

## ВЛИЯНИЕ ИНДУЦИРОВАННОГО ГИПОХЛОРИТОМ И ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА ОКИСЛЕНИЯ ФИБРИНОГЕНА НА ЕГО ТЕРМИЧЕСКУЮ ДЕНАТУРАЦИЮ

© 2021 г. Л. А. Вассерман<sup>1\*</sup>, Л. В. Юрина<sup>1</sup>, А. Д. Васильева<sup>1</sup>, М. А. Розенфельд<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

\*E-mail: lwasserma@mail.ru; mourimotonari91@gmail.com

Поступила в редакцию 18.12.2020;

после доработки 05.02.2021;

принята в печать 20.05.2021

Фибриноген является высокомолекулярным растворимым белком плазмы крови, ответственным за образование фибрина. Будучи высокоуязвимой мишенью для окислителей, фибриноген подвергается посттрансляционным модификациям, вызывающим нарушение структуры и функции белка. Впервые с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии исследована термическая денатурация фибриногена при его индуцированном окислении гипохлоритом и перекисью водорода. Показано, что области D и E фибриногена подвергались структурным изменениям в молекуле окисленного белка, а также что эти области подвергались структурным изменениям. Определены термодинамические параметры денатурации – температура и калориметрическая энтальпия. Обсуждаются последствия влияния окислительной модификации фибриногена на его термостабильность и нарушение структуры областей D и E белка.

*Ключевые слова:* фибриноген, окисление, дифференциальная сканирующая калориметрия, термическая денатурация, структурные повреждения.

DOI: 10.31857/S0207401X21110108

### ВВЕДЕНИЕ

Фибриноген (ФГ) – высокомолекулярный (ММ = 340 кДа) растворимый белок плазмы крови, который главным образом отвечает за образование нерастворимого фибринового геля в присутствии тромбина. Молекула фибриногена может быть аппроксимирована палочкообразной частицей длиной 45 нм со степенью асимметрии, близкой к двум [1]. Будучи гомодимером, молекула ФГ содержит два набора трех неидентичных полипептидных цепей:  $A\alpha$ ,  $B\beta$  и  $\gamma$ , которые соединены вместе 29-ю дисульфидными связями. В свою очередь, полипептидные цепи составлены из 610, 461 и 411 аминокислотных остатков соответственно [2]. Молекула фибриногена разделена на несколько структурно и функционально важных областей: центральную область E, образованную  $\text{NH}_2$ -концевыми участками всех трех пар полипептидных цепей; две периферические области D, состоящие из  $\text{COOH}$ -концевых участков полипептидных цепей  $B\beta$  и  $\gamma$ , которые образуют так называемые  $\beta$ - и  $\gamma$ -узлы, соответственно; две области  $B\beta\text{N}$ , которые состоят из  $\text{NH}_2$ -концевых участков цепей  $B\beta$  и две области  $\alpha\text{C}$ , включающие значительную часть  $\text{COOH}$ -концевых участков цепей  $A\alpha$  (аминокислотные остатки 221–610) [1, 3].

Примечательно то, что для обеспечения палочкообразной формы молекулы ФГ, необходимой для формирования длинных фибриновых фибрилл, области E и D значительно удалены друг от друга и удерживаются вместе суперспиральными (coiled-coil) тяжами. Кроме того, каждая из двух областей  $\alpha\text{C}$  образована  $\alpha\text{C}$ -доменами, контактирующими как друг с другом, так и с центральной областью E и ковалентно связанными с основной частью молекулы ФГ гибкими  $\alpha\text{C}$ -конекторами [4, 5].

Фибриноген среди других плазменных белков занимает особое место, по крайней мере благодаря трем отличительным свойствам. Во-первых, будучи ключевым белком свертывания крови, ФГ одновременно является маркером острой фазы заболеваний [6–8]. Во-вторых, структура фибриногена составлена как из типичных глобулярных доменов, так и включает в себя суперспиральные структуры, свойственные фибриллярным белкам [1]. И, наконец, молекула фибриногена проявляет максимальную уязвимость к окислению по сравнению с другими белками плазмы крови [9]. Последнее свойство имеет особое значение, поскольку окисление фибриногена в условиях *in vivo* при развитии в организме окислительного стресса

вызывает повреждение структуры и функции белка, способствующее развитию широкого спектра заболеваний [10]. Всем этим обусловлены крайне интенсивные и многопрофильные исследования структуры ФГ и механизма ее повреждения.

Известно, что окисление белков сопровождается модификацией аминокислотных остатков, локализованных как на поверхности, так и внутри белковой глобулы. В последнем случае такие модифицированные остатки имеют тенденцию к миграции на поверхность белка. Это вызывает частичное нарушение структуры глобулы белка и увеличение его гидрофобности. Так как окисление аминокислотных остатков (за исключением цистеина) в белках плазмы является необратимым процессом, можно говорить о необратимом процессе денатурации микроструктуры белка. Так как ФГ не содержит ни одной свободной цистеиновой группы, окисление этого белка представляет собой полностью необратимый процесс.

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) белка обеспечивает достаточно полную термодинамическую характеристику процесса его тепловой денатурации. Однако понимание энергетических эффектов, связанных с нарушениями структуры белка при его окислении, требует знания окислительных сайтов в каждом из отдельных структурных областей. В последние годы дифференциальная сканирующая калориметрия стала новым инструментом для характеристики термодинамических свойств основных белков сыворотки/плазмы и установления калориметрических маркеров при различных заболеваниях [11].

С использованием метода ДСК был выявлен феномен снижения устойчивости многих белков, в том числе альбумина и миоглобина, к термической денатурации в условиях *in vitro* при индуцированном окислении [12–14] или *in vivo* при различных заболеваниях, связанных с окислительным стрессом [15, 16].

Ранее при изучении влияния окислительной модификации озонированного фибриногена на его термостабильность было показано снижение энтальпии денатурации для всех структурных областей окисленного фибриногена, являющееся следствием модификации его молекулярной структуры в ходе окисления [17]. В данной работе методом ДСК оцениваются последствия воздействия окисления ФГ, индуцированного пероксидом водорода и гипохлоритом, на устойчивость структуры его отдельных областей к тепловой денатурации. В совокупности с полученными результатами масс-спектрометрии по идентификации окислительных сайтов в белке при его обработке вышеупомянутыми окислителями [18, 19] это позволит глубже понять механизм повреждения структуры и функции модифицированного белка.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

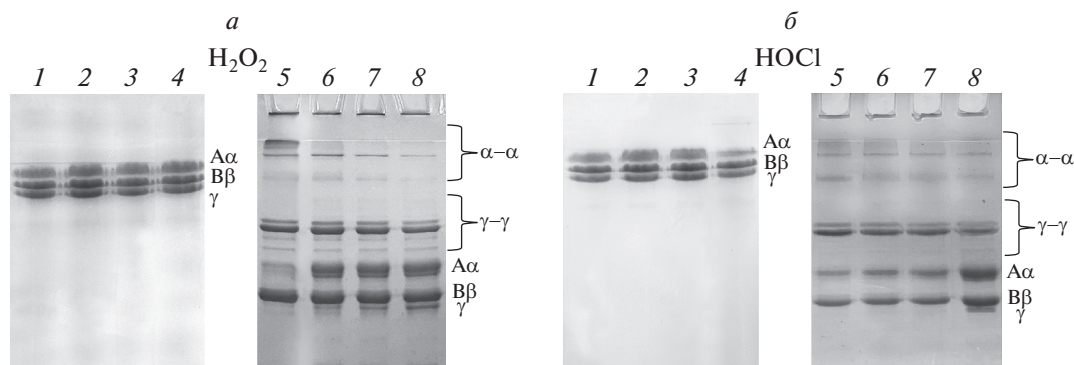
Фибриноген был выделен из цитратной плазмы крови доноров методом глицинового осаждения [20] и растворен в 50 мМ фосфатном буфере (0.15 M NaCl, pH = 7.4). Окисление ФГ индуцировали путем добавления раствора перекиси водорода производства компании Sigma-Aldrich (USA) или гипохлорита натрия (Sigma-Aldrich, USA) [21, 22] в концентрации 50, 150, 300 мкМ. После окисления ФГ проводили электрофорез восстановленных образцов белка, а также его ковалентно сшитых полипептидных цепей под действием активированного коагуляционного фактора XIII (FXIIIa) [21]. Для окрашивания белковых гелей использовали краситель кумасси бриллиантовый синий R-250 производства компании Thermo Fisher Scientific (USA).

Термодинамические параметры денатурации фибриногена (6.5 мг/мл) в отсутствие и в присутствии окислителей в разных концентрациях определяли с помощью высокочувствительной ДСК на микрокалориметре ДАСМ-4 (Пушино, Россия). Объем образца составлял 0.5 мл в закрытой ячейке. Измерения проводили в области температур 10–110°C при постоянном давлении 2.5 МПа и скорости нагревания 1°C/мин. Шкалу избыточной теплоемкости для каждого эксперимента калибровали с помощью эффекта Джоуля–Ленца. В качестве раствора сравнения при измерении использовали 50 мМ фосфатный буфер (см. выше).

Средние значения термодинамических параметров денатурации определяли из не менее чем трех параллельных измерений. Значение температуры денатурации соответствовало максимуму пика теплоемкости на термограмме. Значение экспериментальной энтальпии денатурации соответствовало площади под пиком кривой избыточной теплоемкости как функции температуры. Расчет молярной энтальпии денатурации ( $\Delta_d H$ ) проводили на 1 моль фибриногена (340 кДа).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены результаты проведения электрофореза полипептидных цепей нативного и окисленного ФГ (либо перекисью водорода, либо гипохлоритом), которые свидетельствуют о том, что независимо от выбранной концентрации окислителя не наблюдалось ни фрагментации белка, ни образования ковалентных сшивок его цепей. В присутствии FXIIIa полипептидные цепи фибрина участвуют в ковалентном сшивании, что проявляется в образовании  $\gamma$ - $\gamma$ -димеров и  $\alpha$ - $\alpha$ -полимеров [23, 24]. С повышением концентрации окислителя количество образующихся  $\alpha$ - $\alpha$ -полимеров и  $\gamma$ - $\gamma$ -димеров снижается, о чем свидетельствует также увеличение содержания исходных  $\alpha\alpha$ - и  $\gamma\gamma$ -цепей (рис. 1). Очевидно, что это есть



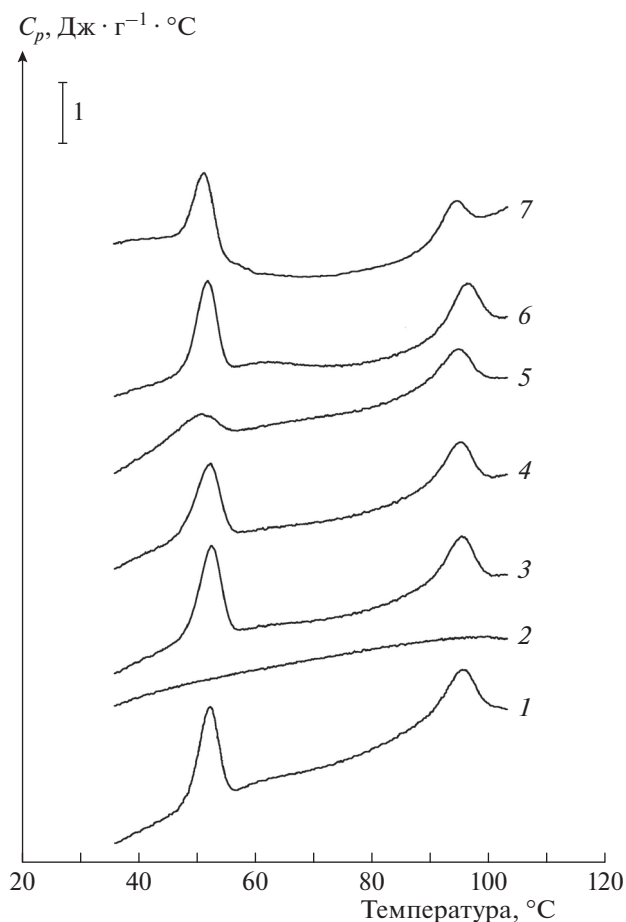
**Рис. 1.** Электрофорез различных образцов ФГ: *a* – электрофорез полипептидных цепей ФГ в полиакриламидном геле (5% – концентрирующий гель, 12% – разделяющий гель) в присутствии додецилсульфата натрия; 1 – неокисленный ФГ; 2 – окисленный 50 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  или  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$ ; 3 – окисленный 150 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  или  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$ ; 4 – окисленный 300 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  или  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$ . *b* – Электрофорез продуктов реакции сшивания ФГ фактором XIIIa в полиакриламидном геле (4% – концентрирующий гель, 8% – разделяющий гель) в присутствии додецилсульфата натрия; 5 – продукты реакции FXIIIa с неокисленным ФГ; 6 – ФГ, окисленный 50 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  или  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$ ; 7 – 150 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  или  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$ ; 8 – 300 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  или  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$ .

следствие окислительной модификации структуры молекулы ФГ.

На рис. 2 приведены термограммы денатурации фибриногена в отсутствие и в присутствии гипохлорита натрия и перекиси водорода при различных концентрациях окислителей. Значения термодинамических параметров денатурации фибриногена как в отсутствие, так и в присутствии окислителей ( $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) приведены в табл. 1.

Из приведенных на рис. 2 ДСК-термограмм видно, что на кривых плавления фибриногена присутствуют два пика: низкотемпературный в области 51–52°C и высокотемпературный в области 95°C. Наличие двух пиков на ДСК-термограмме коррелирует с литературными данными [25]. Низкотемпературный пик связывают с разворачиванием периферических областей D молекулы фибриногена, а высокотемпературный – с разворачиванием центральной области E молекулы фибриногена. Процесс денатурации белка в исследуемых условиях является необратимым для обоих переходов, что отражается на ДСК-термограмме повторного сканирования раствора фибриногена (рис. 2, кривая 2), где полностью отсутствуют какие-либо переходы. Следует отметить, что в 50 мМ глициновом буфере при pH = 8.5 наблюдали обратимый высокотемпературный переход фибриногена [26].

При окислении фибриногена гипохлоритом натрия в концентрации 50 мкМ значения температуры и энтальпии низкотемпературного перехода (т.е. для области D молекул фибриногена) близки к соответствующим значениям для неокисленного фибриногена. С увеличением концентрации окислителя до 300 мкМ происходит уширение низкотемпературного пика, что сопро-



**Рис. 2.** Термограммы денатурации фибриногена (6.5 мг/мл, 50 мМ фосфатный буфер, 0.15 М NaCl, pH = 7.4) в отсутствие (1) и в присутствии окислителей гипохлорита (кривые 3–5) и перекиси водорода (6, 7) при их различных концентрациях: 50 мкМ (3, 6), 150 мкМ (4, 7), 300 мкМ (5); 2 – термограмма повторного сканирования раствора фибриногена (1).

Таблица 1. Термодинамические параметры денатурации (температура  $T_d$  и энтальпия  $\Delta_d H$ ) фибриногена (6.5 мг/мл, 50 мМ фосфатный буфер, 0.15 М NaCl, pH = 7.4) в отсутствие и в присутствии окислителей в различных концентрациях (гипохлорит и перекись водорода)

Образец	Концентрация окислителя, мкМ	Низкотемпературный переход		Высокотемпературный переход	
		$T_{d1}$ , °C	$\Delta_d H_1$ , кДж/моль	$T_{d2}$ , °C	$\Delta_d H_2$ , кДж/моль
Фибриноген	0	52.2 ± 0.1	1580 ± 70	95.3 ± 0	930 ± 55
Фибриноген + HOCl/OCl <sup>-</sup>	50	52.3 ± 0.1	1610 ± 60	95.3 ± 0	950 ± 10
	150	52.0 ± 0	1410 ± 40	95.0 ± 0.1	870 ± 90
	300	51.1 ± 0.2	760 ± 30	94.6 ± 0.1	840 ± 40
Фибриноген + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	51.5 ± 0.2	1530 ± 30	96.2 ± 0	890 ± 10
	150	51.6 ± 0.1	1536 ± 120	95.6 ± 0.1	730 ± 30

вождается уменьшением температуры и энтальпии перехода. Значения этих параметров в случае высокотемпературного пика (т.е. для области E молекул фибриногена) уменьшаются с увеличением концентрации окислителя. Очевидно, что окислительная модификация фибриногена гипохлоритом натрия сопровождается нарушениями нативной структуры белка, поскольку его окисленные формы легче подвергаются денатурации.

При окислении фибриногена перекисью водорода в концентрациях 50 и 150 мкМ значения температуры и энтальпии денатурации для низкотемпературного перехода уменьшаются по сравнению с соответствующими значениями для неокисленного фибриногена. При этом значения термодинамических параметров денатурации для низкотемпературного пика окисленного перекисью водорода фибриногена достаточно близки. Значение энтальпии денатурации для высокотемпературного пика окисленного перекисью водорода фибриногена с увеличением концентрации окислителя уменьшается. Следует отметить, что перекись водорода в концентрации 150 мкМ оказывала более существенное воздействие на структуру центральной области E молекулы фибриногена, чем гипохлорит в тех же концентрациях, что отражается в значении энтальпии высокотемпературного перехода. Таким образом, окислительная модификация, вызванная исследуемыми окислителями при данных концентрациях, приводит к повреждению нативной структуры фибриногена.

Ранее в работе, касающейся плавления озонированного фибриногена [4], в неокисленном белке кроме двух основных пиков были обнаружены минорные пики с температурами плавления 62.5, и 73.0 °C, соответствующими разворачиванию структуры C- и N-концевых субдоменов  $\alpha$ C-домена [4, 17, 27]. Эти пики отсутствуют на термограммах (рис. 2), что объясняется в работе [4] и в данном исследовании различным буферным составом.

Известно, что  $\alpha$ C-область фибриногена человека (аминокислотные остатки 221–610) состоит из гибкого NH<sub>2</sub>-концевого коннектора (221–391) и компактного COOH-концевого  $\alpha$ C-домена (392–610), который может содержать только некоторую часть регулярной структуры [28]. Кооперативная структура в изолированном  $\alpha$ C-доме по своей природе неустойчива и крайне чувствительна к концентрации и составу буфера, а также имеет низкую термическую стабильность и может разворачиваться уже при комнатной температуре [29]. К этому следует добавить, что согласно альтернативной точке зрения  $\alpha$ C-домены представляют собой “свободно плавающие участки”, лишенные какой-либо упорядоченной структуры [30], что подтверждено рентгеноструктурным исследованием интактного куриного фибриногена, в котором  $\alpha$ C-домены не обнаружены на картах электронной плотности [31]. И хотя полагают, что  $\alpha$ C-домены фибриногена человека формируют относительно компактные структуры [1], их упорядоченная структура по-прежнему неидентифицирована. Таким образом, вопрос о том, содержат ли эти области компактную упорядоченную структуру, остается дискуссионным [32].

Проведенные исследования убедительно показали, что окислительная модификация ФГ вызывает перестройки в структуре областей D и E белка, индикатором которых по данным ДСК является снижение ее термостабильности. Ранее было показано [18, 19], что, ФГ, будучи высокоуязвимой мишенью для гипохлорит- и пероксид-индуцированного окисления, подвергается значительной модификации, затрагивающей множественные аминокислотные остатки, которые принадлежат всем трем полипептидным цепям белка и локализованы во всех структурных областях фибриногена, в том числе в областях D и E. Данные электрофореза указывают на сохранение целостности полипептидных цепей окисленного ФГ, однако уменьшение содержания  $\alpha$ - $\alpha$ -полимеров и  $\gamma$ - $\gamma$ -димеров (рис. 1) сви-

детельствует о нарушении реакционной способности сайтов, участвующих в ковалентном сшивании цепей.

Как показано нами ранее [17], окисление увеличивает гидрофобность фибриногена. Известно, что индуцированное активной формой кислорода окисление остатков метионинов в белках ведет к увеличению их поверхностной гидрофобности [33]. Данные масс-спектрометрии свидетельствуют [18, 19], что наиболее часто встречающейся модификацией в фибриногене при его обработке  $\text{HOCl}/\text{OCl}$  или  $\text{H}_2\text{O}_2$  является превращение метионина в сульфоксид метионина (MetSO). Так как образование MetSO коррелирует с увеличением гидрофобности белка [34], сопровождающейся частичной денатурацией белковой глобулы и ее дегидратацией [35], очевидно, что эти эффекты обуславливают снижение термоустойчивости ФГ, наблюдаемое в калориметрических экспериментах.

Наши данные указывают на существенное влияние окисления на термодинамические характеристики разворачивания области E фибриногена, несмотря на то, что для обоих окислителей эта область была наименее подвержена посттрансляционным модификациям [18, 19]. В рамках данной работы достаточно сложно объяснить однозначно природу этого феномена. Можно предположить, что это связано с особенностями структуры области E, которая представляет собой сложный мультидоменный комплекс [3]. Пока неясно, как окисление может влиять на структуру и стабильность отдельных доменов области E. Кроме того, возможно, что за счет высокой конформационной лабильности как самой молекулы фибриногена, так и ее отдельных структур это влияние может быть опосредованным, т.е. вызвано окислением и, как следствие, повреждениями структур белка, не принадлежащих области E. Так, например, это может быть вызвано повреждением суперспиральных структур (длиной около 17 нм), сформированных остатками всех трех,  $\text{A}\alpha$ ,  $\text{B}\beta$  и  $\gamma$ , цепей, которые, с одной стороны, по данным масс-спектрометрии [18, 19] активно вовлекаются в окислительную модификацию, а с другой – могут влиять на структуру последних, удерживая вместе области D и E. Разумеется, что это предположение требует специального исследования.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение хотелось бы отметить следующее: ДСК является термодинамическим методом для прямых измерений тепловых эффектов, связанных с внутри- и межмолекулярными процессами с использованием разбавленных растворов полимеров [36]. В соответствии с вириальным уравнением для осмотического давления раствора полимера критерием идеальности раствора является

малая величина произведения  $A_2c$  по сравнению с молекулярной массой полимера, т.е.  $A_2c \ll 1/M$  [35], где  $c$  и  $M$  – концентрация и молекулярная масса полимера,  $A_2$  – второй вириальный коэффициент. Последний в случае фибриногена равен  $\nu N_A/2M^2$  [37], где  $\nu$  – исключенный объем молекулы,  $N_A$  – число Авогадро. В свою очередь, величина  $\nu$  может быть рассчитана как  $\nu = 0.5\pi L D^2$ , где  $L$  и  $D$  – длина и диаметр палочкообразной молекулы. Если учесть значения длины и диаметра молекулы фибриногена, равные соответственно 45 и 2 нм [2], можно получить значение  $A_2c$ , которое составляет не более нескольких процентов от величины  $1/M$ . Это свидетельствует о том, что раствор ФГ является разбавленным. Следует также учесть, что оценка величины  $A_2$  была проведена для негидратированной частицы, в то время как молекула фибриногена, подобно другим растворимым белкам, покрыта гидратной оболочкой. Однако значения гидродинамических констант фибриногена (коэффициенты седиментации, поступательной диффузии, характеристическая вязкость [38]) свидетельствуют о том, что при крайне высокой степени асимметрии молекулы степень гидратации должна быть крайне низкой, чтобы вносить существенные поправки в проведенную оценку величины  $A_2$ .

В работе использовали оборудование ЦКП ИБХФ РАН.

Исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования по госзаданию (темы 0084-2014-0001 и 0084-2014-0005) и при финансовой поддержке грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 18-04-01313.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weisel J.W., Litvinov R.I. // Subcell. Biochem. 2017. V. 82. P. 405.
2. Blombäck B. // Thromb. Res. 1996. V. 83. P. 1.
3. Medved L., Weisel J.W. // J. Thromb. Haemost. 2009. V. 7. P. 355.
4. Litvinov R.I., Yakovlev S., Tsurupa G. et al. // Biochemistry 2007. V. 46. P. 9133.
5. Medved L.V., Gorkun O.V., Privalov P.L. // FEBS (Fed. Europ. Biochem. Soc.) Lett. 1983. V. 160. P. 291.
6. Cray C. // Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 2012. V. 105. P. 113.
7. Zuliani-Alvarez L., Midwood K.S. // Adv. Wound Care (New Rochelle). 2015. V. 4. № 5. P. 273.
8. Petersen M.A., Ryu J.K., Akassoglou K. // Nat. Rev. Neurosci. 2018 V. 19. № 5. P. 283.
9. Shacter E., Williams J.A., Lim M. et al. // Free Radic. Biol. Med. 1994. V. 17. P. 429.
10. Martinez M., Weisel J.W., Ischiropoulos H. // Ibid. 2013. V. 65. P. 411.
11. Todinova S., Krumova S., Danailova A. et al. // Eur. Biophys. J. 2018 V. 47. № 5. P. 549.

12. *Anraku M., Yamasaki K., Maruyama T. et al.* // *Pharm. Res.* 2001. V. 18. P. 632.
13. *Gorobets M.G., Wasserman L.A., Bychkova A.V. et al.* // *Chem. Phys.* 2019. V. 523. P. 34.
14. *Thiansilakul Y., Benjakul S., Benjakul M.P.* // *Food Chem.* 2011. V. 124. P. 254.
15. *Moezzi M., Zapf I., Fekecs T. et al.* // *J. Therm. Anal. Calorim.* 2016. V. 123. № 3. P. 2037.
16. *Zapf I., Moezzi M., Fekecs T. et al.* // *Therm. Anal. Calorim.* 2016. V. 123. № 3. P. 2029.
17. *Горобец М.Г., Вассерман Л.А., Бычкова А.В. и др.* // *ДАН.* 2018. Т. 480. № 4. С. 491.
18. *Юрина Л.В., Васильева А.Д., Кононенко В.Л. и др.* // *Там же.* 2020. Т. 492. № 1. С. 287.
19. *Юрина Л.В., Васильева А.Д., Кононенко В.Л. и др.* // *Там же.* 2019. Т. 484. № 3. С. 367.
20. *White N.J., Wang Y., Fu X. et al.* // *Free Radic. Biol. Med.* 2016. V. 96. P. 181.
21. *Васильева А.Д., Юрина Л.В., Леонова В.Б. и др.* // *Хим. физика.* 2020. Т. 39. № 6. С. 24.
22. *Щеголихин А.Н., Васильева А.Д., Юрина Л.В. и др.* // *Хим. физика.* 2021. Т. 40. № 2. С. 1.
23. *Chen R., Doolittle R.F.* // *Biochem.* 1971. V. 10. P. 4487.
24. *Sobel J.H., Gawinowicz M.A.* // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 19288.
25. *Privalov P.L., Medved L.V.* // *J. Mol. Biol.* 1982. V. 159. P. 665.
26. *Chen Y., Mao H., Zhang X. et al.* // *Inter. J. Biol. Macromol.* 1999. V. 26. P. 129.
27. *Weisel J.W., Medved L.* // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001. V. 936. P. 312.
28. *Burton R.A., Tsurupa G., Medved L. et al.* // *Biochem.* 2006. V. 45. № 7. P. 2257.
29. *Tsurupa G., Tsonev L., Medved L.* // *Ibid.* 2002. V. 41. P. 6449.
30. *Doolittle R.F.* // *Annu. Rev. Biochem.* 1984. V. 53. P. 195.
31. *Yang Z., Kollman J.M., Pandi L. et al.* // *Biochem.* 2001. V. 40. P. 12515.
32. *Doolittle R.F.* // *Blood Rev.* 2003. V. 17. P. 33.
33. *Zull J.E., Smith S.K., Wiltshire R.* // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. V. 5671.
34. *Chao C.C., Ma Y.S., Stadtman E.R.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 2969.
35. *Wang L., Li L., Wang H. et al.* // *Biochem. J.* 2016. V. 473. № 23. P. 4373.
36. *Privalov P.L., Dragan A.I.* // *Biophys. Chem.* 2007. V. 126. P. 16.
37. *Тэнфорд Ч.* *Физическая химия полимеров.* М.: Химия, 1965. С. 239.
38. *Розенфельд М.А., Гершкович К.Б., Кузнецов Д.В. и др.* // *Молекуляр. биология.* 1986. Т. 20. № 4. С. 1098.