

УДК 577.24

## ИЗМЕНЕНИЯ ПРОЦЕССА ОБРАЗОВАНИЯ ФИБРИНОГЕНА И ФИБРИНА У БОЛЬНЫХ С КОНЕЧНОЙ СТАДИЕЙ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК, НАХОДЯЩИХСЯ НА ПЕРИТОНАЛЬНОМ ДИАЛИЗЕ

© 2020 М. Баралич<sup>1</sup>, Д. Робаджак<sup>2</sup>, А. Пенезич<sup>2</sup>, Г. Мильюш<sup>2</sup>, М. Шундериц<sup>2</sup>, Н. Глигорьевич<sup>2\*</sup>, О. Недич<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Clinical Centre of Serbia, Department of Nephrology, 11000 Belgrade, Serbia*

<sup>2</sup> *Institute for the Application of Nuclear Energy (INEP), Department of Metabolism, University of Belgrade, 11080 Belgrade, Serbia; E-mail: nikolag@inep.co.rs*

Поступила в редакцию 30.04.2020

После доработки 14.06.2020

Принята к публикации 19.06.2020

Конечная стадия хронической болезни почек (ESRD) является патологическим состоянием, которое сопровождается воспалительными процессами, повышенным окислительным стрессом и ассоциируется с риском возникновения сердечно-сосудистых осложнений и коагулопатий. В настоящей работе проведен анализ структуры фибриногена, выделенного из образцов крови больных с ESRD, находящихся на перитонеальном диализе, и охарактеризован образующийся из него фибрин. Показано, что фибриноген, полученный от больных, отличается от фибриногена у здоровых людей высокой степенью карбонилирования. Наиболее подверженной окислению оказалась  $\text{A}\alpha$ -цепь, затем следовала  $\text{B}\beta$ -цепь. В то же время  $\gamma$ -цепь оказалась наиболее устойчивой к окислению. На основании результатов спектрофлуориметрического анализа предположено, что у больных происходит дополнительная модификация боковых цепей аминокислотных остатков фибриногена. При этом пространственная структура фибриногена изменяется в большей степени по сравнению со вторичной структурой. При сравнении тестируемых групп не выявлено значительных различий в продолжительности и скорости (кинетика) коагуляции фибриногена. Фибрин, образующийся из выделенного фибриногена, имел сходную структуру в обеих группах. Полученные результаты подтверждают, что у пациентов с ESRD, находящихся на перитонеальном диализе, происходит окисление молекулы фибриногена и изменения её структуры. В то же время эти структурные изменения не влияли непосредственно на процесс образования фибрина. Принимая во внимание тот факт, что некоторые больные страдают от кровотечения, в то время как у других наблюдаются тромбоцитические осложнения, необходимы дальнейшие исследования в этой области, чтобы выявить другие компоненты и процессы, которые вносят вклад в исход заболевания.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** фибриноген, окисление, структура белка, свертывание крови.

**DOI:** 10.31857/S0320972520080102

### ВВЕДЕНИЕ

Конечная стадия хронической болезни почек (ESRD) – это состояние, сопровождающееся повышенным воспалением и окислительным стрессом [1]. Как следствие, значительно возрастает риск развития сердечно-сосудистых

осложнений, что является основной причиной смертности у пациентов с ESRD [2]. Многие факторы свертывания крови, которые способствуют атеросклерозу, при ESRD повышены, в том числе фибриноген, факторы свертывания крови VII, VIII и XIII [3]. В то время как некоторые пациенты страдают от кровотечений, у других развиваются тромботические осложнения. Механизмы, приводящие к тому или иному результату, все еще не до конца понятны [4], и поэтому необходимы дальнейшие исследования в этой области.

Пациенты, которые подвергаются гемодиализу или перитонеальному диализу, испытывают усиленный окислительный стресс, уровень которого зависит от состава растворов, используемых для диализа. При этом было обнаружено

Принятые сокращения: ESRD – конечная стадия хронической болезни почек (end-stage renal disease); ROS – активные формы кислорода (reactive oxygen species); PD – peritoneal dialysis; BCA – бицинхониновая кислота (bichinchonic acid); DNP – 2,4-динитрофенилгидразин (2,4-dinitrophenyl hydrazine); CD – круговой дихроизм (circular dichroism); SEM – сканирующая электронная микроскопия (scanning electron microscopy); PCO – карбонильные группы белков (protein carbonyl groups).

\* Адресат для корреспонденции.

как увеличение продукции активных форм кислорода (АФК), так и снижение антиоксидантной способности [5]. Кроме того, сообщалось, что пациенты, проходящие процедуру перитонеального диализа, имеют более протромботический профиль по сравнению с пациентами, находящимися на гемодиализе [6].

Фибриноген (фактор свертывания крови I) представляет собой большой гликопротеин плазмы крови с мол. массой 340 кД. В основном он экспрессируется при первичном и вторичном гемостазе [7] и состоит из двух А $\alpha$ -, двух В $\beta$ - и двух  $\gamma$ -цепей. В целом, его структуру можно представить в виде (А $\alpha$ -В $\beta$ - $\gamma$ )<sub>2</sub>. Коагуляционные свойства этого белка могут изменяться вследствие изменения его концентрации, структурной или химической модификации, включая окисление белка или изменение картины его гликозирования [8, 9]. Повышенная концентрация и окисление фибриногена были обнаружены у пациентов с хроническим заболеванием почек [10], и это влияло как на образование, так и на свойства фибрина.

Несмотря на то, что ранее было показано, что фибриноген подвержен окислению [11], имеющиеся данные о последствиях этого изменения для функционирования фибриногена противоречат друг другу. Согласно некоторым авторам [12], окисленный модифицированный фибриноген приобретает тромбогенные свойства. Однако другие исследователи считают, что при определенных условиях, когда наблюдается повышенный окислительный стресс, фибриноген становится более способным лизировать тромбы и, следовательно, вызывать повышенный риск кровотечения [13]. В исследованиях, проведенных до настоящего времени по формированию и свойствам сгустка крови у пациентов с ESRD с использованием образцов цельной крови или плазмы [14, 15], была подтверждена тромбогенная природа сгустка. Чтобы исключить влияние различных компонентов крови и терапевтических препаратов на полученные результаты, целью данного исследования было анализ специфических изменений структуры фибриногена, выделенного из плазмы пациентов с ESRD, и изучение возможного влияния этих изменений на процесс образования фибрина и его свойства.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Образцы.** Образцы крови ( $n = 50$ , 25 мужчин, 25 женщин, возраст от 22 до 87 лет) были взяты у больных с диагнозом ESRD, которых регулярно подвергали процедуре перитонеального диа-

лиза (PD) в Сербском клиническом центре. Всем больным, обследованным в данной работе, был поставлен диагноз хроническое заболевание почек 5-й степени. Все они проходили одинаковое заместительное лечение почек, т.е. перитонеальный диализ, в течение более шести месяцев. На протяжении трех месяцев перед забором крови ни у одного из пациентов не было зарегистрировано ни одного случая тромбоза или кровотечения. Кровь собирали в пробирку с антикоагулянтом (лимонной кислотой) рано утром перед проведением процедуры диализа.

Исходя из индивидуальных потребностей, все пациенты получали в качестве плановой терапии карбонат кальция, витамин D, эритропоэз-стимулирующий агент, блокатор рецепторов ангиотензина II, ингибитор ангиотензин-превращающего фермента и блокатор кальциевых каналов. Критерием исключения было наличие любой ранее известной аномалии при коагуляции. Исследование было проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и Руководством по этическим принципам для медицинских исследований с участием людей, и оно было одобрено Советом по этическим нормам клинического центра Сербии и INEP (приказ № 890/8). Образцы плазмы получали центрифугированием при 3500 об/мин в течение 5 мин через 1 ч после отбора проб. Контрольная группа (Н) состояла из здоровых людей соответствующего пола и возраста ( $n = 30$ , 14 мужчин, 16 женщин, возраст 30–85 лет). Перед выделением фибриногена были проведены рутинный биохимический и гематологический анализы образцов.

**Выделение фибриногена.** Фибриноген выделяли из плазмы крови путем его осаждения при насыщении сульфатом аммония до конечной концентрации соли, равной 20%. Образцы центрифугировали на центрифуге Eppendorf Minispin при 10 000 об/мин в течение 5 мин. Полученный осадок промывали 20%-ным сульфатом аммония в 50 мМ PBS, pH 7,4. Затем фибриноген растворяли в 50 мМ PBS и его чистоту определяли с помощью электрофореза. Концентрацию полученного фибриногена определяли с помощью набора с BCA («Thermo Fisher Scientific», США). В различных экспериментах использовали фибриноген в концентрациях, соответствующих определенным условиям.

**Определение карбонильных групп белков.** Образцы фибриногена (в конечной концентрации, равной 14,7 мкМ) инкубировали с 2,4-динитрофенилгидразином (DNP), который взаимодействует с карбонильными группами в молекуле белка (PCO), в соответствии с опубликованным ранее методом [16]. Обработанный

фибриноген анализировали путем электрофореза в 10%-ом полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) в восстанавливающих условиях. После завершения электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану, окрашивали красителем Ponceau S и исследовали с помощью иммуноблоттинга с использованием кроличьих антител против DNP («Sigma», Германия), конъюгированных с пероксидазой хрена вторых антител против кроличьих IgG («AbD», Великобритания), и реагента для усиления хемилюминесценции («Pierce Biotechnology», США). Белки визуализировали на основе денситометрического анализа с помощью программы Image Master TotalLab («Amersham BioSciences», Великобритания). Значения интенсивности окрашивания, полученные при иммуноблоттинге, нормализовали относительно значений интенсивности окрашивания, полученных с помощью Ponceau S.

**Спектрофлуориметрический анализ полученного препарата фибриногена.** Были приготовлены два набора образцов фибриногена: от здоровых людей (Н) и больных, подвергающихся процедуре диализа (PD). Каждый набор образцов содержал равные количества фибриногена. Наборы фибриногена (конечная концентрация белка была равна 20 нМ) анализировали с использованием спектрофлуориметра FluoroMax®-4 («HORIBA Scientific», Япония) с шириной щели возбуждения и эмиссии, равной 5 нм. Спектры регистрировали в диапазоне длин волн 310–400 нм (после возбуждения остатков триптофана в молекуле фибриногена при 295 нм) и корректировали относительно фонового сигнала, вызванного буфером 50 мМ PBS, pH 7,4.

**Анализ фибриногена с помощью метода спектрометрии кругового дихроизма (CD).** Спектры кругового дихроизма (КД) двух наборов препаратов фибриногена, приготовленных так же, как в случае спектрофлуориметрии (конечная концентрация 3 мкМ), регистрировали на спектрополяриметре J-815 («Jasco», Япония). КД-спектры в дальнем ультрафиолете (Far-UV CD spectra), используемые для анализа вторичной структуры белков, регистрировали в диапазоне длин волн 185–260 нм при скорости сканирования 50 нм/мин с использованием ячейки с оптической длиной волны 0,1 мм и накоплением трех сканов. Спектры кругового дихроизма в ближнем ультрафиолете (Near-UV CD spectra), которые используются для определения пространственной структуры белка, регистрировали в диапазоне длин волн 250–350 нм при скорости сканирования 50 нм/мин, используя ячейку с длиной оптического пути, равной 10 нм, и про-

изводя запись трех последовательных сканов. Полученные спектры КД в дальнем ультрафиолете анализировали с помощью программы CDPго.

**Определение времени свертывания выделенного фибриногена.** Коагуляционный анализ проводили при комнатной температуре в микропланшете для титрования. Тромбин (1 IU/мл, конечная концентрация) добавляли к фибриногену (индивидуальные образцы, конечная концентрация белка в 50 мМ PBS, дополненном 2,2 мМ CaCl<sub>2</sub>, равна 2,9 мкМ). Полученные образцы немедленно помещали на прибор Victor3V multilabel reader, снабженный орбитальным шейкером («Perkin Elmer», США). Процесс коагуляции регистрировали при длине волны 350 нм в течение 8 мин с интервалом 10 с [17]. Полученные данные корректировали относительно контроля, содержащего все компоненты за исключением фибриногена. Скорость и время коагуляции вместе с изменениями максимальных значений поглощения, отражающих толщину фибрилл, определяли согласно уравнению:  $A_{350} = f(\text{время})$ , как было описано ранее [18].

**Определение толщины фибрилл.** Для проведения сканирующей электронной микроскопии (SEM) были приготовлены гели с использованием объединенного препарата фибриногена, приготовленного так же, как в случае спектрофлуориметрии (11,8 мкМ в 50 мМ PBS, дополненном 2,2 мМ CaCl<sub>2</sub>), и тромбина (1 IU/мл). После лиофилизации на образцы фибрина напыляли золото и проводили сканирование с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM 6390LV scanning electron microscope («JEOL», США). Полученные изображения изучали с помощью программы ImageJ («NIH», США) и толщину фибрилл измеряли в нескольких частях каждого изображения.

**Статистическая обработка данных.** Полученные результаты представлены в виде медиан с рангом 2,5 и 97,5 перцентилей. Сравнение данных двух групп образцов проводили с использованием *U*-критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при значениях  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Биохимическая и гематологическая характеристика полученных образцов.** Основные данные по биохимическим и гематологическим показателям образцов фибриногена, полученных от здоровых людей (Н) и больных с ESRD, подвергающихся перитонеальному диализу (PD) представлены в табл. 1. Аналогично результатам других авторов [14], нами также было показано,

**Таблица 1.** Биохимический и гематологический анализ образцов, полученных от здоровых людей (Н) и больных с ESRD, проходящих процедуру перитонеального диализа (PD)

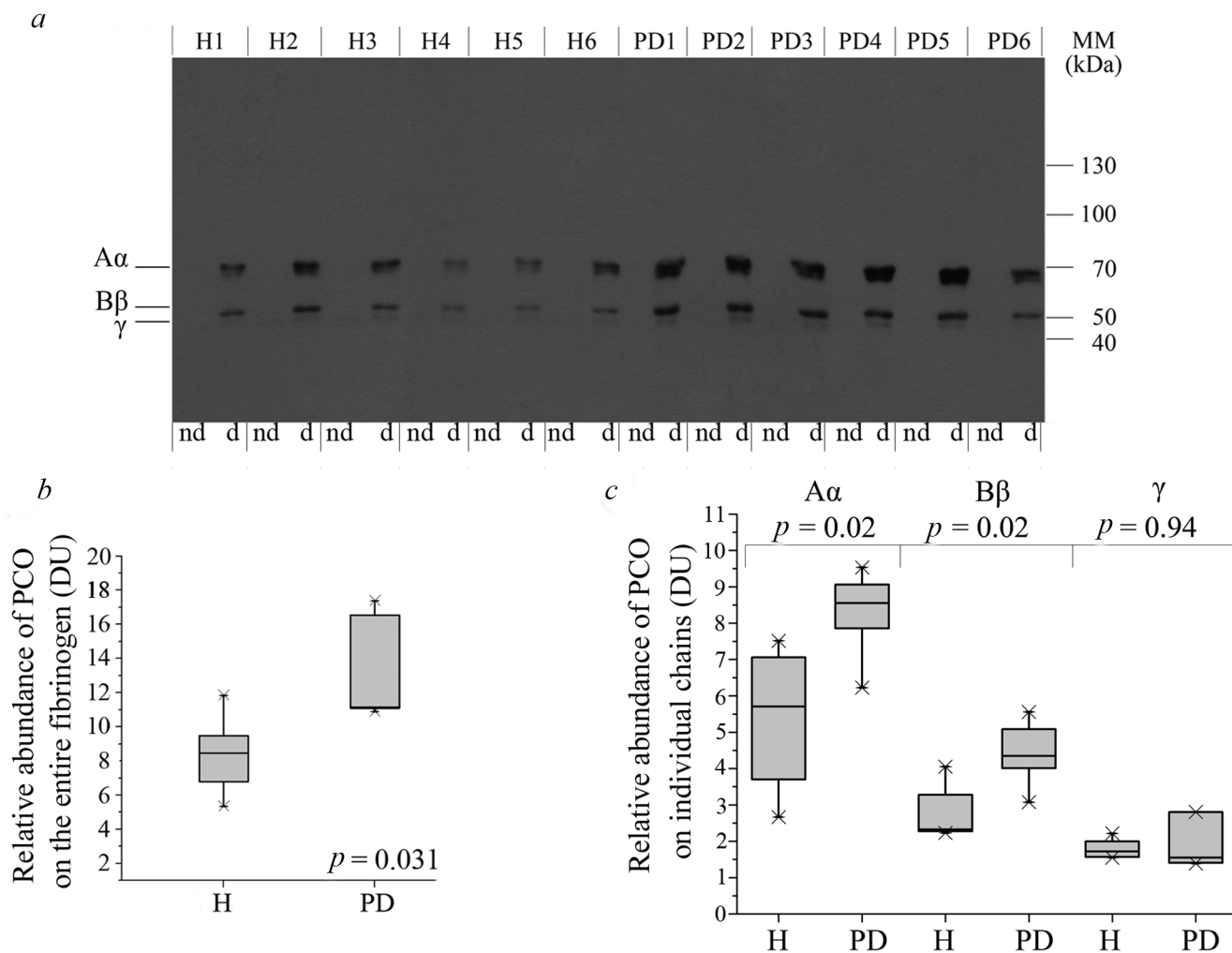
Концентрация	Группа Н, n = 30	Группа PD, n = 50	Различия, величина <i>p</i>
Возраст	30–85	22–87	
Мужчины	14	25	
Женщины	16	25	
Общий белок (г/л)	72 (68–77)	64 (55–77)	<0,001
Альбумин (г/л)	44 (40–49)	37 (28–44)	<0,001
С-реактивный белок мг/л)	2,2 (1,1–3,8)	6,0 (0,7–124,0)	<0,001
Фибриноген (г/л)	3,5 (2,9–4,0)	4,5 (2,9–7,0)	<0,001
Мочевина (ммоль/л)	5,1 (4,3–6,1)	16,1 (8,5–26,0)	<0,001
Креатинин (мкмоль/л)	81 (48–109)	668 (384–997)	<0,001
Мочевая кислота (мкмоль/л)	230 (132–375)	310 (218–471)	0,012
Натрий (ммоль/л)	140 (137–142)	138 (131–143)	0,23
Калий (ммоль/л)	4,4 (3,9–4,5)	4,3 (3,2–5,6)	0,72
Фосфат (ммоль/л)	0,9 (0,8–1,0)	1,4 (0,8–2,4)	<0,001
Кальций (ммоль/л)	2,3 (2,1–2,4)	2,3 (1,8–2,8)	0,72
Железо (мкмоль/л)	17,6 (9,8–21,5)	11,5 (7,6–19,7)	<0,001
Эритроциты (10 <sup>12</sup> )	4,5 (4,2–5,3)	3,4 (0,3–4,3)	<0,001
Гемоглобин (г/л)	141 (125–166)	103 (72–129)	<0,001
Гематокрит (л/л)	0,40 (0,36–0,47)	0,31 (0,03–0,41)	<0,001

что у больных, подвергающихся перитонеальному диализу, изменяются концентрации многих анализируемых веществ, что сказывается на их состоянии.

**Определение содержания карбонильных групп в цепях фибриногена.** В результате проведения реакции между образцами выделенного препарата фибриногена и динитрофенилгидразином (DNP) и последующего электрофореза белков в восстанавливающих условиях (SDS-PAGE) и иммуноблоттинга с антителами против DNP было показано, что фибриноген, выделенный из крови больных с ESRD, характеризуется значительно большим содержанием карбонильных групп по сравнению с фибриногеном, полученным от здоровых людей. На рис. 1, *a* (вместе с необработанными DNP образцами в качестве контроля) представлен репрезентативный иммуноблот, полученный с помощью антител против DNP. Результаты денситометрии иммуноблотов и статистическая обработка значений интенсивности сигналов для всех образцов показаны на рис. 1, *b*. Все значения сигналов иммуноблотов были нормализованы относительно сигналов общего белка, полученных при окрашивании мембран красителем Ponceau S. В соответствии с ранее сообщенными повышенными концентрациями конечных продуктов окис-

ления у пациентов с ESRD, подвергнутых перитонеальному диализу [10, 19, 20], нами было показано, что фибриноген был одной из модифицированных молекул. Как можно видеть на рис. 1, *a*, больше всего окислению подвержена  $\alpha\alpha$ -цепь фибриногена, за которой следует  $\beta\beta$ -цепь. В то же время  $\gamma$ -цепь устойчива к действию активных форм кислорода.

Разницу в восприимчивости цепей фибриногена к окислению можно объяснить различными первичными структурами этих полипептидов, а также различной стерической доступностью специфических групп, способных взаимодействовать с АФК. Сравнение содержания карбонильных групп в отдельных цепях фибриногена (рис. 1, *c*) выявило увеличение содержания PCO в  $\alpha\alpha$ - и  $\beta\beta$ -цепях в группе больных на 50 и 60% соответственно. В случае карбонилирования  $\gamma$ -цепи существенной разницы между двумя группами не обнаружено. Окисление фибриногена может влиять на его функционирование, что было показано в случае больных с диабетом [21], циррозом [22] и инфарктом миокарда [23]. Также предполагается, что окислительная модификация играет важную роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний у больных с ESRD, проходящих процедуру гемодиализа [24]. Окисленный фибриноген часто демон-



**Рис. 1.** *a* – Репрезентативный иммуноблот, полученный с использованием антител против DNP, в случае выделенного фибриногена, необработанного динитрофенилгидразином (nd: non-derivatised) и обработанного DNP (d: derivatised), полученного от здоровых людей (H1-6) и больных с ESRD, подвергнутых перитонеальному диализу (PD1-6); *b* – статистический анализ значений интенсивности сигнала антител против DNP для всех образцов фибриногена, нормализованных относительно сигнала общего белка, полученных при окрашивании мембран красителем Ponceau; *c* – статистический анализ значений интенсивности сигнала антител против DNP для отдельных цепей всех образцов фибриногена. Данные в боксах колеблются от 25 до 75-ого перцентиля, нижние границы данных колеблются от 25-й до 5-й перцентиля, тогда как верхние данные колеблются от 75-го до 95-го перцентиля; горизонтальные полосы в боксах представляют медианы, звездочки определяют 1-й и 99-й перцентиль, верхние горизонтальные полосы определяют максимальные значения, тогда как нижние горизонтальные полосы определяют минимальные значения

стрирует тромбогенные свойства, так как формируемый им сгусток имеет более тонкие фибриллы и является менее пористым и поэтому менее проницаемым для фибринолитических агентов [25]. В то же время иногда фибриллы фибрина и поры в сгустке, образующемся на основе окисленного фибриногена, не отличаются от фибрилл и пор нативного белка, хотя сгустки демонстрируют меньшую пористость [22]. Окисление белка может оказывать влияние на вторичную и пространственную структуру фибриногена и соответственно влиять на его свойства и поведение.

**Анализ полученного препарата с помощью метода спектрофлуориметрии и спектрометрии кругового дихроизма (КД).** Были получены спектры эмиссии флуоресценции фибриногена, полученного от двух наборов образцов (группы H и PD). Максимум эмиссии для обеих групп располагался при длине волны 344 нм (рис. 2, *a*), однако интенсивность максимальной внутренней эмиссии в группе PD была снижена на 17 % по сравнению с группой H. Это снижение интенсивности может являться следствием нескольких событий: изменений в химическом микроокружении остатков триптофана (т.е. увеличе-

ния экспонирования остатка триптофана в растворитель вследствие конформационных изменений белка), тушения эмиссии остатка триптофана вновь образованными флуорофорами (вследствие карбонилирования молекулы фибриногена) и/или окисления остатков триптофана [9] и последующей утраты способности вызывать эмиссию флуоресценции после её возбуждения [26, 27].

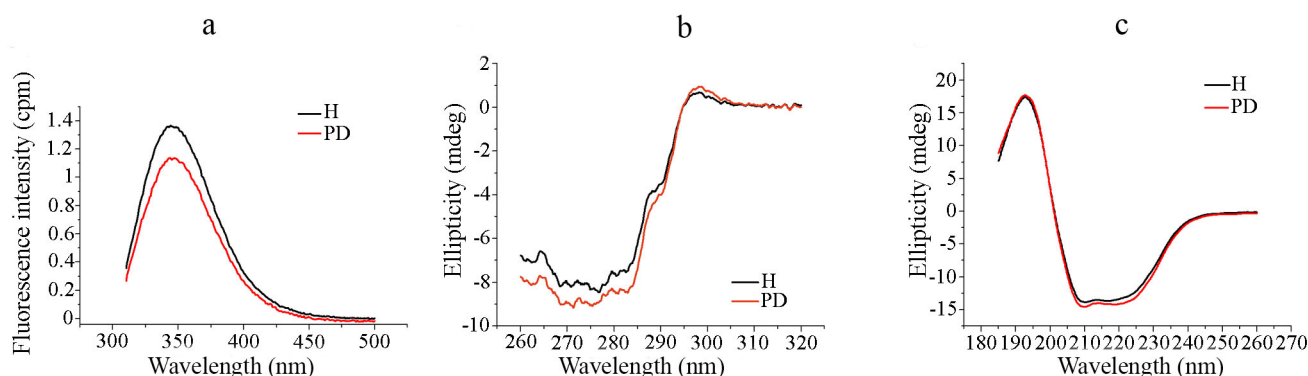
На основе результатов, полученных при регистрации спектров кругового дихроизма в ультрафиолетовой области (рис. 2, *b* и *c*), были установлены небольшие различия в пространственной и вторичной структуре образцов фибриногена из обеих групп. Наиболее явные различия наблюдали при записи спектров КД в ближнем ультрафиолете.

С помощью программного пакета CDPго были произведены расчеты, основывающиеся на ограниченном количестве данных. Было получено на основе анализа спектров КД в дальнем ультрафиолете, что содержание  $\alpha$ -спирали, доминирующего типа вторичной структуры в молекуле фибриногена, было равно 33% в группе Н и 34% в группе PD. На основе анализа результатов спектрометрии как в дальнем, так и ближнем ультрафиолете (вторичная и пространственная структура белка соответственно) можно предположить, что пространственная структура фибриногена у больных в большей степени изменена по сравнению со вторичной структурой, так как различия в спектрах КД в ближнем ультрафиолете выражены более значительно по сравнению с различиями спектров КД в дальнем ультрафиолете. Также было показано, что как  $\alpha\alpha$ -, так и  $\beta\beta$ -цепи фибриногена подвержены окислительной модификации. Аминокислотные остатки, которые подвергаются окислению в этих двух типах цепей, располагаются внутри

всех элементов их структуры. В связи с тем, что  $\alpha\alpha$ -цепь особенно подвержена окислению, и в особенности этим отличается её концевой  $\alpha\text{C}$ -домен, можно предположить, что изменения пространственной структуры фибриногена могут быть вызваны в основном в результате изменений, происходящих в  $\alpha\alpha$ -цепи. Окисление многих аминокислотных остатков в  $\alpha\text{C}$ -доменах приводит к ослаблению взаимодействий связи  $\alpha\text{C}-\alpha\text{C}$  и, как следствие, к возникновению структурных изменений [28].

**Коагуляционный анализ выделенного фибриногена.** Результаты определения продолжительности и скорости коагуляции фибриногена в присутствии тромбина свидетельствуют о том, что нет различий между двумя группами, и это можно видеть в табл. 2. Временная диаграмма процесса коагуляции представлена на рис. 3. Скорость коагуляции определяли по углу наклона начальной скорости процесса. Время коагуляции — это время, за которое достигается половина максимальной величины оптического поглощения. Изменения максимального значения оптического поглощения определяли при завершении определения времени и скорости коагуляции. Все три параметра отчетливо показаны на рис. 3.

В предыдущих работах, посвященных изучению процесса коагуляции у больных с ESRD, использовали цельную кровь или плазму [14, 15]. Обычно на основании данных о повышенной концентрации фибриногена делали вывод о том, что такие больные находятся в группе риска образования тромбов [29]. В настоящей работе с использованием одинаковых концентраций выделенного фибриногена из всех тестируемых образцов не было обнаружено значительных различий между параметрами коагуляции в двух изученных группах (у пациентов с ESRD и здо-



**Рис. 2.** Структурный анализ фибриногена, полученного от здоровых людей (H) и больных с ESRD, проходящих процедуру перитонеального диализа (PD), с помощью (a) спектрофлуориметрии, (b) кругового дихроизма в ближнем ультрафиолете и (c) кругового дихроизма в дальнем ультрафиолете. (С цветными вариантами рис. 2 и 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

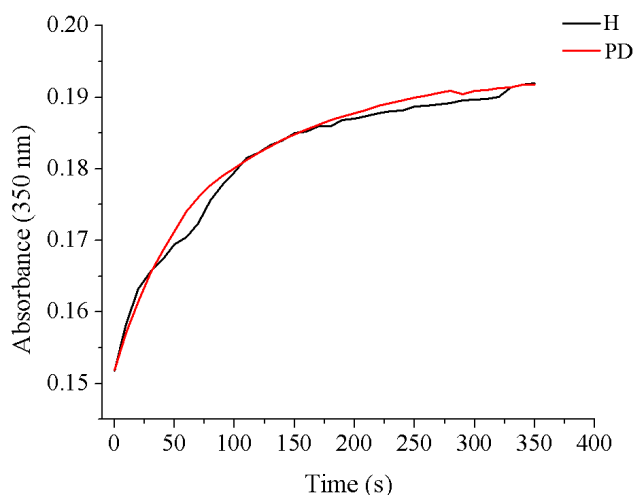


**Таблица 2.** Коагуляционные свойства фибриногена, выделенного из крови здоровых людей (Н) и больных с ESRD, проходящих процедуру перитонеального диализа (PD)

Параметр коагуляции	Группа Н, <i>n</i> = 30	Группа PD, <i>n</i> = 50	Различия, величина <i>p</i>
Время коагуляции (s)	51,0 (27,9–77,5)	53,0 (38,4–71,8)	0,857
Скорость коагуляции (ΔА/мин)	0,035 (0,018–0,054)	0,030 (0,010–0,045)	0,389
Изменение максимальной величины оптического поглощения при 350 нм	0,038 (0,026–0,053)	0,038 (0,032–0,057)	0,617

ровых людей). В таком выбранном нами типе эксперимента, не только удалялись различия, которые могли быть связаны с различиями в концентрации белка, но также исключалось влияние других факторов, которые имеются в крови (например, другие компоненты каскада свертывания крови, лекарства и т.д.). Идея нашего исследования заключалась в том, чтобы изучить влияние исключительно фибриногена. Согласно полученным нами результатам, окисленный фибриноген не оказывает прямого влияния на процесс образования фибрина при ESRD. Таким образом, можно предположить, что кроме химических изменений (т.е. окисление и карбамилирование [30]) и модификации структуры фибриногена у больных с ESRD, проходящих процедуру перитонеального диализа, изменения других факторов коагуляции могут действовать синергично, приводя к возможной коагулопатии.

Для изучения структуры фибрилл фибрина, образующихся из выделенного фибриногена,

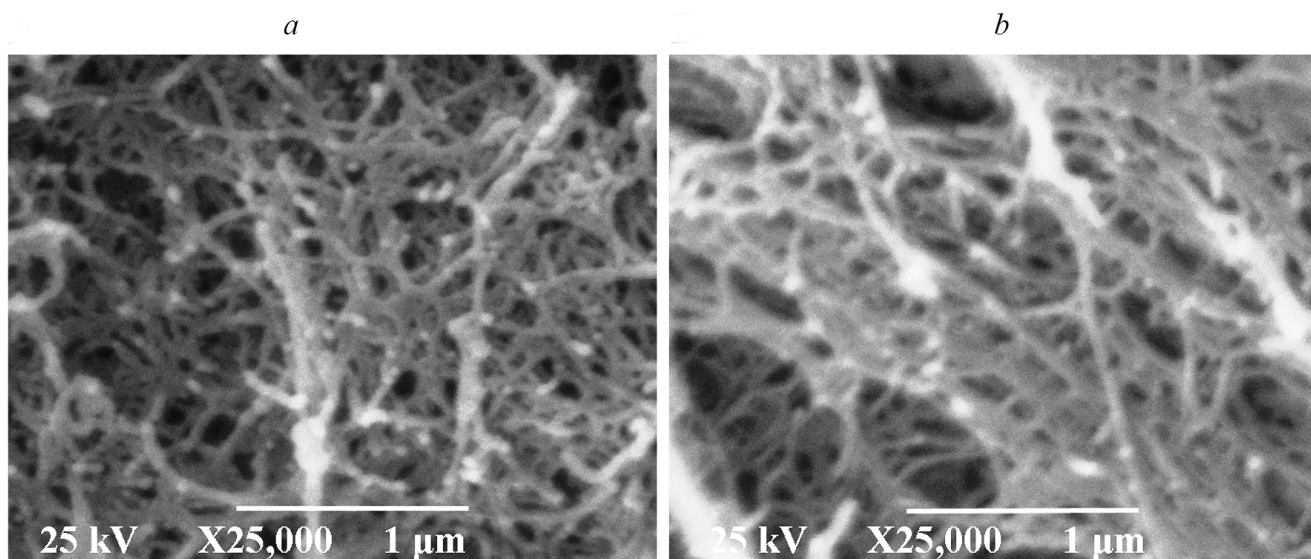
**Рис. 3.** Временная диаграмма процесса коагуляции в случае репрезентативных образцов из каждой группы: здоровые люди (Н) и больные с ESRD, проходящие процедуру перитонеального диализа (PD)

использовали сканирующую электронную микроскопию. На рис. 4 показаны два репрезентативных примера полученных изображений.

Результаты сканирующей электронной микроскопии соответствуют данным коагуляционного анализа, поскольку на изображениях показаны сходные сгустки в двух группах образцов при условии, что для формирования фибрина были взяты равные количества полученного фибриногена. Известно, что более толстые фибриллы фибрина могут коррелировать с большей пористостью и более быстрым лизисом [22, 31]. Значения максимального оптического поглощения при 350 нм в нашем эксперименте, которые зависят от толщины фибрилл, были идентичны в обеих исследованных группах (табл. 2), и этот результат нашел свое подтверждение при рассмотрении изображений, полученных с помощью сканирующей электронной микроскопии, на которых видны фибриллы фибрина сходной толщины.

Аα- и Вβ-цепи фибриногена являются основными участниками процесса образования фибрина после активации тромбином. После удаления А- и В-пептидов фибрина происходит промежуточное и боковое объединение мономеров фибрина. Далее в латеральную агрегацию мономеров фибрина вносят вклад αС-домены [7]. Интенсивное окисление Аα- и Вβ-цепей, сопровождающееся изменениями во вторичной и пространственной структуре, может влиять на свойства фибрина. Это предположение не было подтверждено в нашей работе, что позволило нам предположить, что модификация молекулы фибриногена и их влияние на эту молекулу являются специфичной для этой патологии. Необходимы дальнейшие исследования на молекулярном уровне для выявления механизмов, которые ответственны за аномалии процесса коагуляции в различных патологиях, ассоциированных с коагуляцией.

В экспериментах с образцами плазмы крови или выделенного фибриногена, полученных от больных с заболеваниями печени, было показа-



**Рис. 4.** Репрезентативные изображения, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии (SEM) фибрилл фибрина, образующихся из фибриногена, полученного от (а) здоровых людей и (b) больного с ESRD, проходящего процедуру перитонеального диализа

но, что карбонилированный фибрин способствует созданию более гидрофобного микроокружения, которое приводит к снижению его пористости даже в том случае, когда структура сгустка не изменяется [25]. Это может также быть одним из свойств фибрина у больных с ESRD, у которых фибриноген был в большей степени карбонилирован, однако при этом не происходило значительных изменений в структуре фибрина. Известно, что у больных с хроническими заболеваниями почек карбамилрование фибриногена приводит к возникновению устойчивости фибрина к деградации, вызванной плазмином, и к снижению его механической стабильности [30]. В настоящий момент не ясна роль каждой из этих химических модификаций в обнаруживаемых изменениях структуры фибриногена. Так как фибриноген очень подвержен окислению [11], и ESRD является состоянием, которое сопровождается повышенным окислительным стрессом, можно предположить, что окисление является основной химической модификацией, ответственной за обнаруженные изменения. Очевидно, что очень сложный комплекс взаимодействий между различными факторами, которые могут иметь измененную концентрацию или структуру, обуславливает осложнения в процессе свертывания крови, наблюдаемую у больных с ESRD, проходящих процедуру перитонеального диализа. Поэтому необходимы дальнейшие исследования в этой области и, в особенности, касательно роли отдельных компонентов этого процесса. Так как ESRD

у некоторых больных сопровождается кровотечением, а у других приводит к тромботическим осложнениям [32], необходимы дополнительные исследования механизмов, приводящих к тому или иному исходу. Полученные нами результаты предоставляют детальные сведения, касающиеся изменений структуры ключевого белка процесса свертывания крови, каким является фибриноген.

Показано, что фибриноген, выделенный из крови больных с ESRD, проходящих процедуру перитонеального диализа, отличается повышенным содержанием карбонильных групп, особенно в его A $\alpha$ - и B $\beta$ -цепях, и измененной вторичной и пространственной структурой. Время и скорость его коагуляции, а также толщина фибрилл у больных и здоровых людей не различаются, что подразумевает то, что фибриноген, подвергшийся окислительной модификации, не оказывает прямого влияния на скорость образования фибрина. Полученные нами результаты говорят о том, что другие факторы, кроме окисления фибриногена, оказывают влияние на поведение этого белка у больных с ESRD, особенно если принять во внимание тот факт, что при таком патологическом состоянии регистрируются как кровотечения, так и тромбоз.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образова-



ния, науки и технологического развития Республики Сербия (грант 173042).

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность проф. Владимиру Павловичу, сотруднику сельскохозяйственного факультета Белградского университета за проведение сканирующей электронной микроскопии и Мирьяне Радомирович, сотруднице химического факультета Белградского университета за проведение спектрофлуориметрического анализа и определение спектров кругового дихроизма.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Все процедуры в настоящей работе, выполненные с участием людей, соответствуют этическим стандартам государственного Комитета по этике научных исследований и Хельсинкской декларации от 1964 г. и её последующими изменениями, а также с аналогичными этическими стандартами. От каждого участника этого исследования было получено добровольное информированное согласие.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Silverstein, D. M. (2009) Inflammation in chronic kidney disease: role in the progression of renal and cardiovascular disease, *Pediatr. Nephrol.*, **24**, 1445-1452, doi: 10.1007/s00467-008-1046-0.
- Xu, H., Cabezas-Rodriguez, I., Qureshi, A. R., Heimbürger, O., Barany, P., Snaedal, S., Anderstam, B., Helin, A. C. B., Carrero, J. J., Stenvinkel, P., and Lindholm, B. (2015) Increased levels of modified advanced oxidation protein products are associated with central and peripheral blood pressure in peritoneal dialysis patients, *Perit. Dial. Int.*, **35**, 460-470, doi: 10.3747/pdi.2013.00064.
- Huang, M. J., Wei, R. B., Wang, Y., Su, T. Y., Di, P., Li, Q. P., Yang, X., Li, P., and Chen, X. M. (2017) Blood coagulation system in patients with chronic kidney disease: a prospective observational study, *BMJ Open*, **7**, 7-13, doi: 10.1136/bmjopen-2016-014294.
- Lutz, J., Menke, J., Sollinger, D., Schinzel, H., and Thümel, K. (2014) Haemostasis in chronic kidney disease, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **29**, 29-40, doi: 10.1093/ndt/gft209.
- Liakopoulos, V., Roumeliotis, S., Gorny, X., Eleftheriadis, T., and Mertens, P. R. (2017) Oxidative stress in patients undergoing peritoneal dialysis: a current review of the literature, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2017**, doi: 10.1155/2017/3494867.
- Brophy, D. F., Carl, D. E., Mohammed, B. M., Song, J., Martin, E. J., Bostic, J. L., and Gehr, T. W. B. (2014) Differences in coagulation between hemodialysis and peritoneal dialysis, *Perit. Dial. Int.*, **34**, 33-40, doi: 10.3747/pdi.2013.00036.
- Mosesson, M. W. (2005) Fibrinogen and fibrin structure and functions, *J. Thromb. Haemost.*, **3**, 1894-1904, doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01365.x.
- Marchi, R., Arocha-Piñango, C. L., Nagy, H., Matsuda, M., and Wiesel, J. W. (2004) The effects of additional carbohydrate in the coiled-coil region of fibrinogen polymerization and clot structure and properties: characterization of the homozygous and heterozygous forms of fibrinogen lima (A $\alpha$  Arg141  $\rightarrow$  Ser with extra glycosylation), *J. Thromb. Haemost.*, **2**, 940-948, doi: 10.1111/j.1538-7836.2004.00730.x.
- Martinez, M., Weisel, J. W., and Ischiropoulos, H. (2013) Functional impact of oxidative post-translational modifications on fibrinogen and fibrin clots, *Free Radic. Biol. Med.*, **65**, 411-418, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.039.
- Selmeci, L. (2011) Advanced oxidation protein products (AOPP): novel uremic toxins, or components of the non-enzymatic antioxidant system of the plasma proteome? *Free Radic. Res.*, **45**, 1115-1123, doi: 10.3109/10715762.2011.602074.
- 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 Radic. Biol. Med.*, **17**, 429-437, doi: 10.1016/0891-5849(94)90169-4.
- Štikarová, J., Kotlín, R., Riedel, T., Suttnar, J., Pimková, K., Chrástínová, L., and Dyr, J. E. (2013) The effect of reagents mimicking oxidative stress on fibrinogen function, *Sci. World J.*, **2013**, doi: 10.1155/2013/359621.
- 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 Radic. Biol. Med.*, **96**, 181-189, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.023.
- Sjøland, J. J., Sidelmann, J. J., Brabrand, M., Pedersen, R. S., Pedersen, J. H., Esbensen, K., Standeven, K. F., Ariëns, R. A. S., and Gram, J. (2007) Fibrin clot structure in patients with end-stage renal disease, *Thromb. Haemost.*, **98**, 339-345, doi: 10.1160/TH06-12-0715.
- Holloway, S., Vagher, J. P., Caprini, J. A., Simon, N. M., and Mockros, L. F. (1987) Thromboelastography of blood from subjects with chronic renal failure, *Thromb. Res.*, **45**, 817-825, doi: 10.1016/0049-3848(87)90091-0.
- Levine, B. R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A., Ahn, B., Shaltiel, S., and Stadman, E. R. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.*, **186**, 464-478, doi: 10.1016/0076-6879(90)86141-H.
- Scott, D. J. A., Prasad, P., Philippou, H., Rashid, S. T., Sohrabi, S., Whalley, D., Kordowicz, A., Tang, Q., West, R. M., Johnson, A., Woods, J., Ajjan, R. A., and Ariëns, A. S. (2011) Clot architecture is altered in abdominal aortic aneurysms and correlates with aneurysm size, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **31**, 3004-3010, doi: 10.1161/ATVBAHA.111.236786.
- Tilley, D., Levit, I., and Samis, J. A. (2011) Measurement of factor V activity in human plasma using a microplate coagulation assay, *J. Vis. Exp.*, **2011**, 2-7, doi: 10.3791/3822.
- Selmeci, L., Székely, M., Soós, P., Seres, L., Klinga, N., Geiger, A., and Acsády, G. (2006) Human blood plasma advanced oxidation protein products (AOPP) correlates with fibrinogen levels, *Free Radic. Res.*, **40**, 952-958, doi: 10.1080/10715760600818789.
- Suzuki, Y. J., Carini, M., and Butterfield, D. A. (2010) Protein carbonylation, *Antioxid. Redox Signal.*, **12**, 323-325, doi: 10.1089/ars.2009.2887.
- Lados-Krupa, A., Konieczynska, M., Chmiel, A., and Undas, A. (2015) Increased oxidation as an additional mechanism underlying reduced clot permeability and

- impaired fibrinolysis in type 2 diabetes, *J. Diabetes Res.*, **2015**, doi: 10.1155/2015/456189.
22. Hugenholtz, G. C. G., Macrae, F., Adelmeijer, J., Dulfer, S., Porte, R. J., Lisman, T., and Ariëns, R. A. S. (2016) Procoagulant changes in fibrin clot structure in patients with cirrhosis are associated with oxidative modifications of fibrinogen, *J. Thromb. Haemost.*, **14**, 1054-1066, doi: 10.1111/jth.13278.
  23. Becatti, M., Marcucci, R., Bruschi, G., Taddei, N., Bani, D., Gori, A. M., Giusti, B., Gensini, G. F., Abbate, R., and Fiorillo, C. (2014) Oxidative modification of fibrinogen is associated with altered function and structure in the subacute phase of myocardial infarction, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **34**, 1355-1361, doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303785.
  24. Undas, A., Kolarz, M., Kopeć, G., and Tracz, W. (2007) Altered fibrin clot properties in patients on long-term haemodialysis: relation to cardiovascular mortality, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **23**, 2010-2015, doi: 10.1093/ndt/gfm884.
  25. Lisman, T., Ariëns, R. A. S. (2016) Alterations in fibrin structure in patients with liver diseases, *Semin. Thromb. Hemost.*, **42**, 389-396, doi: 10.1055/s-0036-1572327.
  26. Utrera, M., and Estévez, M. (2012) Analysis of tryptophan oxidation by fluorescence spectroscopy: effect of metal-catalyzed oxidation and selected phenolic compounds, *Food Chem.*, **135**, 88-93, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.04.101.
  27. Cao, Y., True, A. D., Chen, J., and Xiong, Y. L. (2016) Dual role (anti- and pro-oxidant) of gallic acid in mediating myofibrillar protein gelation and gel *in vitro* digestion, *J. Agric. Food Chem.*, **64**, 3054-3061, doi: 10.1021/acs.jafc.6b00314.
  28. Rosenfeld, M. A., Vasilyeva, A. D., Yurina, L. V., and Bychkova, A. V. (2018) Oxidation of proteins: is it a programmed process, *Free Radic. Res.*, **52**, 14-38, doi: 10.1080/10715762.2017.1402305.
  29. Blombäck, B., Carlsson, K., Hessel, B., Liljeborg, A., Procyk, R., and Åslund, N. (1989) Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity, *Biochim. Biophys. Acta*, **997**, 96-110, doi: 10.1016/0167-4838(89)90140-4.
  30. Binder, V., Bergum, B., Jaisson, S., Gillery, P., Scavenius, C., Spriet, E., Nyhaug, A. K., Roberts, H. M., Chapple, I. L. C., Hellvard, A., Delaleu, N., and Mydel, P. (2017) Impact of fibrinogen carbamylation on fibrin clot formation and stability, *Thromb. Haemost.*, **117**, 899-910, doi: 10.1160/TH16-09-0704.
  31. Li, W., Sigley, J., Pieters, M., Helms, C. C., Nagaswami, C., Weisel, J. W., and Guthold, M. (2016) Fibrin fiber stiffness is strongly affected by fiber diameter, but not by fibrinogen glycation, *Biophys. J.*, **110**, 1400-1410, doi: 10.1016/j.bpj.2016.02.021.
  32. Lu, H. Y., and Liao, K. M. (2018) Increased risk of deep vein thrombosis in end-stage renal disease patients, *BMC Nephrol.*, **19**, 9-14, doi: 10.1186/s12882-018-0989-z.

## MODIFICATION OF FIBRINOGEN AND FIBRIN FORMATION IN PATIENTS WITH AN END-STAGE RENAL DISEASE SUBJECTED TO PERITONEAL DIALYSIS

**M. Baralić<sup>1</sup>, D. Robajac<sup>2</sup>, A. Penezić<sup>2</sup>, G. Miljuš<sup>2</sup>,  
M. Šunderić<sup>2</sup>, N. Gligorijević<sup>2\*</sup>, and O. Nedić<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Clinical Centre of Serbia, Department of Nephrology, 11000 Belgrade, Serbia*

<sup>2</sup> *Institute for the Application of Nuclear Energy (INEP), Department of Metabolism,  
University of Belgrade, 11080 Belgrade, Serbia; E-mail: nikolag@inep.co.rs*

Received April 30, 2020

Revised June 14, 2020

Accepted June 19, 2020

An end-stage renal disease (ESRD) is a condition accompanied by increased inflammation, oxidative stress, risk of cardiovascular complications and coagulopathies. The structure of fibrinogen, isolated from plasma samples from ESRD patients on peritoneal dialysis, was investigated in this study, together with characteristics of its fibrin. A higher degree of carbonylation was detected on fibrinogen from patients than from healthy persons. The  $\alpha\alpha$  chain was the most susceptible to oxidation, followed by the  $\beta\beta$  chain, whereas the  $\gamma$ -chain was the most resistant. The spectrofluorimetric analysis suggested that additional modification of the amino acid side chains occurred in fibrinogen from patients. The tertiary structure of fibrinogen was more affected than the secondary. The time and the speed (kinetics) of fibrinogen coagulation did not differ between the tested groups. Fibrin prepared from isolated fibrinogen had a similar structure in both groups. Our results confirm that oxidation and structural alterations of fibrinogen occur in ESRD patients on peritoneal dialysis, although direct consequences on fibrin formation were not seen. Taking into account that some patients suffer from bleeding, whereas others develop thrombotic complications, further research on this subject is required to map other involved components and processes which contribute to the outcome.

**Keywords:** fibrinogen, oxidation, protein structure, coagulation