869200>.
  77. Sheehan, J.P. and Sadler, J.E. (1994) Molecular Mapping of the Heparin-Binding Exosite of Thrombin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**, 5518–5522.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5518>.
  78. Li, W., Johnson, D.J.D., Esmon, C.T. and Huntington, J.A. (2004) Structure of the Antithrombin–Thrombin–Heparin Ternary Complex Reveals the Antithrombotic Mechanism of Heparin. *Nature Structural & Molecular Biology*, **11**, 857–862.  
<https://doi.org/10.1038/nsmb811>.
  79. De Cristofaro, R. and Landolfi, R. (2000) Oxidation of Human Alpha-Thrombin by the Myeloperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Chloride System: Structural and Functional Effects. *Thrombosis and Haemostasis*, **83**, 253–261.
  80. Eigenbrot, C. (2002) Structure, Function, and Activation of Coagulation Factor VII. *Current Protein and Peptide Science*, **3**, 287–299.  
<https://doi.org/10.2174/1389203023380675>.
  81. Morrissey, J., Macik, B., Neuenchwander, P. and Comp, P. (1993) Quantitation of Activated Factor VII Levels in Plasma Using a Tissue Factor Mutant Selectively Deficient in Promoting Factor VII Activation. *Blood*, **81**, 734–744.  
<https://doi.org/10.1182/blood.V81.3.734.734>.
  82. Kondo, S. and Kisiel, W. (1987) Regulation of Factor VIIa Activity in Plasma: Evidence That Antithrombin III Is the Sole Plasma Protease Inhibitor of Human Factor VIIa. *Thrombosis Research*, **46**, 325–335.  
[https://doi.org/10.1016/0049-3848\(87\)90294-5](https://doi.org/10.1016/0049-3848(87)90294-5).
  83. Furie, B. and Furie, B.C. (1988) The Molecular Basis of Blood Coagulation. *Cell*, **53**, 505–518.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90567-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90567-3).
  84. Gajsiewicz, J. and Morrissey, J. (2015) Structure–Function Relationship of the Interaction between Tissue Factor and Factor VIIa. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **41**, 682–690.  
<https://doi.org/10.1055/s-0035-1564044>.
  85. Pike, A.C.W., Brzozowski, A.M., Roberts, S.M., Olsen, O.H. and Persson, E. (1999) Structure of Human Factor VIIa and Its Implications for the Triggering of Blood Coagulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 8925–8930.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.8925>.
  86. Bernardi, F. and Mariani, G. (2021) Biochemical, Molecular and Clinical Aspects of Coagulation Factor VII and Its Role in Hemostasis and Thrombosis. *Haematologica*, **106**, 351–362.

- <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.248542>.
87. Persson, E., Nielsen, L.S. and Olsen, O.H. (2001) Substitution of Aspartic Acid for Methionine-306 in Factor VIIa Abolishes the Allosteric Linkage between the Active Site and the Binding Interface with Tissue Factor. *Biochemistry*, **40**, 3251–3256. <https://doi.org/10.1021/bi001612z>.
88. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P. and Hassabis, D. (2021) Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature*, **596**, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
89. Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Židek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., Figurnov, M., Cowie, A., Hobbs, N., Kohli, P., Kleywegt, G., Birney, E., Hassabis, D. and Velankar, S. (2022) AlphaFold Protein Structure Database: Massively Expanding the Structural Coverage of Protein-Sequence Space with High-Accuracy Models. *Nucleic Acids Research*, **50**, D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>.
90. Kornfelt, T., Persson, E. and Palm, L. (1999) Oxidation of Methionine Residues in Coagulation Factor VIIa. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **363**, 43–54. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.1071>.
91. Soenderkaer, S., Carpenter, J.F., Van De Weert, M., Hansen, L.L., Flink, J. and Frokjaer, S. (2004) Effects of Sucrose on RFVIIa Aggregation and Methionine Oxidation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **21**, 597–606. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2003.12.010>.
92. Dickinson, C.D., Kelly, C.R. and Ruf, W. (1996) Identification of Surface Residues Mediating Tissue Factor Binding and Catalytic Function of the Serine Protease Factor VIIa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, 14379–14384. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14379>.
93. Esmon, C.T. (1989) The Roles of Protein C and Thrombomodulin in the Regulation of Blood Coagulation. *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 4743–4746. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)83649-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)83649-3).
94. Suzuki, K., Kusumoto, H., Deyashiki, Y., Nishioka, J., Maruyama, I., Zushi, M., Kawahara, S., Honda, G., Yamamoto, S. and Horiguchi, S. (1987) Structure and Expression of Human Thrombomodulin, a Thrombin Receptor on Endothelium Acting as a Cofactor for Protein C Activation. *The EMBO Journal*, **6**, 1891–1897. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02448.x>.
95. Stearns-Kurosawa, D.J., Kurosawa, S., Mollica, J.S., Ferrell, G.L. and Esmon, C.T. (1996) The Endothelial Cell Protein C Receptor Augments Protein C Activation by the Thrombin-Thrombomodulin Complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, 10212–10216. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.19.10212>.

96. Zushi, M., Gomi, K., Yamamoto, S., Maruyama, I., Hayashi, T. and Suzuki, K. (1989) The Last Three Consecutive Epidermal Growth Factor-like Structures of Human Thrombomodulin Comprise the Minimum Functional Domain for Protein C-Activating Cofactor Activity and Anticoagulant Activity. *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 10351–10353. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)81626-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)81626-X).
97. Li, Y.-H., Kuo, C.-H., Shi, G.-Y. and Wu, H.-L. (2012) The Role of Thrombomodulin Lectin-like Domain in Inflammation. *Journal of Biomedical Science*, **19**, 34. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-34>.
98. Boron, M., Hauzer-Martin, T., Keil, J. and Sun, X.-L. (2022) Circulating Thrombomodulin: Release Mechanisms, Measurements, and Levels in Diseases and Medical Procedures. *TH Open*, **06**, e194–e212. <https://doi.org/10.1055/a-1801-2055>.
99. Wood, M.J., Becvar, L.A., Prieto, J.H., Melacini, G. and Komives, E.A. (2003) NMR Structures Reveal How Oxidation Inactivates Thrombomodulin. *Biochemistry*, **42**, 11932–11942. <https://doi.org/10.1021/bi034646q>.
100. Prieto, J.H., Sampoli Benitez, B.A., Melacini, G., Johnson, D.A., Wood, M.J. and Komives, E.A. (2005) Dynamics of the Fragment of Thrombomodulin Containing the Fourth and Fifth Epidermal Growth Factor-like Domains Correlate with Function. *Biochemistry*, **44**, 1225–1233. <https://doi.org/10.1021/bi0478852>.
101. Glaser, C.B., Morser, J., Clarke, J.H., Blasko, E., McLean, K., Kuhn, I., Chang, R.J., Lin, J.H., Vilander, L. and Andrews, W.H. (1992) Oxidation of a Specific Methionine in Thrombomodulin by Activated Neutrophil Products Blocks Cofactor Activity. A Potential Rapid Mechanism for Modulation of Coagulation. *Journal of Clinical Investigation*, **90**, 2565–2573. <https://doi.org/10.1172/JCI116151>.
102. Dayal, S., Gu, S.X., Hutchins, R.D., Wilson, K.M., Wang, Y., Fu, X. and Lentz, S.R. (2015) Deficiency of Superoxide Dismutase Impairs Protein C Activation and Enhances Susceptibility to Experimental Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **35**, 1798–1804. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.305963>.
103. Wood, M.J., Helena Prieto, J. and Komives, E.A. (2005) Structural and Functional Consequences of Methionine Oxidation in Thrombomodulin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*, **1703**, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.09.007>.
104. Gruber, A. and Griffin, J. (1992) Direct Detection of Activated Protein C in Blood from Human Subjects. *Blood*, **79**, 2340–2348. <https://doi.org/10.1182/blood.V79.9.2340.2340>.
105. Stojanovski, B.M., Pelc, L.A. and Di Cera, E. (2020) Role of the Activation Peptide in the Mechanism of Protein C Activation. *Scientific Reports*, **10**, 11079. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68078-z>.
106. Branson, Herman E., Marble, R., Katz, J. and Griffin, John H. (1983) INHERITED PROTEIN C DEFICIENCY AND COUMARIN-RESPONSIVE CHRONIC RELAPSING PURPURA FULMINANS IN A NEWBORN INFANT. *The Lancet*, **322**, 1165–1168. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(83\)91216-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(83)91216-3).

107. Griffin, J.H., Evatt, B., Zimmerman, T.S., Kleiss, A.J. and Wideman, C. (1981) Deficiency of Protein C in Congenital Thrombotic Disease. *Journal of Clinical Investigation*, **68**, 1370–1373.  
<https://doi.org/10.1172/JCI110385>.
108. Reitsma, P. (1996) Protein C Deficiency: Summary of the 1995 Database Update. *Nucleic Acids Research*, **24**, 157–159.  
<https://doi.org/10.1093/nar/24.1.157>.
109. Fay, P.J., Smudzin, T.M. and Walker, F.J. (1991) Activated Protein C-Catalyzed Inactivation of Human Factor VIII and Factor VIIIa. Identification of Cleavage Sites and Correlation of Proteolysis with Cofactor Activity. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 20139–20145.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54901-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54901-2).
110. Kalafatis, M., Rand, M.D. and Mann, K.G. (1994) The Mechanism of Inactivation of Human Factor V and Human Factor Va by Activated Protein C. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 31869–31880.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)31776-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)31776-9).
111. Walker, F.J. and Fay, P.J. (1992) Regulation of Blood Coagulation by the Protein C System. *The FASEB Journal*, **6**, 2561–2567.  
<https://doi.org/10.1096/fasebj.6.8.1317308>.
112. Lu, Y., Biswas, I., Villoutreix, B.O. and Rezaie, A.R. (2021) Role of Gly197 in the Structure and Function of Protein C. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, **1865**, 129892.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129892>.
113. Mather, T., Oganessyan, V., Hof, P., Huber, R., Foundling, S., Esmon, C. and Bode, W. (1996) The 2.8 Å Crystal Structure of Gla-Domainless Activated Protein C. *The EMBO journal*, **15**, 6822–6831.
114. Yang, L., Manithody, C. and Rezaie, A.R. (2006) Activation of Protein C by the Thrombin–Thrombomodulin Complex: Cooperative Roles of Arg-35 of Thrombin and Arg-67 of Protein C. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 879–884.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0507700103>.
115. Esmon, C.T. (2000) Regulation of Blood Coagulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1477**, 349–360.  
[https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00266-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00266-6).
116. Mohan Rao, L.V., Esmon, C.T. and Pendurthi, U.R. (2014) Endothelial Cell Protein C Receptor: A Multiliganded and Multifunctional Receptor. *Blood*, **124**, 1553–1562.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-578328>.
117. Pozzi, N., Barranco-Medina, S., Chen, Z. and Di Cera, E. (2012) Exposure of R169 Controls Protein C Activation and Autoactivation. *Blood*, **120**, 664–670.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-415323>.
118. Mosnier, L.O., Zlokovic, B.V. and Griffin, J.H. (2007) The Cytoprotective Protein C Pathway. *Blood*, **109**, 3161–3172.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-09-003004>.
119. Nalian, A. and Iakhiaev, A.V. (2008) Possible Mechanisms Contributing to Oxidative Inactivation of Activated Protein C: Molecular Dynamics Study. *Thrombosis and Haemostasis*, **100**, 18–25.  
<https://doi.org/10.1160/TH07-12-0750>.

120. Chapin, J.C. and Hajjar, K.A. (2015) Fibrinolysis and the Control of Blood Coagulation. *Blood Reviews*, **29**, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.09.003>.
121. Mihalko, E. and Brown, A.C. (2020) Clot Structure and Implications for Bleeding and Thrombosis. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **46**, 096–104. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1696944>.
122. Kanno, Y. (2019) The Role of Fibrinolytic Regulators in Vascular Dysfunction of Systemic Sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, 619. <https://doi.org/10.3390/ijms20030619>.
123. Miles, L.A., Ny, L., Wilczynska, M., Shen, Y., Ny, T. and Parmer, R.J. (2021) Plasminogen Receptors and Fibrinolysis. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, 1712. <https://doi.org/10.3390/ijms22041712>.
124. Gue, Y. and Gorog, D. (2017) Importance of Endogenous Fibrinolysis in Platelet Thrombus Formation. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**, 1850. <https://doi.org/10.3390/ijms18091850>.
125. Line, B.R. (2001) Pathophysiology and Diagnosis of Deep Venous Thrombosis. *Seminars in Nuclear Medicine*, **31**, 90–101. <https://doi.org/10.1053/snuc.2001.21406>.
126. Baker, S.K. and Strickland, S. (2020) A Critical Role for Plasminogen in Inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, **217**, e20191865. <https://doi.org/10.1084/jem.20191865>.
127. Litvinov, R.I., Nabiullina, R.M., Zubairova, L.D., Shakurova, M.A., Andrianova, I.A. and Weisel, J.W. (2019) Lytic Susceptibility, Structure, and Mechanical Properties of Fibrin in Systemic Lupus Erythematosus. *Frontiers in Immunology*, **10**, 1626. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01626>.
128. Kwaan, H.C. and McMahon, B. (2009) The Role of Plasminogen-Plasmin System in Cancer. In: Kwaan, H.C. and Green, D., Eds., *Coagulation in Cancer*, Springer US, Boston, MA, 43–66. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-79962-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-0-387-79962-9_4).
129. Andreasen, P.A., Egelund, R. and Petersen, H.H. (2000) The Plasminogen Activation System in Tumor Growth, Invasion, and Metastasis. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, **57**, 25–40. <https://doi.org/10.1007/s000180050497>.
130. Castellino, F. and Ploplis, V. (2005) Structure and Function of the Plasminogen/Plasmin System. *Thrombosis and Haemostasis*, **93**, 647–654. <https://doi.org/10.1160/TH04-12-0842>.
131. Xue, Y., Bodin, C. and Olsson, K. (2012) Crystal Structure of the Native Plasminogen Reveals an Activation-Resistant Compact Conformation: *Crystal Structure of Native Plasminogen*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **10**, 1385–1396. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04765.x>.
132. Bryk-Wiązania, A.H., Cysewski, D., Ocloń, E. and Undas, A. (2022) Mass-Spectrometric Identification of Oxidative Modifications in Plasma-Purified Plasminogen: Association with Hypofibrinolysis in Patients with Acute Pulmonary Embolism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **621**, 53–58.

- <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.06.063>.
133. Markus, G. (1996) Conformational Changes in Plasminogen, Their Effect on Activation, and the Agents That Modulate Activation Rates — a Review. *Fibrinolysis*, **10**, 75–85. [https://doi.org/10.1016/S0268-9499\(96\)80082-8](https://doi.org/10.1016/S0268-9499(96)80082-8).
134. Gugliucci, A. (2008) Hypochlorous Acid Is a Potent Inactivator of Human Plasminogen at Concentrations Secreted by Activated Granulocytes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **46**. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2008.272>.
135. Stief, T.W., Richter, A., Maisch, B. and Renz, H. (2009) Monitoring of Functional Plasminogen in the Blood of Patients on Fibrinolytics. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, **15**, 297–308. <https://doi.org/10.1177/1076029607303771>.
136. Law, R.H.P., Caradoc-Davies, T., Cowieson, N., Horvath, A.J., Quek, A.J., Encarnacao, J.A., Steer, D., Cowan, A., Zhang, Q., Lu, B.G.C., Pike, R.N., Smith, A.I., Coughlin, P.B. and Whisstock, J.C. (2012) The X-Ray Crystal Structure of Full-Length Human Plasminogen. *Cell Reports*, **1**, 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.02.012>.
137. Seillier, C., Hélie, P., Petit, G., Vivien, D., Clemente, D., Le Mauff, B., Docagne, F. and Toutirais, O. (2022) Roles of the Tissue-Type Plasminogen Activator in Immune Response. *Cellular Immunology*, **371**, 104451. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104451>.
138. Lupu, F., Heim, D.A., Bachmann, F., Hurni, M., Kakkar, V.V. and KPuithof, E.K.O. (1995) Plasminogen Activator Expression in Human Atherosclerotic Lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **15**, 1444–1455. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.15.9.1444>.
139. Ismail, A.A., Shaker, B.T. and Bajou, K. (2021) The Plasminogen-Activator Plasmin System in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 337. <https://doi.org/10.3390/ijms23010337>.
140. Gonias, S.L. (2021) Plasminogen Activator Receptor Assemblies in Cell Signaling, Innate Immunity, and Inflammation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **321**, C721–C734. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00269.2021>.
141. Hoylaerts, M., Rijken, D.C., Lijnen, H.R. and Collen, D. (1982) Kinetics of the Activation of Plasminogen by Human Tissue Plasminogen Activator. Role of Fibrin. *Journal of Biological Chemistry*, **257**, 2912–2919. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)81051-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)81051-7).
142. Rathore, Y.S., Rehan, M., Pandey, K., Sahni, G., and Ashish. (2012) First Structural Model of Full-Length Human Tissue-Plasminogen Activator: A SAXS Data-Based Modeling Study. *The Journal of Physical Chemistry B*, **116**, 496–502. <https://doi.org/10.1021/jp207243n>.
143. Kuiper, J., Van't Hof, A., Otter, M., Biessen, E.A.L., Rijken, D.C. and van BERKEL, T.J.C. (1996) Interaction of Mutants of Tissue-Type Plasminogen Activator with Liver Cells: Effect of Domain Deletions. *Biochemical Journal*, **313**, 775–780. <https://doi.org/10.1042/bj3130775>.
144. Kim, K.S., Hong, Y.-K., Lee, Y., Shin, J.-Y., Chang, S.-I., Chung,

- S.I. and Joe, Y.A. (2003) Differential Inhibition of Endothelial Cell Proliferation and Migration by Urokinase Subdomains: Amino-Terminal Fragment and KPingle Domain. *Experimental & Molecular Medicine*, **35**, 578–585.  
<https://doi.org/10.1038/emm.2003.76>.
145. Pennica, D., Holmes, W.E., Kohr, W.J., Harkins, R.N., Vehar, G.A., Ward, C.A., Bennett, W.F., Yelverton, E., Seeburg, P.H., Heyneker, H.L., Goeddel, D.V. and Collen, D. (1983) Cloning and Expression of Human Tissue-Type Plasminogen Activator cDNA in E. Coli. *Nature*, **301**, 214–221.  
<https://doi.org/10.1038/301214a0>.
146. Keck, R.G. (1996) The Use of T-Butyl Hydroperoxide as a Probe for Methionine Oxidation in Proteins. *Analytical Biochemistry*, **236**, 56–62.  
<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0131>.
147. Wu, S.-L., Jiang, H., Hancock, W.S. and Karger, B.L. (2010) Identification of the Unpaired Cysteine Status and Complete Mapping of the 17 Disulfides of Recombinant Tissue Plasminogen Activator Using LC-MS with Electron Transfer Dissociation/Collision Induced Dissociation. *Analytical Chemistry*, **82**, 5296–5303.  
<https://doi.org/10.1021/ac100766r>.
148. Oszejca, K., Bieniasz, M., Brown, G., Swiatkowska, M., Bartkowiak, J. and Szymraj, J. (2008) Effect of Oxidative Stress on the Expression of T-PA, u-PA, u-PAR, and PAI-1 in Endothelial Cells. *Biochemistry and Cell Biology*, **86**, 477–486.  
<https://doi.org/10.1139/O08-137>.
149. Feng, Y.-H. and Hart, G. (1995) In Vitro Oxidative Damage to Tissue-Type Plasminogen Activator: A Selective Modification of the Biological Functions. *Cardiovascular Research*, **30**, 255–261.  
[https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(95\)00034-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(95)00034-8).
150. Stief, T.W., Aab, A. and Heimburger, N. (1988) Oxidative Inactivation of Purified Human Alpha-2-Antiplasmin, Antithrombin III, and C1-Inhibitor. *Thrombosis Research*, **49**, 581–589.  
[https://doi.org/10.1016/0049-3848\(88\)90255-1](https://doi.org/10.1016/0049-3848(88)90255-1).
151. Nielsen, V.G., Crow, J.P., Zhou, F. and Parks, D.A. (2004) Peroxynitrite Inactivates Tissue Plasminogen Activator. *Anesthesia & Analgesia*, 1312–1317.  
<https://doi.org/10.1213/01.ANE.0000111105.38836.F6>.
152. Alvarez, B. and Radi, R. (2003) Peroxynitrite Reactivity with Amino Acids and Proteins. *Amino Acids*, **25**, 295–311.  
<https://doi.org/10.1007/s00726-003-0018-8>.
153. Chapman, H.A. (1997) Plasminogen Activators, Integrins, and the Coordinated Regulation of Cell Adhesion and Migration. *Current Opinion in Cell Biology*, **9**, 714–724.  
[https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(97\)80126-3](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80126-3).
154. Collen, D. (1999) The Plasminogen (Fibrinolytic) System. *Thrombosis and Haemostasis*, **82**, 259–270.  
<https://doi.org/10.1055/s-0037-1615841>.
155. Cale, J. and Lawrence, D. (2007) Structure-Function Relationships of Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Its Potential as a Therapeutic Agent. *Current Drug Targets*, **8**, 971–981.  
<https://doi.org/10.2174/138945007781662337>.
156. Sillen, M. and Declerck, P.J. (2020) Targeting PAI-1 in Cardiovascular Disease: Structural Insights Into PAI-1 Functionality and Inhibition.

- Frontiers in Cardiovascular Medicine*, **7**, 622473.  
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.622473>.
157. Yamamoto. (1998) A Pathological Role of Increased Expression of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Human or Animal Disorders. *International Journal of Hematology*, **68**, 371.  
[https://doi.org/10.1016/S0925-5710\(98\)00094-2](https://doi.org/10.1016/S0925-5710(98)00094-2).
158. Cheng, J.J., Chao, Y.J., Wung, B.S. and Wang, D.L. (1996) Cyclic Strain-Induced Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Release from Endothelial Cells Involves Reactive Oxygen Species. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **225**, 100–105.  
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1136>.
159. Swiatkowska, M., Szemraj, J., Al-Nedawi, K.N.I. and Pawłowska, Z. (2002) Reactive Oxygen Species Upregulate Expression of PAI-1 in Endothelial Cells. *Cellular & Molecular Biology Letters*, **7**, 1065–1071.
160. Banfi, C., Camera, M., Giandomenico, G., Toschi, V., Arpaia, M., Mussoni, L., Tremoli, E. and Colli, S. (2003) Vascular Thrombogenicity Induced by Progressive LDL Oxidation: Protection by Antioxidants. *Thrombosis and Haemostasis*, **89**, 544–553.  
<https://doi.org/10.1055/s-0037-1613386>.
161. Shatos, M.A., Doherty, J.M., Orfeo, T., Hoak, J.C., Collen, D. and Stump, D.C. (1992) Modulation of the Fibrinolytic Response of Cultured Human Vascular Endothelium by Extracellularly Generated Oxygen Radicals. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 597–601.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)48536-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)48536-5).
162. Dimova, E.Y., Samoylenko, A. and Kietzmann, T. (2004) Oxidative Stress and Hypoxia: Implications for Plasminogen Activator Inhibitor-1 Expression. *Antioxidants & Redox Signaling*, **6**, 777–791.  
<https://doi.org/10.1089/1523086041361596>.
163. Lee, C. and Huang, T.-S. (2005) Plasminogen Activator Inhibitor-1: The Expression, Biological Functions, and Effects on Tumorigenesis and Tumor Cell Adhesion and Migration. *Journal of Cancer Molecules*, **1**, 25–36.
164. Huber, R. and Carrell, R.W. (1989) Implications of the Three-Dimensional Structure of Alpha.1-Antitrypsin for Structure and Function of Serpins. *Biochemistry*, **28**, 8951–8966.  
<https://doi.org/10.1021/bi00449a001>.
165. Laskowski, M. and Kato, I. (1980) Protein Inhibitors of Proteinases. *Annual Review of Biochemistry*, **49**, 593–626.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.49.070180.003113>.
166. Lawrence, D.A. and Loskutoff, D.J. (1986) Inactivation of Plasminogen Activator Inhibitor by Oxidants. *Biochemistry*, **25**, 6351–6355.  
<https://doi.org/10.1021/bi00369a001>.
167. Epstein, F.H. and Weiss, S.J. (1989) Tissue Destruction by Neutrophils. *New England Journal of Medicine*, **320**, 365–376.  
<https://doi.org/10.1056/NEJM198902093200606>.
168. Strandberg, L., Lawrence, D.A., Johansson, L.B. and Ny, T. (1991) The Oxidative Inactivation of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 Results from a Conformational Change in the Molecule and Does Not Require the Involvement of the

- P1' Methionine. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 13852–13858. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)92780-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)92780-8).
169. Madison, E.L., Goldsmith, E.J., Gething, M.J., Sambrook, J.F. and Gerard, R.D. (1990) Restoration of Serine Protease-Inhibitor Interaction by Protein Engineering. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 21423–21426. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)45753-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)45753-5).