

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени М. В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Галочкина Татьяна Владимировна

Моделирование структуры липополисахаридов
и их роли в процессе патологического свертывания крови

03.01.02 — Биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор, член-корреспондент РАН А.Б. Рубин

Москва, 2017

Оглавление

Введение	5
1 Обзор литературы	13
1 Система свертывания крови	13
1.1 Распространение волны свертывания	14
1.2 Механизмы остановки роста тромба	16
1.3 Активация системы свертывания	17
1.4 Пороговое поведение системы свертывания крови	18
1.5 Активация системы свертывания при сепсисе	22
2 Клеточная стенка грамотрицательных бактерий: липополисахариды	25
2.1 Структура ЛПС	26
2.2 Влияние структуры ЛПС на биологическую активность	29
2.3 Пространственная структура ЛПС: эксперимент и модели	32
2 Методы	37
1 Подготовка и проведение МД расчетов	37
1.1 Создание молекулярных топологий	37
1.2 Расчеты <i>ab initio</i>	38
1.3 Протоколы МД расчетов	40
1.4 Обработка результатов расчетов	45
2 Численное решение уравнений в частных производных	47
3 Метод Лере-Шаудера доказательства существования решений типа пульс	47
4 Интегрирование и оценка параметров для кинетической модели активации контактной системы	48
3 Математическое моделирование режимов свертывания крови	51
1 Распространение волны тромбина	52

1.1	Математическая модель	52
1.2	Автоволновые решения	55
1.3	Существование решений типа пульс	63
1.4	Неустойчивость решений типа пульс	84
2	Режим полной и частичной закупорки сосуда	85
2.1	Математическая модель: химические реакции	86
2.2	Модель потока	89
2.3	Результаты численного моделирования	90
2.4	Роль скорости потока в формировании тромба	93
2.5	Теоретический анализ упрощенной модели	94
2.6	Заключения о результатах моделирования активации внешнего пути .	98
3	Активация контактного пути системы свертывания	99
3.1	Математическая модель	100
3.2	Результаты моделирования	104
3.3	Заключения о результатах моделирования активации контактного пути	110
4	МД моделирование структуры ЛПС, ЛПС-агрегатов и ЛПС-мембран	113
1	Моделирование поведения свободного О-антигена в растворе	115
1.1	Конформационный анализ дисахаридных фрагментов	115
1.2	Конформационная подвижности длинной цепи О-антигена	124
1.3	Роль остатка рамнозы в подвижности цепи О-антигена	138
1.4	Заключение о конформационной динамике цепи О-антигена в растворе .	139
2	Валидация параметров липидного слоя	140
3	Параметры полярных головок и центрального олигосахарида	143
3.1	Корректировка парциальных зарядов	144
3.2	Корректировка параметров потенциалов двугранных углов	148
4	Модель молекулы ЛПС	150
5	Модели агрегатов ЛПС	150
6	Модели фрагмента внешней мембраны	154
6.1	Модели R-LPS бислоев	154
6.2	Модели S-LPS мембран	156
6.3	Общая структура мембран	156
6.4	Влияние арабинозы на структуру мембраны	162

Заключение	166
Список литературы	168
Приложение	199
1 Численное интегрирование модели из раздела 2 главы 3	199
2 Параметры расчетов в главе 3	201

Введение

Развитие системного воспалительного ответа (сепсиса) при инфекционном заражении является одной из наиболее распространенных причин смертности в больницах. По данным, полученным для пациентов, поступивших в отделения интенсивной терапии больниц США, общая смертность при развитии септической реакции составляет около 30 %, при том, что для более тяжелого синдрома септического шока это значение составляет 50 % [1, 2]. Одним из серьезнейших физиологических осложнений при сепсисе является синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдром), который характеризуется образованием тромбов по всему организму, ведущему к закупорке сосудов и отказу жизненно важных органов [2].

Активация системы свертывания крови в ответ на заражение представляет собой защитный механизм, основная задача которого — иммобилизация патогена. Диссеминированный тромбоз является следствием выхода из-под контроля этой физиологической реакции, что связано, прежде всего, с распространением чужеродных клеток по всему организму с током крови. Наиболее распространенным патогеном, вызывающим сепсис, являются грамотрицательные бактерии (~ 60 % случаев заражения [3]). Реакция организма на заражение грамотрицательной инфекцией связана, в первую очередь, с попаданием в кровь компонентов клеточной стенки бактерий — липополисахаридов (ЛПС), высвобождающихся при разрушении бактериальных клеток. ЛПС представляют собой крайне иммуногенные молекулы, способные активировать как врожденный, так и приобретенный иммунитет. Помимо активации иммунного ответа, ЛПС связываются со специальными клеточными рецепторами на поверхности моноцитов и нейтрофилов, активизируя их, а также вызывают воспаление и апоптоз клеток эндотелия [2]. В результате, попадание ЛПС в кровяное русло ведет к активации плазменного звена системы свертывания крови, что, в совокупности с обсуждаемой ролью ЛПС в активации тромбоцитов [4, 5], провоцирует образование тромбов [6].

Основным событием, ведущим к образованию тромба при активации плазменного звена системы свертывания крови, является локальный переход плазмы в гелеобразное состояние

за счет образования нерастворимых волокон полимерного фибрина. Образование фибрина из его предшественника фибриногена происходит в результате запуска каскада биохимических реакций взаимной активации присутствующих в крови проферментов с образованием активных ферментов, который называется каскадом свертывания крови. Ключевым ферментом каскада является тромбин, способный активировать фибриноген. За счет наличия положительных обратных связей в каскаде свертывания наработка тромбина в ответ на начальный стимул происходит лавинообразно, обеспечивая быстрое формирование тромба вблизи активатора. Запуск реакций каскада свертывания при сепсисе происходит в ответ на два основных типа событий: появление в кровяном русле тканевого фактора (ТФ) при нарушении целостности эндотелия или активации моноцитов (внешний путь), и попадание в кровоток чужеродной поверхности бактерий или ЛПС (внутренний путь). Взаимодействие ЛПС с клетками крови также дополнительно ведет к образованию прокоагулянтных микрочастиц, которые способны усиливать динамику образования тромбов [7].

На сегодняшний день показано, что подавление развития спонтанного тромбообразования через ингибирование системы свертывания может снижать уровень воспалительного ответа и улучшать выживаемость при развитии сепсиса [2]. Влияние различных факторов на динамику образования тромбов активно изучается экспериментально с целью разработки регулирующих ее препаратов. Несмотря на значительный прогресс в описании отдельных компонентов системы свертывания, суммарный ответ этой сложной системы на точечные возмущения часто оказывается невозможным предсказать, исходя из доступных экспериментальных наблюдений. В связи с этим, на протяжении нескольких десятилетий ключевую роль в исследовании процесса образования тромбов играет математическое и компьютерное моделирование. Модели образования тромбов в различных условиях позволяют воспроизвести два основных свойства системы свертывания — пороговый ответ на возмущение и быстрый рост сгустка в случае активации каскада свертывания. Основополагающая гипотеза, объясняющая подобное поведение системы, была сформулирована в работе Атауллаханова и Гурии в 1994 году [8]. Было предположено, что процесс нарастания концентрации тромбина в пространстве, обеспечивающий рост тромба, имеет автоволновую природу. Иными словами, в терминах математической модели, динамика изменения концентрации тромбина в пространстве соответствует автомодельному решению системы, распространяющемуся с постоянной скоростью, и имеющему постоянный профиль. Многочисленные подтверждения этой гипотезы получены в разнообразных экспериментальных работах [9, 10]. Тем не менее, аналитическое исследование математических моделей процесса свертывания крови существенно затруднено сложностью рассматриваемой системы. Основные теоретические результаты по-

лучены для пространственно однородных моделей кинетики образования тромбина [11, 12], а также для упрощенных пространственно распределенных моделей, включающих в себя минимальное количество переменных [13]. В разделе 1 главы 3 представленной диссертации приведено аналитическое исследование процесса распространения автоволны тромбина для пространственно распределенной модели, описывающей основные реакции каскада свертывания.

Помимо учета большого количества компонентов каскада свертывания крови, моделирование процесса тромбообразования существенно осложняется влиянием геометрии рассматриваемых систем на динамику формирования сгустка. Как было показано в модельных и экспериментальных исследованиях, пространственные эффекты играют ключевую роль при образовании сгустка вблизи поврежденной стенки сосуда в случае запуска внешнего пути каскада свертывания [9, 10]. Важнейшими факторами в таком процессе являются геометрия сосуда, размер поврежденной области и скорость тока плазмы. Роль последних двух факторов проанализирована с использованием модели активации внешнего пути каскада свертывания крови при повреждении сосуда, описанной в разделе 2 главы 3. Активация контактной системы на инородных объектах в плазме крови, в свою очередь, зависит от площади и структуры поверхности активатора [14]. Природа веществ, вызывающих активацию контактной системы при сепсисе, широко обсуждается [15, 16]. Результаты экспериментов *in vitro* по активации факторов контактной системы демонстрируют потенциальную роль ЛПС в этом процессе [17, 18]. При этом, существенное влияние на степень активации контактной системы оказывает склонность амфифильных молекул ЛПС к агрегации в водном растворе. Экспериментально было показано, что структура надмолекулярных агрегатов ЛПС существенным образом влияет на степень их биологической активности [19–21]. Модель активации контактного пути свертывания крови агрегатами ЛПС описана в разделе 3 главы 3.

Влияние пространственной структуры ЛПС и ЛПС-агрегатов на особенности их взаимодействия с клетками организма хозяина, а также на степень устойчивости грамотрицательных бактерий к воздействию антибиотиков в составе клеточной стенки отмечено в различных экспериментальных работах [22, 23]. Тем не менее, природу наблюдаемых различий в степени активности разных типов ЛПС и ЛПС-структур часто невозможно объяснить, не принимая во внимание пространственную организацию как отдельных молекул ЛПС, так и их агрегатов. Экспериментальное исследование трехмерной структуры ЛПС осложняется существенной неоднородностью их химической структуры, а также неопределенностью их конформаций, что особенно критично для дистальной полисахаридной части ЛПС, О-антигена, имеющего длину до сотен гексапиранозных остатков в случае патогенных штам-

мов [24]. Теоретическое решение задачи о пространственной укладке столь длинных цепей сродни решению задачи о фолдинге белка и сталкивается с аналогичными проблемами (парадокс Левинталя), но дополнительно осложнена тем, что никакой однозначно определенной конформации для цепочек О-антигена не существует. Более того, в реальных системах фолдинг цепей О-антигена всегда происходит при взаимодействии с другими молекулами и, тем самым, существенно зависит от окружения.

В отсутствие прямых экспериментальных данных, в последние годы начинают появляться работы, посвященные моделированию структуры ЛПС и ЛПС-содержащих систем методами молекулярной динамики (МД). Моделирование конформационной динамики ЛПС в мембранном окружении проводилась для нескольких моделей ЛПС-мембран *E. coli* [25–27]. В упомянутых моделях моделирование поведения О-антигена было проведено на минимальном, качественном уровне. Более подробные исследования конформационной подвижности О-антигенов были проведены при моделировании свободных фрагментов О-антигена в растворе [28–32]. В то же время, при моделировании ЛПС-содержащих систем, влияние выбора силового поля и начальных условий на результаты моделирования все еще требует детального исследования (раздел 1–3 главы 4). В перспективе, аккуратно верифицированные МД модели позволят пролить свет на молекулярные детали взаимодействия клеток грамотрицательных бактерий, а также фрагментов их клеточной стенки (раздел 6 главы 4), и агрегатов ЛПС (раздел 5 главы 4) с белками каскада свертывания, а также лучше понять различия в степени активности ЛПС различных штаммов.

Представленная работы имела две основные **цели**:

- получить аналитические оценки условий формирования тромба при попадании в кровь ЛПС;
- исследовать пространственную структуру ЛПС и ЛПС-содержащих систем методом молекулярной динамики.

Для достижения целей работы были поставлены следующие **задачи**:

- при помощи математических моделей оценить величину критического возмущения системы свертывания, оценить скорость роста тромба и критический размер повреждения, ведущий к закупорке сосуда;
- построить модель активации контактного пути каскада свертывания крови, учитывающей агрегатное состояние ЛПС;

- создать и валидировать полноатомные модели молекул ЛПС, их мицелл и фрагмента ЛПС мембраны;
- исследовать пространственную структуру свободных О-антигенных цепей в растворе, в составе мицелл и в мембранном окружении с использованием методов молекулярной динамики.

Научная новизна работы. В работе проведено теоретическое исследование модели основных реакций каскада свертывания крови и получены аналитические условия существования автоволновых решений и решений типа пульс, ранее сформулированные только для более простых систем. Получена аналитическая оценка скорости распространения автоволны концентрации тромбина, которую обычно оценивают по результатам вычислительного эксперимента или с использованием смешанного теоретического и вычислительного подходов. Впервые разработана математическая модель активации контактной системы на ЛПС агрегатах. Впервые проведен сравнительный анализ конформационного поведения МД модели длинной полисахаридной цепи О-антигена в растворе для разных силовых полей. Впервые построены модели ЛПС-мицелл, содержащих в своем составе углеводную часть. Впервые проведен сравнительный анализ конформационного поведения длинных цепей О-антигена в мембранном окружении для МД модели чистого ЛПС-бислоя и ЛПС-мембраны, содержащей в своем составе белок.

Теоретическая и практическая значимость работы. Аналитические условия сходимости решения реакционно-диффузионной модели каскада свертывания к автоволне имеют важное значение для понимания общих принципов пороговой активации системы свертывания крови. Математическое моделирование кинетики реакций контактной системы при ее активации ЛПС может пролить свет на некоторые механизмы ее функционирования в условиях грамотрицательного сепсиса. Разработка валидированных молекулярных моделей ЛПС, ЛПС-мембран и ЛПС-агрегатов необходима для анализа связи пространственной структуры ЛПС с их биологической активностью, а также для разработки специфических сорбентов.

Основными **методами** проведения диссертационного исследования являлась разработка и анализ математических моделей, описывающих разные стадии процесса свертывания крови, а также моделирование методами молекулярной динамики пространственного устройства ЛПС-содержащих систем.

Положения, выносимые на защиту:

- достаточным условием начала распространения автоволны тромбина в упрощенной модели каскада свертывания крови является превышение начальным возмущением решения стационарной системы типа пульс;
- в небольших сосудах (венулах) образование тромба, закупоривающего сосуд, возможно при размере повреждения, сравнимом с размером одного эндотелиоцита;
- немонотонная зависимость степени активации контактной системы в ответ на попадание ЛПС обусловлена агрегатным состоянием ЛПС в растворе;
- основным событием, ведущим к компактизации О-антигена *S. typhi-murium*, как в растворе, так и в мембранном окружении, является переход в *анти- ψ* состояние О-гликозидной связи между остатками маннозы и рамнозы;
- увеличение длины углеводной части ЛПС в составе ЛПС-агрегатов ведет к стабилизации их структуры за счет взаимодействия О-анти-генных цепочек;
- увеличение количества молекул в составе мицеллы ведет к снижению площади гидрофобной поверхности, экспонированной в раствор;
- трехмерная организация О-антигенного слоя на поверхности мембраны в МД расчетах существенно зависит от начального распределения цепей в плоскости мембраны;
- присутствие остатка арабинозы в составе липидной части ЛПС может существенно увеличивать равновесную проекционную площадь ЛПС в мембране.

Апробация работы. По теме диссертации автором опубликовано 6 статей в рецензируемых международных и российских изданиях, индоссимируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI:

1. T. Galochkina, D. Zlenko, A. Nesterenko, I. Kovalenko, M. Strakhovskaya, A. Averyanov, A. Rubin. Conformational dynamics of the single lipopoly-saccharide O-antigen in solution // Chemphyschem: a European journal of chemical physics and physical chemistry. — 2016. — Vol. 17, no. 18. — P. 2839–2853.
2. T. Galochkina, A. Bouchnita, P. Kurbatova, V. Volpert. Reaction-diffusion waves of blood coagulation // Mathematical Biosciences. — 2017. — Vol. 288. — P. 130–139.

3. A. Bouchnita, T. Galochkina, P. Kurbatova, et al. Conditions of microvessel occlusion for blood coagulation in flow // International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering. — 2017. — P. e2850.
4. A. Bouchnita, T. Galochkina, V. Volpert. Influence of antithrombin on the regimes of blood coagulation: Insights from the mathematical model // Acta Biotheoretica. — 2016. — Vol. 64, no. 4. — P. 327–342.
5. T. Galochkina, H. Ouzzane, A. Bouchnita, V. Volpert. Traveling wave solutions in the mathematical model of blood coagulation // Applicable Analysis. — 2016. — DOI: 10.1080/00036811.2016.1249863
6. Т. В. Галочкина, В. А. Вольперт. Математическое моделирование распространения тромбина в процессе свертывания крови // Компьютерные исследования и моделирование. — 2017. — Т. 9, № 3. — С. 469–486.

Результаты работы были представлены на 12-ти конференциях, в том числе 8-ми международных:

1. Т. Galochkina, A. Nesterenko, D. Zlenko. Conformational dynamics of bacterial O-antigens in solution and in membrane environment, 19th European carbohydrate symposium (EUROCARB 19). Барселона, Испания. 2017.
2. D. Zlenko, T. Galochkina, A. Nesterenko. TPP Project: development of molecular models of complex systems. Application to polysaccharides. 19th European carbohydrate symposium (EUROCARB 19). Барселона, Испания. 2017.
3. Д.В. Зленко, Т.В. Галочкина, И.Б. Коваленко, А.М. Нестеренко. Моделирование конформационной подвижности О-антигена *Salmonella typhimurium* в водном растворе. III Всероссийская конференция «Фундаментальная гликобиология». Владивосток, Россия. 2016.
4. Т.В. Галочкина, А.М. Нестеренко, И.Б. Коваленко, М.Г. Страховская, Д.В. Зленко. Моделирование конформационной подвижности О-антигенов на поверхности грамотрицательной бактерии. III Всероссийская конференция «Фундаментальная гликобиология». Владивосток, Россия. 2016.
5. Т. Galochkina, A. Bouchnita, V. Volpert. Reaction-diffusion waves in the model of blood coagulation 10th European Conference on Mathematical and Theoretical Biology. Ноттингем, Великобритания. 2016.

6. T. Galochkina, V. Volpert. Reaction-diffusion waves in mathematical model of blood coagulation. Experimental and computational biomedicine. Екатеринбург, Россия. 2016.
7. Т.В. Галочкина, Д.В. Зленко, И.Б. Коваленко, А.М. Нестеренко. Моделирование конформационной подвижности О-антигена липополисахарида грамотрицательной бактерии. Математика. Компьютер. Образование. Дубна, Россия. 2016.
8. T. Galochkina, D. Zlenko, I. Kovalenko, A. Nesterenko. Structural properties of the bacterial membrane O-antigen layer. Lyon SysBio. Виллербанн, Франция. 2015.
9. T. Galochkina, V. Volpert. Mathematical modeling of the thrombin wave propagation. Biomathematics workshop. Рабат, Марокко, 2015.
10. T.V. Galochkina, D.V. Zlenko, I.B. Kovalenko, A.M. Nesterenko. Structural properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. BIBE 2015. Белград, Сербия. 2015.
11. Д.В. Зленко, И.Б. Коваленко, А.М. Нестеренко, Т.В. Галочкина. Моделирование конформационной динамики О-антигена на поверхности грамотрицательной бактерии. V Съезд биофизиков России. Ростов-на-Дону, Россия. 2015.
12. I. Kovalenko, T. Galochkina, D. Zlenko, A. Nesterenko. Computer simulation of the bacterial lipopolysaccharide conformational dynamics. The 4-th IGER International symposium on science of molecular assembly and biomolecular systems. Нагоя, Япония. 2015.
13. A. Nesterenko, D. Zlenko, I. Kovalenko, T. Galochkina. Molecular dynamics model of lipopolysaccharide molecule. 7-th Russian-Japanese international workshop “Molecular simulation studies in material and biological sciences”. Москва, Россия. 2014.
14. Т.В. Галочкина, А.М. Нестеренко, И.Б. Коваленко, Д.В. Зленко. Построение модели молекулы липополисахарида. Математика. Компьютер. Образование. Дубна, Россия. 2014.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, 4 глав, содержащих обзор литературных данных, описание методов, использованных в исследовании, и изложение и обсуждение результатов, а также заключения, списка литературы и приложения. Работа изложена на 202 страницах и включает 10 таблиц и 48 иллюстраций. Список литературы включает 302 ссылки.

Глава 1

Обзор литературы

1 Система свертывания крови

Основой функцией системы свертывания крови является предотвращение кровотечения при нарушении целостности стенки сосуда. Помимо своей прямой задачи, переход плазмы крови в гелеобразное состояние также служит важным защитным механизмом, позволяющим иммобилизовать патогены, попадающие в кровяное русло. Активация системы свертывания при заражении грамотрицательной инфекцией ведет к образованию тромбов по всему организму, закупорке сосудов и отказу жизненно важных органов, тем самым являясь одной из основных причин смертности при заражении.

Основным событием, ведущим к образованию тромбов в кровеносных сосудах, является наработка фибрина из его предшественника фибриногена. Мономеры фибрина способны полимеризоваться, образуя нерастворимые волокна, захватывающие клетки крови и формирующие кровяной сгусток. Протеолитическое расщепление фибриногена, ведущее к образованию фибрина, происходит под действием специального фермента тромбина, концентрация которого определяет динамику формирования кровяного сгустка. Тромбин является сериновой протеазой и в нормальных условиях присутствует в плазме в форме своего неактивного предшественника — протромбина. Нарработка тромбина в ответ на возмущение системы свертывания происходит в результате цепи биохимических реакций превращения неактивных плазменных факторов (проферментов) в их активную форму (рис. 1.1) [33–35]. Основными участниками каскада свертывания являются сериновые протеазы, образующиеся из своих неактивных предшественников в результате гидролиза. Факторы X_a , IX_a и XI_a напрямую участвуют в реакциях активации протромбина, фактора X и фактора IX , соответственно [36]. Факторы V_a и $VIII_a$, в свою очередь, существенно ускоряют процесс протео-

В многочисленных экспериментальных работах, большая часть которых проведена группой проф. Атауллаханова и группой проф. Исмагилова, было показано, что распространение волны свертывания происходит в самоподдерживающемся режиме [38–47]. Основными методами определения положения фронта волны свертывания является оптическое обнаружение полимеризованного фибрина по светорассеянию и определение активности тромбина с помощью флуорогенного субстрата [39]. Наблюдаемые в эксперименте профили волны тромбина и фибрина имеют достаточно крутой фронт, тем самым подтверждая гипотезу о роли реакции в распространении тромбина, — при чисто диффузионном распространении фронт был бы существенно сглажен. Более того, форма профиля концентрации как тромбина, так и полимера фибрина остается практически неизменной во времени [44].

Автоволновая природа процесса свертывания крови также подтверждается при оценке скорости формирования сгустка. Спустя небольшое время с момента активации скорость распространения волны тромбина и запаздывающей по отношению к ней волны полимеризованного фибрина достигают постоянного значения [39, 41, 47]. Эта скорость не зависит от природы начального стимула [39–41] и определяется только свойствами самой плазмы, в частности, концентрациями факторов свертывания [39–44, 48]. Экспериментальные значения скорости распространения волны тромбина, составляет около 20 мкм/мин при 25 °С и примерно 41 мкм/мин при 37 °С [47]. Скорость распространения фронта полимеризованного фибрина в плазме здорового донора составляет примерно 35–50 мкм/мин при температуре 37 °С [40–44, 47, 48]. Как было отмечено ранее [9], такая скорость распространения волны дает скорость роста тромба примерно в 50 раз больше, чем могла бы наблюдаться при распространении тромбина только за счет пассивной диффузии.

Важную роль в процессе наработки тромбина играют тромбоциты, предоставляя поверхность для образования активных комплексов [FIXa, FVIIIa] и [FXa, FVa] [49, 50]. В то же время, при варьировании концентрации тромбоцитов в нормальном физиологическом диапазоне ($1.5 \cdot 10^5$ – $4 \cdot 10^5$ клеток/мкл) скорость распространения волны почти не отличается [39, 51], хотя полное удаление тромбоцитов из системы *in vitro* ведет к замедлению распространения волны свертывания в несколько раз. Этот эффект предположительно связан с тем, что даже очень небольшое количество тромбоцитов является достаточным для предоставления необходимой каталитической поверхности для обеспечения скорости образования тромбина, достаточной для распространения волны свертывания крови [9].

Уменьшение концентрации факторов свертывания в плазме крови, в свою очередь, может препятствовать формированию автоволны свертывания. В частности, в случае гемофилии А и В недостаток ключевых факторов каскада свертывания (FVIII и FIX) нарушает процесс

автокаталитической наработки тромбина и, как следствие, рост сгустка определяется скоростью диффузии реагентов, что ведет к существенному замедлению процесса и, видимо, объясняет развитие кровотечений у пациентов [41].

Менее очевидны последствия недостаточности FXI у пациентов с гемофилией С. Несмотря на то, что в нескольких исследованиях сообщалось о повышенном риске кровотечения у пациентов с пониженным уровнем FXI [52, 53] и о повышенном риске сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов с повышенным уровнем FXI [54, 55], корреляция между риском развития патологии и уровнем активности FXI невелика [52]. В отличие от петли обратной связи факторов VIII и V, чье действие в каскаде свертывания требует присутствия активированных факторов IXa и Xa, петля обратной связи FXI зависит только от наличия в системе тромбина. В экспериментах *in vitro* было показано, что при концентрации FXI ниже некоторого критического значения в системе не наблюдается образование автоволны свертывания [44, 48]. Этот эффект был объяснен тем, что низкая скорость ингибирования FXIa позволяет ему диффундировать на большие расстояния от места активации, что делает вклад FXIa принципиально необходимым для распространения волны тромбина на большом расстоянии от места повреждения [48]. Первичный ответ системы свертывания, при этом, почти полностью зависит от активации петли положительной обратной связи FV [56], что, по-видимому, объясняет более низкие риски кровотечений для пациентов, больных гемофилией С по сравнению с пациентами с гемофилией А или В.

1.2 Механизмы остановки роста тромба

Распространение волны тромбина в плазме крови регулируется несколькими механизмами, предотвращающими полный переход плазмы в гелеобразное состояние. В первую очередь, это два основных биохимических антикоагулянтных механизма [6]: путь антитромбина и путь активированного протеина С. Недостаток антитромбина или протеина С у людей приводят к повышенному риску тромбоза [57–59].

Антитромбин является ингибитором FXa, тромбина и FIIa, а также факторов внешнего пути ТФ и FVIIa (см. раздел 1.3), тем самым контролируя процесс формирования тромбина на начальном этапе активации системы свертывания [60–62]. Путь протеина С необходим для предотвращения роста тромба в область неповрежденных стенок сосуда. Он запускается, когда тромбин связывается с тромбомодулином (ТМ) на поверхности неповрежденных эндотелиальных клеток. Детали этого процесса подробно описаны в обзоре [63]. Тромбин-тромбомодулиновый комплекс активирует протеин С (образуя активированный протеин С,

АРС), причем процесс интенсифицируется, когда протеин С связан с рецептором белка эндотелиальных клеток (ЕРСR). Когда АРС диссоциирует от ЕРСR, он связывается с белком S и протеолитически инактивирует факторы Va и VIIIa. Без этих факторов FXa и FIXa не могут эффективно активировать тромбин и FX, соответственно. Поэтому инактивация кофакторов полностью останавливает дальнейшее распространение волны тромбина. В *in vitro* экспериментах было показано, что активация пути АРС путем добавления к плазме ТМ может остановить рост сгустка при определенных значениях концентраций факторов крови [44, 48].

Помимо ингибиторов факторов свертывания, важную роль в остановке роста тромба играет ток крови. В самом деле, самоподдерживающееся распространение волны свертывания крови может происходить только в условиях, когда вклад диффузии в процессы массопереноса превышает вклад конвекции [9, 46, 47, 64]. Таким образом, распространение автоволны тромбина, наблюдаемое *in vitro* [38–44, 46, 47, 65], скорее всего, имеет место в системах *in vivo* только в случае мелких сосудов с медленным кровотоком, а также в случае застоя крови [9]. Как было показано в экспериментах в искусственных капиллярах с иммобилизованным на внутренней поверхности тромбомодулином, значительное замедление распространения волны свертывания в неподвижной плазме за счет действия пути АРС возможно только в случае очень маленьких капилляров (отношение объема к поверхности ~ 5 мкм), в то время как в капиллярах более крупного размера (отношение объема к поверхности ~ 50 мкм), эффект оказывается незначительным [47]. Таким образом, уже для сосудов с диаметром более 0.2 мм для остановки роста тромба недостаточно только активации протеина С на интактном эндотелии, и существенную играют процессы механического переноса потоком [9, 47, 66].

1.3 Активация системы свертывания

Начальное количество тромбина может быть сформировано в результате двух типов событий: активации внешнего или внутреннего пути каскада свертывания [67, 68]. Внешний путь системы свертывания активируется при контакте белков плазмы крови с тканевым фактором (ТФ) — белком, экспрессируемым всеми клетками организма, кроме эндотелиальных и клеток крови, и потому отсутствующим в плазме при нормальных условиях. ТФ формирует активный комплекс с FVII, который, в свою очередь, активирует FX, который запускает процесс наработки тромбина. Наиболее частым событием, ведущим к попаданию ТФ в кровяное русло является обнажение субэндотелиальной ткани при механическом повреждении стенки сосуда. Таким образом, внешний путь играет ключевую роль в остановке кровотечения при нормальном гемостазе. Основным ингибитором внешнего пути является ингибитор пу-

ти тканевого фактора (TFPI), инактивирующий комплекс [FVIIa, TF] через формирование мембранного комплекса с FXa [69], а также антитромбин (см. раздел 1.2).

Все участники внутреннего (контактного) пути активации свертывания крови, в свою очередь, всегда присутствуют в крови. Активация внутреннего пути происходит при контакте фактора XII (фактора Хагемана) с чужеродной отрицательно заряженной поверхностью. Активация FXII на отрицательно заряженных поверхностях происходит за счет его конформационного изменения и может запускать процесс автокаталитической активации FXII через ограниченный протеолиз [70–72]. Связанный фактор XII активирует превращение прекалликреина (PK) в калликреин (Kr), а последний, в свою очередь, расщепляет FXII гораздо эффективнее, чем сам FXIIa [73]. Высокомолекулярный кининоген (HMWK), присутствующий в плазме, способствует связыванию PK и FXII с поверхностью [74] и, таким образом, играет роль кофактора в этой реакции, ускоряя дальнейшую активацию прекалликреина [74, 75]. Активированный FXII расщепляет FXI, тем самым запуская остальные реакции каскада свертывания [33, 76]. Предполагается, что роль контактного пути является критичной для процесса тромбообразования в патологических ситуациях, в то время как его влияние на нормальный гемостаз мало. Эти гипотезы были частично подтверждены нормальной выживаемостью и пониженным риском образования тромбов у мышей с выключенными генами FXII [77], и у мышей и приматов с выключением по гену прекалликреина [78].

1.4 Пороговое поведение системы свертывания крови: эксперимент и модели

Одним из важнейших свойств системы свертывания крови является ее триггерное поведение: переход из одного устойчивого состояния в другое в зависимости от величины возмущения и параметров системы. Известно, что процесс свертывания крови может быть условно разделен на несколько этапов, каждый из которых определяет динамику наработки тромбина в определенном пространственно-временном интервале [56, 79]. Так, имеются экспериментальные и модельные данные о том, что путь ТФ не вносит вклад в наработку тромбина на стадии распространения волны свертывания, однако определяет величину начального возмущения системы [80, 81]. При этом, самоподдерживающееся распространение волны в системе зависит только от динамики протекания основных реакций каскада свертывания при участии факторов IX, VIII, XI [40, 44]. Путь APC, в свою очередь, не влияет на начальную активацию системы свертывания и играет роль только на этапе остановки роста тромба [48]. Таким образом, именно величина возмущения на этапе первичной активации системы свертывания

определяет то, начнется ли распространение волны тромбина в пространстве, в то время как остановка распространения волны тромбина определяется только действием ингибирующих механизмов.

Важную роль в понимании триггерного поведения системы свертывания сыграло математическое моделирование [13]. Основным подходом в таких исследованиях является рассмотрение системы обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ) или реакционно-диффузионных уравнений для описания динамики основных реакций каскада свертывания. Уже первые модели реакций наработки тромбина, сформулированные в отсутствие представления о положительных обратных связях каскада свертывания [82], позволили воспроизвести характерную лавинообразную наработку тромбина на первичном этапе активации, необходимую для переключения системы свертывания [10]. Учет положительных обратных связей FV и FVIII в модели Ханина и Семенова позволил предположить существование порога активации в системе свертывания [83–85], тогда еще не обнаруженного экспериментально. Этот эффект был подробнее проанализирован в более поздних модельных работах, и было сделано предположение о вторичной роли петли положительной обратной связи FXI для начального запуска системы свертывания [86–88].

Более точное определение величины порога возбуждения, как и проверка непосредственной гипотезы о пороговом механизме, проводилась в ряде модельных и экспериментальных работ в течение следующих десятилетий. Одной из первых биохимических моделей, продемонстрировавшей схожую с экспериментально наблюдаемой кинетику, была модель реакций активации внешнего пути [89]. Математическая модель демонстрировала пороговое поведение, при этом порог был более чувствителен к скорости инактивации FXa и протромбиназы, чем к активации тромбина или активации протеина C. В экспериментальной работе [90] при исследовании чистой системы, состоящей из факторов IX, X, V, VIII, протромбина и фосфолипидов, было показано, что активатор внешнего пути определяет время запаздывания в кривой генерации тромбина, и, в то же время, почти не влияет на скорость распространения волны свертывания. Эти данные были воспроизведены при помощи кинетической модели [91], которая впоследствии была дополнена рассмотрением концентраций антитромбина III и TFPI в системе [92], и на сегодняшний день является одной из основополагающих кинетических моделей каскада свертывания. Первое экспериментальное доказательство существования порога возбуждения в системе свертывания было получено группой Манна, показавшей сильный нелинейный отклик генерации тромбина в восстановленной системе белков каскада свертывания при разных концентрациях ТФ [93, 94]. В экспериментах группы Атауллаханова был также найден порог по концентрации кальция для наработки тром-

бина [95, 96], а в исследовании по генерации тромбина в восстановленных системах было показано существование пороговой концентрации фосфолипидов [97]. Важным результатом было обнаружение пороговой реакции системы свертывания на концентрацию тромбоцитов, показанная для подробной модельной системы [98]. В другом модельном исследовании было показано, что порог активации представляет собой функцию скорости активации тромбоцитов [99].

Важным этапом в исследовании порогового поведения системы свертывания стало развитие моделирования пространственно неоднородных систем. Первые пространственно распределенные модели генерации тромбина в условиях потока были независимо разработаны двумя группами [100, 101]. В работе [100] было предсказано существование трех областей параметров, соответствующих трем различным режимам производства тромбина и было сделано предположение, что разница между артериальными и венозными тромбами обусловлена тем, что они соответствуют разным областям параметрического пространства модели. В работе [102], позже получившей экспериментальное подтверждение в системе контактной активации [103], было показано, что порог активации в системе протеолитической обратной связи возрастает с увеличением скорости потока и уменьшается с увеличением размера зоны активации. В то же время появляется первая феноменологическая модель образования сгустка в пространственно неоднородной системе реакции-диффузии [37], позже использованная в уточненной форме для изучения условий тромбообразования в потоке [64, 104, 105] в двумерном приближении. В этих работах было показано, что скорость потока крови влияет не только на скорость генерации и порог образования тромбина, но также может приводить к образованию множественных тромбов [13].

Группой Атауллаханова была также предложена модель свертывания крови в неподвижной плазме при активации по внутреннему пути [106, 107], предсказавшая роль активации FXI в распространении волны свертывания, позже подтвержденную экспериментально [40]. На основе модели [106, 107] была разработана упрощенная модель [108], изучение нелинейной динамики которой показало возможность потенциального существования сложных динамических режимов в системе свертывания [109–111]. Также упрощенная модель [108] была использована для анализа роли потока и пути APC в ингибировании роста тромба в двумерном приближении [112]. Было показано, что в небольших сосудах тромбомодулин может прекращать распространение волны тромбина в отсутствие потока, в то время как для сосудов большего диаметра остановка роста тромба происходит только при больших скоростях потока. Исследование по моделированию полного каскада свертывания с использованием приближения тонкого слоя с равномерным перемешиванием вблизи места повреждения по-

казало, что концентрация производимого тромбина уменьшается с увеличением скорости потока [98, 113]. В работах [114, 115] проанализирована роль процессов реакции-диффузии в образовании и лизисе тромба, при использовании квазиодномерного приближения в цилиндрическом сосуде.

В конце 2000-х годов начинают появляться первые экспериментальные количественные оценки порога возбуждения системы свертывания. Первая статья, непосредственно демонстрирующая порог активации, — это исследование группы Исмагилова [45], в котором критический размер покрытого ТФ участка, необходимый для начала свертывания в плазме при фиксированной плотности ТФ был оценен в 100 мкм в диаметре при плотности ТФ порядка 0.5 пМ/м^2 . Через год в лаборатории Даймонда были проведены опыты по активации цельной крови микрочипами ТФ размером около 175 микрон различной плотности. Пороговая плотность ТФ, необходимая для активации системы свертывания, в этих экспериментах составила от 4 до 10 молекул ТФ на мкм^2 в зависимости от скорости потока [116]. Наконец, в экспериментах на плазме с нивелированной активацией контактного пути была получена однородная пороговая концентрация ТФ, оказавшаяся равной 0.01 пМ [56]. Одновременно в этой работе теоретически и экспериментально было показано, что как пороговый ответ на возбуждение, так и лавинообразная динамика образования фибрина сильно зависят от активации FV и не зависят от FVIII или FXI. Позже эти исследования были расширены и пороговые значения концентрации ТФ были изучены в экспериментах по активации плазмы чипами, несущими ТФ [117].

Роль потока в пороговой активации системы свертывания обширно исследовалась в современных экспериментальных и компьютерных моделях. Поскольку поток может удалять активированные факторы из места их производства, разбавление потоком может действовать как сильный ингибитор коагуляции [10]. Экспериментально было показано, что скорость потока обеспечивает порог для каскада свертывания [47, 118], удаляя активированные факторы и предотвращая начало свертывания и распространение волны тромбина в пространстве. Модельные исследования показали, что активация свертывания в присутствии потока контролируется удалением фактора VIIa, так как активация им FX необходима для дальнейшей активации каскада [118, 119]. Подробное исследование различных режимов образования тромба в стенозированных сосудах в зависимости от интенсивности кровотока и геометрии системы было проведено в работе Рухленко [120]. Также существенный вклад в описании роли потока и размера зоны повреждения на динамику образования сгустка оказали модельные расчеты по образованию тромбоцитарных тромбов [121–124]. В совокупности, перечисленные работы подтверждают пороговую природу системы образования тромбов, и

позволяют оценить значения параметров системы при переходе от режима частичной закупорки сосуда к режиму образования тромба, перекрывающему ток крови.

Таким образом, существуют большой объем данных *in vitro* и *in silico*, подтверждающих триггерную природу функционирования системы свертывания крови: пороги ее активации в зависимости от размера активирующего участка, концентрации или плотности активатора были оценены в экспериментах на плазме и цельной крови, в системах с и без потока, и при различных типах активации (внешнего или внутреннего пути) [10]. Тем не менее, теоретические аспекты переключения между режимами инициации и распространения волны тромбина изучены слабо. Распространение тромбина в плазме крови, чаще всего, описывается с помощью автоволновых решений в системе уравнений в частных производных на концентрации активированных факторов крови [43, 108, 125]. В случае феноменологических моделей, состоящих из одного уравнения, анализ существования автоволновых решений сводится к определению количества и устойчивости особых точек точечной системы. В то же время, для систем большей размерности, описывающих каскад реакций более подробно, строгое доказательство существования таких решений может быть относительно просто проведено только для определенного класса моделей. В разделе 1 главы 3 мы приводим доказательство существования и устойчивости автоволновых решений в реакционно-диффузионной модели распространения тромбина в плазме крови, полученной из модели [107]. Являясь монотонной, эта модель позволяет нам также сформулировать аналитическое условие начала распространения волны тромбина в ответ на возбуждение. Как это было недавно показано в работах [126] и [127] для систем из двух уравнений, критическое значение начального условия в модели каскада реакций наработки тромбина определяется стационарным решением типа пульс. В разделе 1 главы 3 мы проводим доказательство существования таких решений в нашей модели.

1.5 Активация системы свертывания при сепсисе

В то время как в нормальных условиях антикоагулянтные механизмы обеспечивают мощную защиту от тромбозов, воспалительные процессы смещают гемостатическое равновесие в сторону активации системы свертывания, что может вести к развитию диссеминированного внутрисосудистого тромбоза. Детали механизма развития коагуляционных патологий в ответ на попадание в кровь грамотрицательной инфекции до сих пор изучены слабо. Известно, что ЛПС могут повышать реактивность тромбоцитов, а также активируют плазменную систему свертывания крови — через внешний и внутренний пути.

1.5.1 Внешний путь

Активация ЛПС внешнего пути свертывания крови показана в многочисленных экспериментах. При эндотоксмии человека в цельной крови обнаруживается повышенный уровень мРНК ТФ [128, 129], и повышенный уровень экспрессируемого клетками ТФ [130]. Еще одним убедительным доказательством роли внешнего пути в развитии коагулопатии при сепсисе является тот факт, что его ингибирование с использованием анти-ТФ-антител [131–133], инаktivация FVIIa [134], использование TFPI [135] или генетически пониженный уровень ТФ [136] или FVII [137] ослабляют коагулопатию и улучшают выживаемость на животных моделях эндотоксемии и сепсиса. Попадание ТФ в кровь происходит за счет повреждения эндотелия сосудов, а также взаимодействия ЛПС с моноцитами и нейтрофилами (см. раздел 2.2 для описания механизма). Повышенная внутриклеточная и поверхностная экспрессия ТФ на циркулирующих моноцитах была обнаружена в экспериментах по стимуляции ЛПС *ex vivo* [138] и *in vitro* [139–143]. Роль эндотелия в развитии тромбоза при сепсисе подробно проанализирована в обзоре [144]. В различных экспериментальных исследованиях было показано как активация экспрессии ТФ на эндотелиальных клетках [145, 146], так и запуск апоптоза эндотелиоцитов [147, 148] при взаимодействии с ЛПС.

Моделированию образования тромба на поврежденном участке эндотелия посвящен раздел разделе 2 главы 3 представленной работы. Мы рассматриваем упрощенную математическую модель активации плазменного звена системы свертывания в небольших сосудах в ответ на экспрессию ТФ на ограниченном участке сосуда и исследуем влияние различных факторов на режимы тромбообразования. В частности, мы рассматриваем режим полной и частичной закупорки сосуда и переход между ними в зависимости от концентрации ингибитора в системе, скорости потока, а также размера зоны повреждения.

1.5.2 Роль микровезикул

Большую роль в развитии коагулопатии при сепсисе также играют микровезикулы [7]. Микровезикулы представляют собой мембранные везикулы (от 0.1 до 1 мкм в диаметре), высвобождаемые из моноцитов и тромбоцитов при их активации или апоптозе. Гемостатическая и/или тромботическая функция микровезикул связана с наличием фосфатидилсерина в составе их наружной мембраны, а также наличием ТФ, в некоторых случаях [149]. В то время как фосфатидилсерин предоставляет поверхность для мембранно-зависимых реакций каскада свертывания и тем самым способствует генерации тромбина [150], ТФ, экспрессируемый на микровезикулах, может способствовать патологическому тромбообразованию через акти-

вацию внешнего пути, как было показано на моделях *in vivo* [151]. При эндотоксемии количество циркулирующих микровезикул увеличивается [130, 152], что может усиливать процесс свертывания крови. Тем не менее, результаты недавнего экспериментального исследования *in vitro* предполагают, что основной механизм активации системы свертывания микровезикулами — это активация контактного пути [7]. Математическая модель активации контактного пути на микровезикулах [153] может также объяснить наблюдаемый эффект гиперкоагуляции плазмы при разбавлении в тестах *in vitro* [154].

1.5.3 Внутренний путь

ДеЛа Кадена и его коллеги обнаружили активацию контактного пути в человеческой модели эндотоксемии, показав снижение функциональной активности FXI, снижение активности прекалликреина и увеличение уровня комплекса α_2 -макроглобулин-калликреина после введения эндотоксина [155]. Аналогичные результаты были получены при добавлении эндотоксина в цельную кровь *ex vivo*, при этом степень активации зависела от дозы и времени инкубации [156]. Модели эндотоксемии у животных также свидетельствуют об активации контактного пути, сопровождающимся уменьшением уровня FXII у кроликов [157], а также уровнем РК и НМWK у собак [158]. В то же время, в других исследованиях доказательств активации контактного пути не было получено [159, 160].

Условия активации контактного пути и типы активирующих поверхностей представляют большой интерес для лечения патологических состояний. В сепсисе контактный путь действует как защитная система, участвующая в механизме элиминации бактерий [161]. Механизм активации контактного пути бактериями остается неясным [16] и может быть связан с взаимодействием FXII с белками особого типа, присутствующими на поверхности некоторых бактерий (*curl* и *fimbriae*) [162]. В то же время, известно, что эндотоксические компоненты наружной мембраны грамотрицательных бактерий, высвобождаемые в кровоток при разрушении клеточной стенки, способствуют развитию диссеминированного тромбоза. Поскольку молекулы ЛПС имеют сильный отрицательный заряд, они могут активировать FXII, тем самым способствуя развитию ДВС-синдрома через контактный путь.

Активация FXII очищенным ЛПС была продемонстрирована *in vitro* в смеси очищенного FXII и РК [17], а также в смеси очищенного FXII, прекалликреина и НМWK [18]. В разделе 3 главы 3 представленной диссертации мы моделируем кинетику соответствующих реакций активации контактного пути на агрегатах ЛПС и выполняем подбор параметров в соответствии с имеющимися экспериментальными данными. Наши модели разработаны на

основе математической модели активации FXII на циркулирующих микровезикулах [153]. Мы демонстрируем, что экспериментальные данные могут быть воспроизведены только при предположении, что ЛПС образуют агрегаты и активация FXII протекает на их поверхности.

2 Клеточная стенка грамотрицательных бактерий: липополисахариды

Классификация бактерий как грамотрицательные и грамположительные определяется их реакцией на окраску по Граму, различия в которой обусловлены особенностями архитектуры клеточных стенок этих организмов. И грамположительные, и грамотрицательные бактерии обладают цитоплазматической мембраной, состоящей из фосфолипидного бислоя, которая окружает цитозоль и обеспечивает полупроницаемый барьер, регулирующий движение молекул в клетку и из клетки. Цитоплазматическая мембрана окружена жестким слоем пептидогликана (муреина), придающего форму бактериальной клетке, а также обеспечивающего устойчивость к осмотическому лизису. Пептидогликан представляет собой полимерную сетку, образованную углеводными цепями N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмураминовой кислоты, поперечно сшитых друг с другом короткими пентапептидами. В грамположительных бактериях слой пептидогликана достаточно толстый и рыхлый и составляет внешнюю часть стенки клетки. В грамотрицательных бактериях слой пептидогликана существенно тоньше и плотнее, а так же дополнительно окружен внешней мембраной (рис. 1.2). Внешняя мембрана представляет собой уникальный асимметричный липидный бислой, пронизанный молекулами различных белков. Внутренний монослой мембраны состоит из фосфолипидов (в основном фосфатидилглицерола и этаноламина), содержащих более десяти различных жирных кислот [163]. Основным компонентом наружного монослоя являются липополисахариды (ЛПС), которые покрывают до 75% поверхности клетки [164, 165]. В состав внешней мембраны также входят интегральные мембранные белки, такие как различные каналы и порины (outer membrane protein, OmpA), которые служат каналами для прохождения малых гидрофильных молекул и липопротеинов [166, 167]. OmpA играет важную роль в закреплении наружной мембраны на стенке бактериальной клетки: его С-концевой периплазматический домен нековалентно связывается со слоем пептидогликана [168]. Дополнительное закрепление наружной мембраны обеспечивается за счет ковалентного связывания со слоем муреина специальных липопротеинов, входящих в состав ее внутреннего монослоя (рис. 1.2).

ЛПС необходимы для выживания грамотрицательных бактерий, поскольку именно они

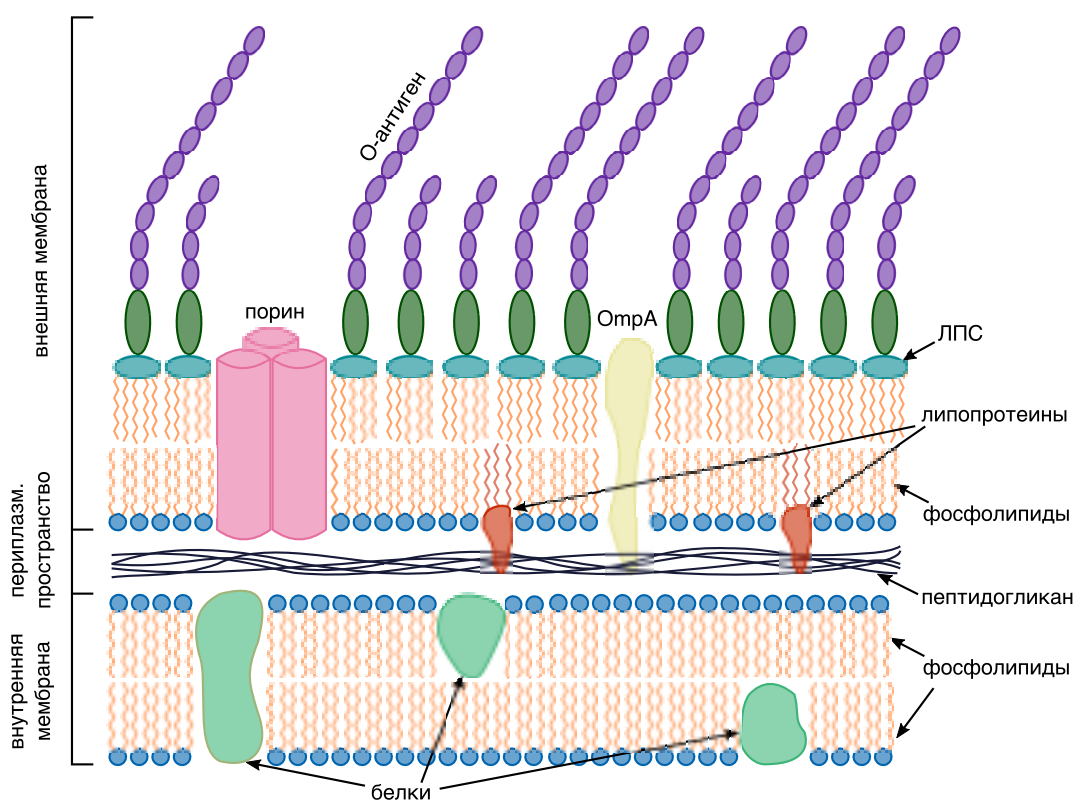


Рис. 1.2: Устройство клеточной стенки грамотрицательной бактерии.

обеспечивают правильную сборку наружной мембраны. ЛПС — это амфифильные макромолекулы, которые образуют специфичный полупроницаемый барьер для различных классов молекул, включая детергенты, антибиотики и токсичные красители или металлы. Барьерные свойства наружной мембраны обусловлены ее низкой текучестью, достигаемой за счет высокой степени упорядоченности структуры и большой молекулярной массы ЛПС-монослоя. Именно молекулы ЛПС, расположенные на поверхности клетки, взаимодействуют с другими биологическими системами, участвуя в таких взаимодействиях бактерии с клетками хозяина, как адгезия, колонизация, вирулентность, и симбиоз. ЛПС, также называемый эндотоксином, является мощным стимулятором врожденных иммунных реакций и играет ключевую роль в патогенезе грамотрицательных инфекций у растений и животных [169].

2.1 Структура ЛПС

В большинстве бактерий ЛПС имеет стандартную общую структуру, включающую в себя три домена: гидрофобный фрагмент, называемый липидом А, гидрофильный гликан, называемый О-специфическим полисахаридом (также известный как О-антиген) и связывающий их друг с другом центральный или коровый олигосахарид. Углеводная цепь экспонирована на поверхности клетки, в то время как липид А участвует в формировании гидрофобно-

го бислоя наружной мембраны и, таким образом, заякоривает молекулы ЛПС [167, 170]. В силу особенностей структуры поверхности клеток, различимой под электронным микроскопом, штаммы бактерий, экспрессирующие полноразмерные молекулы ЛПС, содержащая все три домена, получили название “гладких” (“smooth”, S-LPS), тогда как штаммы не имеющие О-антигенной цепи и/или частей центрального олигосахарида были названы “грубыми” (“rough”, R-LPS).

2.1.1 Липид А

Практически все иммуногенные свойства молекулы ЛПС связаны с присутствием в ее структуре липида А [166, 170, 171]. Липид А действует как мощный стимулятор врожденной иммунной системы, так как он непосредственно связывается с Толл-подобным рецептором TLR4 [172, 173], что вызывает широкий спектр биологических эффектов, от повышения уровня устойчивости к инфекции до неконтролируемого и массивного иммунного ответа, приводящего к сепсису и септическому шоку. Биоактивность липида А, включая способность взаимодействовать и активировать рецепторы иммунной системы, сильно зависит от его химической структуры.

В большинстве изученных на сегодняшний день бактерий основой липида А является дисахарид N-ацетил-D-глюкозамина (GlcNAc I и II), каждый из моносахаридов которого фосфорилирован и ацилирован двумя 3-гидроксигирными кислотами в положениях 2 и 3 через амидные и сложноэфирные связи. Первичные ацильные цепи (общим числом четыре штуки), непосредственно связанные с углеводной основой, могут быть ацилированы вторичными ацильными цепями по гидроксигруппе. Один или оба остатка GlcNAc могут быть также заменены остатками 2,3-диамино-2,3-дидезокси-D-глюкопиранозы (GlcN3N). Фосфатные группы могут быть замещены другими полярными группами или же одна из фосфатных групп может отсутствовать [174]. Таким образом, хотя липид А и является наиболее консервативной частью молекулы ЛПС, структура его весьма вариабельна, так как количество фосфатных групп и их заместителей, а также количество и длина ацильных цепей может различаться [165].

2.1.2 Центральный олигосахарид

Центральный олигосахарид (кор) может быть условно разделен на две части: проксимальную — внутреннее ядро, и дистальную, расположенную ближе к О-антигену — внешнее ядро. Внутреннее ядро содержит, по меньшей мере, один остаток 3-дезокси-D-манно-

окт-2-улозоновой кислоты (Kdo) и несколько остатков L-глицеро-D-манно-гептозы (L,D-Нер) [166, 175, 176]. Kdo редко встречается в других углеводах и поэтому может рассматриваться как маркер присутствия ЛПС. Внутренне ядро часто содержит и иные заместители, обычно присутствующие в нестехиометрических количествах: фосфаты, дифосфат, 2-аминоэтилфосфат или 2-аминоэтилдифосфат, уроновые кислоты (D-GalA) и различные модифицированные остатки, такие как, например, 4-амино-4-дезоксид-L-арабиноза (L-Ara4N). Внешнее ядро демонстрирует большее структурное разнообразие, чем внутреннее ядро. Подробный обзор его различных структур представлен в [174]. Наиболее часто встречающимися углеводами внешнего ядра являются D-глюкоза, D-галактоза и N-ацетил-D-глюкозамин [173].

За счет электростатических взаимодействий анионные группы, присутствующие в составе центрального олигосахарида и липида А, связываются с двухвалентными катионами (Mg^{2+} и Ca^{2+}), тем самым сшивая молекулы ЛПС друг с другом. Этот эффект существенно увеличивает устойчивость внешней мембраны и снижает ее проницаемость, тем самым усиливая ее барьерные свойства [164, 177, 178]. В то же время, отрицательно заряженные группы часто являются мишенью для антимикробных катионных пептидов. При этом, присутствие остатков 4-амино-4-дезоксид-L-арабинозы (Ara4N) в составе липида А ЛПС многих бактерий может экранировать отрицательный заряд ЛПС и повышать устойчивость бактерии к воздействию антимикробных препаратов.

2.1.3 О-антиген

О-антиген является самым внешним гидрофильным доменом молекулы ЛПС, который обязан своим названием способности индуцировать адаптивный иммунный ответ. По своей химической структуре О-антиген представляет собой полисахарид, содержащий до 50 олигосахаридных повторяющихся звеньев (repeating units, RU), каждый фрагмент состоит из двух-восьми гексозных или пентозных остатков и может быть линейным, либо разветвленным [173, 174, 179]. Химический состав О-антигена и его длина являются биологическими маркерами вирулентности [24, 173], и их различия являются определяющим фактором при бактериальной серологической типизации [174, 180]. В “гладких” бактериальных штаммах гетерогенный слой О-антигенов предоставляет дополнительную защиту от комплемента и антител хозяина и значительно влияет на способность бактерий адаптироваться к окружающей среде [24, 181, 182]. Возможный защитный механизм, обеспечиваемый слоем О-антигена, был предложен по результатам анализа адгезии клеток *E. coli* на кварцевую поверхность. Была выдвинута гипотеза о том, что О-антигены вносят вклад в устойчивость мембраны

путем экранирования отрицательно заряженных частей центрального олигосахарида и липида А [183].

Распределение длин О-антигенов в реальных мембранах обычно имеет три пика, соответствующие коротким (< 4 RU), длинным ($10\text{--}40$ RU) и очень длинным ($> 90\text{--}100$ RU) цепям, что влияет на бактериальную устойчивость к атаке комплемента и поглощению макрофагами [24, 181]. Бактерии штаммов *Salmonella typhimurium* с очень большими модальными длинами О-антигенов (> 100 RU) полностью устойчивы к поеданию макрофагами. Клетки с короткими О-антигенами, состоящими из $2\text{--}4$ RU, очень чувствительны к воздействию комплемента, тогда как ЛПС с > 10 RU устойчивы к действию системы комплемента. Было установлено, что минимальная длина О-антигена, обеспечивающая защиту от атаки комплемента, составляет от 4 до 15 повторяющихся звеньев [24].

Разнообразие химического состава повторяющихся звеньев, а также структуры и длины О-антигенов делают их наиболее вариабельной частью ЛПС. Основными экспериментальными подходами, используемыми для определения первичной структуры О-антигенов служат методы гидролиза и различные виды хроматографии с последующей масс-спектрометрией [184]. На сегодняшний день химический состав О-антигенов достаточно хорошо охарактеризован и подробно описан в [174].

2.2 Влияние структуры ЛПС на биологическую активность

Развитие сепсиса в ответ на попадание в кровь ЛПС напрямую связано с их взаимодействием с клетками хозяина: клетками эндотелия, моноцитами, нейтрофилами, и макрофагами. Клеточная активация ведет к повышенному уровню экспрессии воспалительных цитокинов всеми перечисленными типами клеток, а также к экспрессии ТФ на моноцитах и эндотелии [2], и возможно, запуску апоптоза эндотелиальных клеток [144]. Такая воспалительная реакция в совокупности с активацией системы комплемента и повышением уровня микровезикул ведет к усиленной активации системы свертывания и диссеминированному внутрисосудистому тромбозу.

Распознавание клеточной поверхностью ЛПС как в случае клеток эндотелия [185], так и лейкоцитами [186], осуществляется при взаимодействии ЛПС с комплексом Толл-подобного рецептора 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) и белка MD-2 [187, 188]. Распознавание ЛПС происходит после его связывания с ЛПС-связывающим белком (LPS-binding protein, LBP). LBP переносит ЛПС на мембранный белок CD14 [189], который связывается к комплексом LPS-LBP и облегчает перенос ЛПС на белок MD-2, который, в свою очередь, связан с внеклеточным

доменом TLR4 [190]. Связывание с ЛПС способствует димеризации мембранного комплекса TLR4/MD-2, что запускает сигнальные пути, активирующие экспрессию цитокинов [2].

Взаимодействие ЛПС с комплексом TLR4/MD-2 существенно зависит от надмолекулярной структуры ЛПС. Из-за их амфифильной природы молекулы ЛПС имеют тенденцию образовывать агрегаты, биологическая активность которых может во многом превышать активность отдельных молекул ЛПС [19, 191]. Существует гипотеза, согласно которой мономеры ЛПС ответственны за активацию комплекса TLR4/MD-2 через связывание с мембранным рецептором CD14, а агрегаты ЛПС могут активировать комплекс без взаимодействия с CD14 [21, 192]. Это предположение косвенно подтверждается тем фактом, что при низких концентрациях ЛПС CD14 оказывается необходим для активации экспрессии цитокинов макрофагами, в то время как при высоких концентрациях их активация от CD14 не зависит [193, 194].

Принципиальную роль в образовании агрегатов и степени биологической активности ЛПС играет липид А, который отвечает за связывание ЛПС с рецепторами и, тем самым, обеспечивает эндотоксическую активность ЛПС [22, 195–199]. Определяющими факторами уровня агонистической или антагонистической активности липида А является плотность отрицательного заряда на полярных головках, а также угол наклона дисахаридной основы и общая форма молекулы. Наклон гликозидной связи относительно гидрофобной области определяет то, насколько аномерный фосфат на GlcN I экспонирован за пределы поверхности наружной мембраны. В совокупности с величиной заряда на полярной головке, структура гидрофильной основы липида А определяет специфичность его связывания с целевыми рецепторами [174]. В то же время гидрофобная область в значительной степени определяет последующую активацию иммунного ответа [192]. Только виды, чья первичная структура ЛПС придает коническую форму молекуле, являются эндотоксически активными [200]. Гидрофобная часть липида А, в этом случае, имеет большое поперечное сечение и может взаимодействовать с сайтами гидрофобного связывания комплекса TLR4/MD-2, активируя трансмембранную сигнализацию. Виды с липидом А цилиндрической формы не способны индуцировать соответствующее механическое напряжение для активации рецепторов [200]. Различия в пространственной структуре липида А также существенно сказываются на структуре и активности образуемых агрегатов. Только молекулы ЛПС, образующие неламеллярные (кубические или гексагональные) агрегаты, являются биологически активными [197–199, 201].

Полисахаридная составляющая ЛПС также оказывает существенное влияние на форму, структуру и активность надмолекулярных ЛПС-структур. В частности, было показано, что ЛПС с длинной углеводной цепью гораздо сильнее активируют рецептор CD14, чем ЛПС с

короткой цепью, которые, в свою очередь, чаще запускают CD14-независимую активацию TLR4/MD-2 [194]. Кристаллографические исследования показали, что богатые лейцином фрагменты CD14 формируют подковообразную структуру с глубоким гидрофобным карманом, куда попадает часть липида А, в то время как полисахаридная часть молекулы ЛПС взаимодействует с некоторыми областями на краю этого кармана [202]. Недавние комплексные исследования структуры О-антигенов *Shigella flexneri* 3a также подчеркнули важность подробного описания деталей трехмерной структуры бактериальных О-антигенов для понимания деталей их взаимодействия с моноклональными антителами [203].

О-антиген также во многом определяет структуру образуемых ЛПС агрегатов. В исследованиях микроструктуры липосом, образованных ЛПС из *Burkholderia* и *Agrobacterium*, было показано, что толщина гидрофобной части бислоев и локальное упорядочение ацильных цепей определяются не только структурой липида А, но и, косвенно, объемом полисахаридной части [204]. В то время как короткие R-LPS склонны образовывать сферические мицеллы, вытянутая структура S-LPS приводит к увеличению кривизны агрегатной поверхности, что ведет к образованию мицеллярных агрегатов в форме трубочек [204]. Агрегаты в форме трубочек были также получены для S-LPS в исследовании воздействия антимикробных пептидов на ЛПС-агрегаты различной структуры. В этих исследованиях было показано, что присутствие О-антигенов в составе ЛПС сильно увеличивает их устойчивость к воздействию различных детергентов, по-видимому, за счет стабилизации их структуры взаимодействующими полисахаридными цепями [20].

Присутствие О-антигена в составе ЛПС также существенно влияет на способность ЛПС активировать контактную систему свертывания. В экспериментах в чистой системе было показано, что именно липидная часть ЛПС ответственна за активацию РК, в то время как полисахарид О-антигена не вызывает ответ системы [18]. Более того, одинаковые концентрации ЛПС различных штаммов одного вида бактерий вызывают различную степень активации РК [18]. Так как структура липида А для использованных штаммов неизменна, то различия в степени активации белков должны быть связаны с различиями в структуре агрегатов, и в частности, в степени экранирования липидной части ЛПС О-антигенами различного состава [18].

Важную роль играет и пространственная укладка О-антигенных цепей на поверхности бактерии в составе наружной мембраны. Описание деталей архитектуры О-антигенного слоя на молекулярном уровне может дать представление о том, как бактерии сопротивляются атакам антител и увеличивают резистентность к антибиотикам, а также объяснить разницу в проницаемости наружной мембраны для бактерий одного вида из разных серологических

групп [205, 206]. Одним из наиболее ярких примеров влияния укладки О-антигенов на вирулентность бактерии является исследование бактерий *Sh. flexneri* серотипа 5а [207, 208]. Методом электронной микроскопии было показано, что добавление одного бокового остатка глюкозы к неразветвленной цепи О-антигена этого штамма приводит к компактизации О-антигенного слоя и обнажению белковой иглы комплекса проникновения (TTSS), что увеличивает инвазивность бактерий [208]. Объяснение этого механизма было предложено на основании восстановленных трехмерных структур участков О-антигена по данным ЯМР [29]. Было предположено, что глюкозилирование О-антигена ЛПС серотипа 5а индуцирует переход от линейной к спиральной конформации с остатком глюкозы, выступающим наружу спирали, образующей более компактную структуру, чем неглюкозилированный ЛПС [209]. Такая трансформация сокращает расстояние от конца О-антигенной цепи до плоскости мембраны примерно в два раза.

Ацетилирование цепей О-антигена, в свою очередь, может влиять на способность бактериальной клетки противостоять атаке бактериофагов [210]. Было сделано предположение, что О-ацетильные группы могут усиливать боковые взаимодействия между соседними цепями О-антигенов на поверхности клетки, создавая физический барьер, который может быть преодолен фагами только при помощи специализированных белков, способных связывать этот специфический тип О-антигена. Тем самым, ацетилирование О-антигена играет двойственную роль, с одной стороны, обеспечивая специфическое распознавание некоторыми бактериофагами, а с другой — обеспечивая защиту клеток-хозяев от атаки другими фагами [210].

Таким образом, пространственная структура ЛПС оказывает существенное влияние как на степень биологической активности отдельных молекул и их агрегатов, так и на иммуногенность и вирулентность бактерий, содержащих их в составе своей клеточной стенки.

2.3 Пространственная структура ЛПС: эксперимент и модели

В то время как общий химический состав ЛПС хорошо охарактеризован, на сегодняшний день нет точных экспериментальных данных, описывающих пространственную организацию внешней мембраны, и прежде всего, укладки О-антигенных цепей на поверхности клетки. Надежные данные о геометрических параметрах таких систем могли бы быть получены методами рентгеновской дифракции, но крайняя неоднородность структуры не позволяет использовать этот подход. К сожалению, только R-мутанты (Rc- или Re-LPS) в устойчивой ламеллярной фазе были исследованы методами рентгеновской дифракции [211], поэтому прямые экспериментальные данные дают представление об устройстве только внутренней части

ЛПС-мембраны. Все оценки параметров внешнего слоя для мембран гладких штаммов являются косвенными (например, данные электронной микроскопии [212]). На изображениях, полученных с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) для одиночных клеток *E. coli*, видно, что поверхность клеточной стенки сильно гетерогенна [213]. Оба типа проекций — вертикальные и латеральные — имеют очень неоднородную структуру с заметными выступами и углублениями между ними. Однако эти результаты не дают никакой прямой информации о молекулярной организации О-антигенного слоя, и любая дальнейшая интерпретация значительно затруднена из-за вариабельности О-антигенов и неравномерного распределения длин цепей, присутствующих даже в одной бактериальной клетке [174, 182]. В отсутствие детального описания структуры ЛПС-содержащих систем все большую популярность принимают методы молекулярного моделирования.

Взаимодействие атомов в механистической модели молекулы описывается с помощью потенциалов валентных и невалентных взаимодействий, параметры которых определяются эмпирически. Самосогласованный набор силовых параметров межатомных взаимодействий называется силовым полем и его выбор может существенно влиять на результаты моделирования. Валидация параметров силовых полей, чаще всего, производится для небольших молекул достаточно простой химической структуры. В то же время, создание корректных моделей молекул ЛПС существенно осложняется гетерогенностью их структуры: помимо одновременного наличия липидной и полисахаридной части, в состав ЛПС входит большое количество замещенных остатков. Таким образом, основная часть исследований по моделированию ЛПС-мембран рассматривает существенно упрощенные системы с использованием существующих силовых полей, дополненных недостающими параметрами. Так, влияние температуры, природы катионов и числа цепочек на физико-химические свойства бислоев липида А изучалось в МД моделях в силовых полях GROMOS, GLYCAM и AMBER [214–217]. Наиболее обширные исследования по МД моделированию R-LPS бислоев были проведены с использованием силового поля CHARMM в работе [218]: были рассмотрены 21 различных тип липидов А из 12 различных видов бактерий, отличающихся количеством ацильных цепей и их длиной. Молекулярные модели позволили количественно оценить эффект увеличения площади, занимаемой липидом А в плоскости мембраны, при увеличении количества ацильных цепей, а также увеличение толщины гидрофобного бислоя для длинных ацильных цепей. Расчеты производились для растворов с использованием разных противоионов: Ca^{2+} , K^{+} и Na^{+} . Несмотря на то, что различия в стабилизации структуры мембраны были небольшими для разных ионов, время нахождения Ca^{2+} вблизи головных групп липида А было больше, чем у ионов K^{+} и Na^{+} , что хорошо коррелирует с более низкой латеральной диффузией и

более высокой сжимаемостью липид А содержащих бислоев, уравновешенных Ca^{2+} [218].

Группа под руководством профессора Им также провела ряд МД исследований чистых ЛПС-бислоев, а также смешанных бислоев, имитирующих наружную мембрану, с использованием различных ЛПС-компонентов: R-мутантов в случае смешанных бислоев [26], а также ЛПС, содержащих 5 или 10 повторяющихся звеньев О-антигена, в чистых бислоях [25, 31]. Добавление компонентов к структуре ЛПС влияет как на конформацию отдельных молекул, так и на общие свойства бислоя. В расчетах для чистых ЛПС-бислоев было показано, что площадь, приходящаяся на один липид А, возрастает, а степень упорядоченности гидрофобного бислоя уменьшается по мере добавления большего количества компонентов ЛПС, что, видимо, указывает на менее плотную упаковку липида А в ЛПС-мембранах “гладких” клеток по сравнению с “грубыми” штаммами. Интересно, что более 50% координационных сайтов Ca^{2+} липида А и центрального олигосахарида заняты молекулами воды, что подтверждает важность воды и Ca^{2+} для стабилизации и поддержания целостности структуры наружной мембраны [27]. Это наблюдение согласуется с другими исследованиями, свидетельствующими о том, что ионы Ca^{2+} благоприятствуют поддержанию ламеллярной структуры S- и R-LPS-мембран при температурах 283–343 К и физиологическом содержании воды [214, 217].

С точки зрения динамики поведения различных компонентов ЛПС, как липид А, так и центральный олигосахарид демонстрируют малую подвижность по сравнению с фосфолипидами, и степень их подвижности в модельных расчетах не зависит от наличия и длины полисахаридной части, а также от гетерогенности бислоя [25–27]. Этот факт согласуется с другими исследованиями, показавшими, что латеральная диффузия липида А на порядок медленнее диффузии фосфолипидов [219]. Жесткость и низкая подвижность липидов А и остатков центрального олигосахарида, в основном, объясняются латеральными взаимодействиями через двухвалентные ионы Ca^{2+} за счет электростатических взаимодействий с отрицательно заряженными группами PO_4^{2-} и COO^- .

О-антигенные цепи, напротив, оказываются гибкими в модельных расчетах, причем степень их подвижности последовательно увеличивается от ближайшего к плоскости мембраны повторяющегося звена к более дистальным остаткам [25, 27]. При этом подвижность О-антигенных цепей существенно зависит от состава мембраны, влияющего на плотность упаковки О-антигенов и оказывается выше для гетерогенных бислоев [25, 27]. Распределение молекул ЛПС в реальной наружной мембране существенно неоднородно и учет присутствия в составе мембраны молекул разного типа, по-видимому, является необходимым условием для реалистичного воспроизведения укладки О-антигенных цепей на ее поверхности.

Второй важной проблемой создания моделей гладких ЛПС мембран является выбор на-

чальной конформации О-антигенных цепей. В пространстве конформаций длинные и гибкие О-антигенные цепочки имеют очень сложный ландшафт свободной энергии, и искусственный выбор начального состояния может привести к тому, что структура цепи никогда не сможет достичь нативного состояния в МД расчете. Синтезированные на внутренней мембране, ЛПС транспортируются на поверхности клетки в ограниченном количестве специальных сайтов [167, 220]. Таким образом, первичная укладка О-антигенной цепи начинается еще до переноса ЛПС во внешнюю мембрану, и эта предварительная стадия определяет дальнейшую эволюцию конформации О-антигена в составе мембраны. Детальное описание конформационной подвижности свободных О-антигенов в растворе необходимо для корректного выбора начального состояния и анализа поведения О-антигенов в мембранном окружении.

Экспериментальное изучение конформационного поведения цепей О-антигенов представляет большую методологическую сложность. По своей природе олигосахариды трудно кристаллизуются, что не позволяет использовать рентгеноструктурный анализ для исследования их конформаций. Таким образом, основным методом исследования пространственной структуры полисахаридов и О-антигенов является ЯМР. Интерпретация данных ЯМР чаще всего выполняется при помощи молекулярного моделирования. Активное изучение строения и биологических свойств О-антигенов бактерий, а также разработка методов структурного анализа сложных углеводов ведется в лаборатории под руководством Ю.А. Книреля из Института органической химии РАН [174]. Исследования по определению первичной последовательности О-антигенов бактерий самых разнообразных таксономических групп с последующей ЯМР спектроскопией коротких фрагментов О-антигена в растворе ведутся группой Антонио Молинаро [221]. Конформационные изменения ЛПС при взаимодействии с белками экспериментально исследуется в двух лабораториях соседних институтов Потсдама: Стефани Барбирц из Университета Потсдама и Марка Сантера из Института Коллоидной Химии имени Макса Планка [222]. Большое количество работ по описанию конформаций дисахаридов и коротких фрагментов олигосахаридов в растворе было выполнено в ряде других лабораторий [28, 29, 223–226].

Основными параметрами, используемыми для описания конформаций полисахаридных цепей являются двугранные углы поворота вокруг О-гликозидных связей между остатками, а также конформации углеводных колец. Для всех рассмотренных на сегодняшний день фрагментов О-антигена, как данные ЯМР, так и МД моделирование демонстрируют предпочтительность *син*-конформаций гликозидных связей, обеспечивающих максимальную удаленность остатков друг от друга [28, 29]. Помимо этого энергетического минимума, такие молекулы часто обладают локально выгодными *анти*-конформациями, в которых один из

О-гликозидных двугранных углов принимает значения около 180° [28, 223, 224] (см. раздел 1.4.1 главы 2). *Анти- ψ* конформации обычно имеют более низкую энергию, чем *анти- φ* [28, 30].

Энергетически выгодной конформацией пиранозных колец для большинства углеводных остатков является кресло (1C_4 или 4C_1), в котором наиболее объемные заместители ориентированы экваториально, то есть максимально удалены друг от друга [227]. Относительная устойчивость энергетически выгодных конформаций колец и преобладание *син*-конформаций О-гликозидных связей в коротких олигосахаридах приводит к тому, углеводные цепочки большей длины образуют спиральные структуры, параметры которых могут быть получены из данных ЯМР [29].

Тем не менее, выводы о конформационной подвижности и предпочтительных состояниях для коротких олигосахаридов не могут быть непосредственно экстраполированы на длинные полисахаридные цепи и не дают достаточной информации о поведении, в частности, длинных цепочек О-антигенов, наблюдаемых у резистентных патогенных штаммов. Интерпретация результатов ЯМР даже для цепей длиной порядка 10 повторяющихся звеньев существенно затруднена, и метод позволяет лишь отметить наличие конформационной подвижности цепи на разных временных и пространственных масштабах [228]. МД моделирование в неявном растворителе О-антигена *Sh. flexneri*, состоящего из четырех [30] и 10 тетрасахаридных RU [31], показало наличие значительных структурных флуктуаций, обусловленных взаимодействием удаленных частей молекулы. Уже при такой длине цепи удастся получить конформации, не наблюдающиеся для более коротких фрагментов [30, 31]. В главе 4 мы проводим детальное МД исследование конформационной подвижности относительно длинной цепи О-антигена (12 повторяющихся звеньев) в различном окружении, а также анализируем влияние различных компонентов ЛПС на структуру образуемых агрегатов и архитектуру ЛПС-мембран.

Глава 2

Методы

1 Подготовка и проведение МД расчетов

1.1 Создание молекулярных топологий

Модели молекул дисахаридов и цепи О-антигена были разработаны на основе силовых полей OPLS-AA [229] и GLYCAM06 [230] (модификация AMBER99 [231]). Парциальные заряды атомов остатков α -D-маннозы, α -D-галактозы и α -L-рамнозы были вычислены авторами силового поля GLYCAM06 [230]. Парциальные заряды атомов α -D-абеквоты были установлены такими же, как для α -D-галактозы, а парциальные заряды для восстановленных атомов C3 и C6 были взяты из аналогичных химических фрагментов в силовом поле AMBER99 [231].

Основным полем, используемым для расчетов ЛПС-мембран и ЛПС-мицелл, было поле OPLS-AA [232], первоначально параметризованное для воспроизведения основных термодинамических свойств органических жидкостей [229]. Поле OPLS-AA содержит большое количество разных типов атомов, что позволяет подробно описывать молекулы с разнообразной химической структурой. В терминах силового поля OPLS-AA, все типы атомов делятся на группы в соответствие с их химическим окружением. В результате, атомы с аналогичными химическими свойствами могут иметь разные парциальные заряды и одинаковые потенциалы валентных взаимодействий с соседними атомами. Это свойство позволяет значительно уменьшить количество возможных комбинаций типов атомов и упрощает работу с силовым полем. Выбор типов атомов и создание молекулярных топологий в поле OPLS-AA было выполнено с использованием программы **TrpMkTop**, разработанной в нашей лаборатории. Основной алгоритм **TrpMkTop** опирается на распознавание химического окружения молекул при помощи записи химических фрагментов SMARTS с использованием библиотеки `openbabel` [233].

Входными данными для **TrpMkTop** являются координаты всех атомов молекулы и база данных химических фрагментов (SMARTS), соотнесенных с типами атомов из силового поля. Программа осуществляет создание молекулярной топологии по следующему алгоритму:

1. Присвоение типов атомов:

- (a) построение графа связности молекулы согласно файлу структуры;
- (b) перебор шаблонов SMARTS из базы данных и их поиск в химической структуре молекулы с использованием функций пакета `openbabel`;
- (c) для каждого атома: выбор из шаблона, описывающего фрагмент, содержащий рассматриваемый атом, наиболее полным образом, в соответствие с системой условных приоритетов (шаблоны, описывающие более сложные химические фрагменты, имеют более высокий условный приоритет, чем шаблоны для более мелких фрагментов).

2. Установка параметров валентных взаимодействий:

- (a) выбор параметров валентных взаимодействия в соответствие с базой данных;
- (b) установка параметров неправильных двугранных углов (`impropers`) в соответствие с базой соответствующих шаблонов.

3. Установка параметров невалентных взаимодействий:

- (a) определение зарядовых групп;
- (b) добавление параметров 1–4-взаимодействий, если это необходимо.

Молекула ЛПС содержит ряд химических фрагментов, параметры которых отсутствовали в исходном силовом поле. Эти фрагменты были выделены из структуры молекулы ЛПС в виде небольших молекул: α,α -диметоксипропионат, α -метоксиэтил фосфат и диметилпирофосфат. Для этих молекул были проведены расчеты парциальных зарядов и силовых параметров торсионных углов методами *ab initio* (см. раздел 1.2). Соответствующие новые типы атомов были внесены в базу данных **TrpMkTop** (рис. 2.1).

1.2 Расчеты *ab initio*

Квантово-химические (QM) расчеты были проведены в рамках теории функционала электронной плотности (DFT) с использованием пакета Firefly 8 [234] в базисе 6-31G+(1p,1d) с

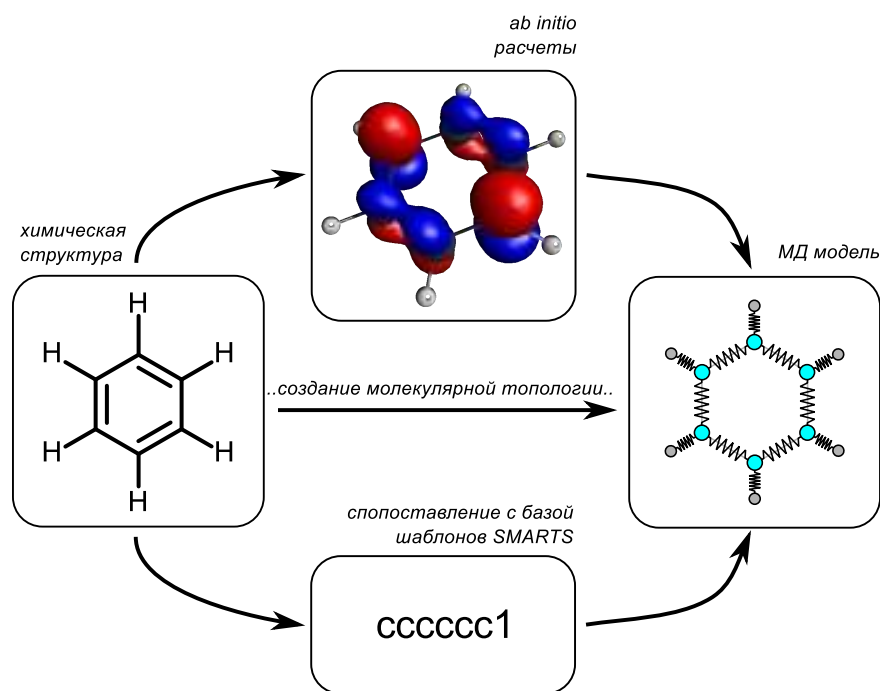


Рис. 2.1: Основная схема работы программы **TrpMkTop** по автоматическому созданию молекулярных топологий.

функционалом B3LYP5. Электростатический потенциал рассчитывался на поверхности Конолли [235], образованной объединением сфер с радиусом $r = r_{vdw} \cdot 1.4$ и центрами в центрах атомов. Значения парциальных зарядов были подобраны при фитировании полученного потенциала с помощью процедуры RESP (Restrained Electrostatic Potential) [236]. Окончательные значения зарядов были выбраны в соответствии с результатами фитирования и значениями зарядов для атомов похожих типов в силовом поле OPLS-AA таким образом, чтобы по возможности не изменять парциальные заряды для атомов известных типов.

Ab initio сканирование поверхности потенциальной энергии (ППЭ) при расчетах QM потенциала двугранных углов было выполнено с использованием нового алгоритма, недавно реализованного в Firefly v.8 (сканирование ППЭ по выделенной координате с релаксацией в каждой точке в делокализованных координатах [234]). Значение рассматриваемых двугранных углов изменялось на 5° за шаг. Минимизация энергии с фиксированными значениями двугранного угла была выполнена в делокализованных координатах, которые пересчитывались на каждом шаге сканирования. Как и в случае с расчетом парциальных зарядов, был использован базис 631G+(1p,1d) с использованием DFT (функционал B3LYP5). Для сдвига координат при локальной оптимизации геометрии использовался алгоритм GDIIS со значением порогового градиента 10^{-5} Хартри/Бор.

1.3 Протоколы МД расчетов

Основная часть МД расчетов была проведена с использованием программного пакета GROMACS версии 5.1.4 [237]. Финальные расчеты были проведены в изобарно-изотермическом ансамбле NPT с анизотропным баростатом при нормальном и латеральном давлении равным 1 бар и шагом интегрирования 2 фс. Использовался термостат Нозе-Гувера [238] и баростат Парринелло-Рамана [239]. Длина связей между атомами водорода и тяжелыми атомами была зафиксирована при помощи алгоритма LINCS [240]. Для расчета дальнедействующих электростатических взаимодействий был использован метода суммирования по Эвальду (Particle Mesh Ewald method, PME) с интервалами Фурье равными 0.12 нм [241]. Мы использовали радиус обрезания равный 1.2 нм для расчета дисперсионных сил, а также для определения списков соседей для каждого атома и переключения между прямым и обратным пространством для расчетов PME. Все расчеты проводились в периодических граничных условиях с явным растворителем (использовалась модель воды TIP3P [242]).

В качестве противоионов для нейтрализации отрицательного заряда в моделях липидных бислоев (раздел 1.3.3) и ЛПС-мембран (раздел 1.3.5) нами были использованы ионы натрия. Важно отметить, что в реальных мембранах заряды ЛПС нейтрализуются, в основном, катионами Ca^{2+} . Кальций влияет на межмолекулярное взаимодействие ЛПС как *in vivo*, так и *in vitro* [22, 211]. Мы использовали ионы натрия вместо кальция, чтобы увеличить подвижность системы и быстрее привести ее к равновесному состоянию.

1.3.1 Молекулы дисахаридов

Свободная энергия конформаций дисахаридов $\alpha\text{-DGal-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-DMan}$, $\alpha\text{-DMan-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-LRha}$ и $\alpha\text{-LRha-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-DGal}$ была вычислена с использованием метода расчета потенциала средней силы (см. раздел 1.4.2). Молекулу дисахарида помещали в центр кубического бокса, с размерами $6 \times 6 \times 6$ нм. Расчеты проводили в вакууме, при температуре 500 К в течение по крайней мере 1 мкс. Чтобы получить достаточную статистическую информацию для малонаселенных областей конформационного пространства, мы сохраняли атомные координаты на каждом шаге расчета (2 фс). Полученные карты распределения свободной энергии были построены для $5 \cdot 10^8$ реализаций, что позволило достичь ненулевой заселенности состояний с относительными значениями свободной энергии до ~ 40 кДж/моль. Сходимость значений свободной энергии была подтверждена сравнением распределений свободной энергии, рассчитанных для всей траектории, с распределениями, полученными для ее частей.

Расчеты свободной энергии конформаций дисахаридов в водном окружении были выполнены в боксах такого же размера, но при более низкой температуре в 300 К. Траектории длиной 100 нс были использованы для оценки влияния растворителя и низкой температуры на структуру бассейнов глобальных минимумов.

1.3.2 Свободный О-антиген

МД расчеты динамики молекулы О-антигена в растворе были проведены в додекаэдрическом боксе с расстоянием между параллельными гранями равным 12 нм. Размер бокса был выбран достаточно большим, чтобы избежать взаимодействия цепи самой с собой через периодические граничные условия. Мы использовали 0.1 М NaCl в качестве фонового электролита. Общий размер системы составил около 153000 атомов (цепочка О-антигена содержала 975 атомов). Каждые 5 шагов моделирования мы вычитали координаты центров масс для О-антигена и раствора.

Для каждой из моделей цепочки О-антигена (OPLS-AA и GLYCAM) было проведено по три расчета молекулярной динамики длиной 400 нс при температуре 300 и 500 К. Каждому расчету предшествовал уравнивающий расчет длиной 10 нс, проведенный с использованием алгоритма Берендсена [243] для термо- и баростатирования. Затем финальные координаты этих расчетов были использованы в качестве стартовых для финальных расчетов, с использованием термостата Нозе-Гувера [238] и баростата Парринелло-Рамана [239]. Шаг интегрирования во всех расчетах составлял 2 фс, длины связей между атомами водорода и тяжелыми атомами были фиксированы (алгоритм LINCS [240]). Частота записи координат атомов в финальных расчетах составляла 20 пс, что позволило нам проанализировать $2 \cdot 10^7$ состояний О-антигенной цепи.

1.3.3 Липидные бислои

Модели фрагментов липидных бислоев были собраны с использованием онлайн утилиты `charmm-gui membrane builder` [244]. Количество молекул липидов в бислое составляло 50, либо 128 штук. Начальные уравнивающие расчеты были проведены при термостатировании и баростатировании по методу Берендсена [243] в течение 200 нс, после чего были проведены 250 нс расчеты с использованием финального протокола (термостат Нозе-Гувера и баростат Парринелло-Рамана). Структура мембраны считалась уравновешенной, если ее площадь сохранялась постоянной в течение 50 нс.

1.3.4 Моделирование ЛПС-мицелл

Мы разработали 12 моделей ЛПС-мицелл. Рассмотренные мицеллы состояли из 4, 6, 8 и 14 молекул Re-, Ra- и O3-LPS (S-LPS, содержащих 3 повторяющихся звена O-антигенной цепи). Сборка начальных состояний для расчетов была проведена следующим образом: мы ориентировали молекулы ЛПС вдоль нормалей к граням тетраэдра (для модели из 4 молекул), вдоль диагоналей октаэдра (для модели 6 молекул), диагоналей куба (для 8 молекул), и диагоналей и нормалей к граням куба (для 14 молекул). После оптимизации геометрии системы для каждой структуры были проведены 10 нс релаксационные МД расчеты аналогично тому, как это было сделано для других систем (разделы 1.3.1, 1.3.2). Финальные расчеты проводились в течение 500 нс в 0.1 М растворе NaCl при комнатной температуре (300 K). Расчет площади гидрофобной области ЛПС, экспонированной в раствор, был проведен с использованием утилиты `gmx sasa` из пакета программ GROMACS, которая осуществляет “обкатку” поверхности выбранной группы атомов [245].

1.3.5 Моделирование ЛПС-мембран

В работе были построены модели трех симметричных Re-LPS-мембран, состоящих из:

1. Re-LPS, не имеющей в своем составе Ara4N;
2. Re-LPS, имеющих один остаток Ara4N, присоединенный к остатку фосфорной кислоты на проксимальном остатке глюкозы в составе липида A;
3. Re-LPS, имеющих два остатка Ara4N, присоединенных к остаткам фосфорной кислоты на обоих остатках глюкозы в составе липида A.

Пространственная структура молекул Re-LPS была вытянута вдоль нормали к бислою с помощью утилиты `sculpting` в пакете PyMOL [246]. Молекулы в такой конформации были использованы для сборки стартовой структуры фрагментов Re-LPS мембран с помощью утилиты `memgen`, разработанной в ранее в нашей группе [247] и доступной на по на сайте: <http://erg.biophys.msu.ru/wordpress/archives/272>. Молекулы липидов были размещены в узлах гексагональной решетки с расстоянием между центрами равным 1 нм. Размер каждой из систем составлял 16 молекул ЛПС на один монослой (начальный размер систем составлял $6.0 \times 5.0 \times 7.5$ нм) и 9 молекул на монослой (начальный размер — $4.5 \times 4.0 \times 7.5$ нм). Оптимизация геометрии модельных систем выполнялась с помощью пакета GROMACS, последовательно применяя следующие интеграторы: градиентный спуск (`steep`), метод сопряженных

градиентов (cg) и метод `l-bfgs`. После оптимизации геометрии для каждой из систем были проведены 10 нс уравнивающие расчеты с грубыми термо- и баростатом, а затем 500 нс релаксационные расчеты в NPT ансамбле с точными термо- и баростатом, при температуре 300 K.

Модель бислоя, состоящего из Re-LPS первого типа, была далее использована для сборки двух моделей S-LPS мембран. Первая модель представляла собой чистый ЛПС бислой, содержащий 16 Ra-LPS в одном монослое и 8 Ra-LPS + 8 O12-LPS во втором монослое. Вторая модель представляла собой бислой Ra-LPS/O12-LPS со встроенными молекулами белка OmpA [248]: финальная система состояла из 20 O12-LPS, 20 Ra-LPS и 8 OmpA β -бочонков. Стандартные утилиты, такие как `charmm-gui` [249] или мембранный плагин VMD [250], не подходят для работы с такими системами из-за большого количества белка по отношению к липидной части и большого размера липидов. Поэтому все атомные манипуляции выполнялись вручную с использованием пакета PyMOL и дополнительных программ на языке Python.

Создание моделей S-LPS мембран велось поэтапно. Сначала нами были созданы и уравновешены модели фрагментов Ra-LPS мембран размером 16 молекул на монослой для безбелковой системы и 9 молекул на монослой для модели с белком, путем добавления центрального олигосахарида к каждой молекуле модельного бислоя Re-LPS первого типа (PyMOL). После 200 нс расчетов в NVT ансамбле в водном растворе NaCl (0.1 M) обе модели Ra-LPS бислоев были уравновешены в течение 200 нс в ансамбле NPT в таком же окружении. Как и ранее, на первом этапе уравнивания были использованы термостат и баростат Берендсена, на втором — термостат Нозе-Гувера и баростат Парринелло-Рамана.

После достижения системами равновесной площади, бислой 16 Ra-LPS/16 Ra-LPS был использован для построения первой модели чистого ЛПС бислоя. Мы использовали PyMOL для присоединения цепей О-антигена, состоящих из 12 повторяющихся звеньев, к половине случайно выбранных молекул Ra-LPS одного из монослоев.

Сборка стартовой конформации второй, белок-содержащей мембраны осуществлялась в несколько этапов:

1. *Подготовка белка OmpA.* В качестве модельной структуры белка была использована структуру 1BXW трансмембранного домена OmpA *E. coli* [248]. Последовательность гена **A0A023I6S3 (22–192 a.a.)** была выровнена относительно разрешенных в кристалле 1XBWT аминокислот, а финальная модель была построена с использованием метода моделирования по гомологии (MODELLER v9.11 [251]).

2. *Растворение первой молекулы белка.* Молекулы воды были удалены из уравновешенного 9 Ra-LPS/9 Ra-LPS бислоя. Используя PyMOL, мы удалили по две соседние молекулы из каждого монослоя (удаленные молекулы находились друг напротив друга в соседних монослоях). На их место была помещена молекула белка. Конечная система содержала семь молекул Ra-LPS на монослой и одну молекулу белка, растворенную в бислое. Для такой системы был проведен уравнивающий 100 нс расчет в NVT ансамбле, в ходе которого координаты атомов основной цепи белка были фиксированы.
3. *Растворение второй молекулы белка.* Молекулы воды были удалены из системы, приготовленной на шаге 2. Затем мы удалили еще по две соседние молекулы в каждом монослое, и поместили на их место вторую молекулу белка. Финальная система содержала 5 молекул Ra-LPS на монослой и 2 молекулы OmpA. Модель была растворена в водном растворе 0.1 M NaCl с добавлением ионов Na^+ для нейтрализации отрицательного заряда. Нами был проведен 10 нс уравнивающий расчет при температуре 50 K в NVT ансамбле, а затем — уравнивающий 100 нс расчет при температуре 300 K в NSpT ансамбле. Аббревиатура “NSpT” используется нами для случая расчетов в NPT ансамбле при использовании анизотропного баростата с очень малыми коэффициентами сжимаемости вдоль направления X/Y (10^9 бар·нм⁻¹), позволяющего выровнять паскалево давление в системе при фиксированной площади бислоя. В ходе уравнивающих расчетов координаты атомов основной цепи белка также были фиксированы.
4. *Присоединение цепей О-антигена к внешнему монослою.* С помощью PyMol мы присоединили цепи О-антигена к каждой молекуле Ra-LPS одного из монослоев мембраны. В качестве начальной конформации цепи О-антигена была выбрана энергетически выгодная спираль (см. раздел 1.2.1 главы 4). Затем результирующий бислой O12-LPS/Ra-LPS/OmpA был вновь растворен в растворе 0.1 M NaCl с добавлением катионов натрия для нейтрализации отрицательного заряда. После серии расчетов минимизации энергии было проведено уравнивание в NVT ансамбле при температуре 50 K в течение 370 нс, при фиксировании координат атомов основной цепи белка.
5. *Подготовка стартовой структуры бислоя.* Вода и ионы были удалены из системы, собранной на шаге 4. С учетом периодических граничных условий система была дублирована вдоль направлений X и Y, что привело к увеличению ее объема в 4 раза. Окончательная система содержала 20 O12-LPS, 20 Ra-LPS, 8 белков OmpA.

Для начальных конфигураций чистой и содержащей белок ЛПС-мембран была проведена минимизация энергии и уравнивающий расчеты в NVT ансамбле до достижения системой нормального латерального давления. Далее, для интенсификации процесса сканирования конформационного пространства О-антигенов для каждой мембраны были проведены 300 нс МД расчеты в вакууме при температуре О-антигенов равной 600 К и температуре остальной части мембран равной 50 К в NVT ансамбле. Полученная структура мембраны была далее помещена в раствор 0.1 М NaCl с добавлением нейтрализующих заряд ионов натрия, и для каждой системы мы провели 500 нс уравнивающие расчеты при общей температуре 303 К с использованием стандартного протокола.

1.4 Обработка результатов расчетов

Для визуализации молекулярных сцен были использованы пакеты PyMOL [246] и VMD [252]. Обработка количественных данных выполнялась с помощью программ собственной разработки на языке Python с использованием библиотек `numpy` и `scipy` [253]. Графики были построены с использованием библиотеки `matplotlib` [254]. Энергетически выгодная спиральная структура молекулы O12-LPS в разделе 1.2.1 главы 4 была построена с помощью самодельного скрипта на основе PyMOL, который устанавливает каждый двугранный угол вокруг О-гликозидной связи в энергетически выгодное положение. Минимизация энергии полученной структуры была проведена с использованием стандартной процедуры GROMACS.

Оценка подвижности различных компонентов моделируемых систем проводилась при расчете среднеквадратического отклонения структуры (root mean square fluctuation, RMSF) с фиксированным шагом равным 1 нс с использованием утилиты GROMACS `gmx rmsf`.

1.4.1 Анализ конформаций цепочки О-антигена

Одним из общепринятых критериев, используемых для описания конформаций углеводных полимеров, являются значения двугранных углов (φ, ψ) вокруг О-гликозидных связей [28, 29, 223, 224, 255–257]. В нашей работе мы измеряем эти углы относительно атомов водорода: $\varphi = \text{H1-C1-OX-CX}$, $\psi = \text{C1-OX-CX-HX}$ (рис. 2.2 А), как это было ранее сделано во многих модельных и экспериментальных исследованиях [28, 223, 224, 256, 257].

В то время как рассмотрение углов (φ, ψ) дает достаточную информацию о конформационном поведении цепочек при фиксированных конформациях остатков моносахаридов, учет конформационной подвижности пиранозных колец привносит дополнительные степени свободы, не описываемые изменением углов (φ, ψ). Изменения конформаций углеводных колец

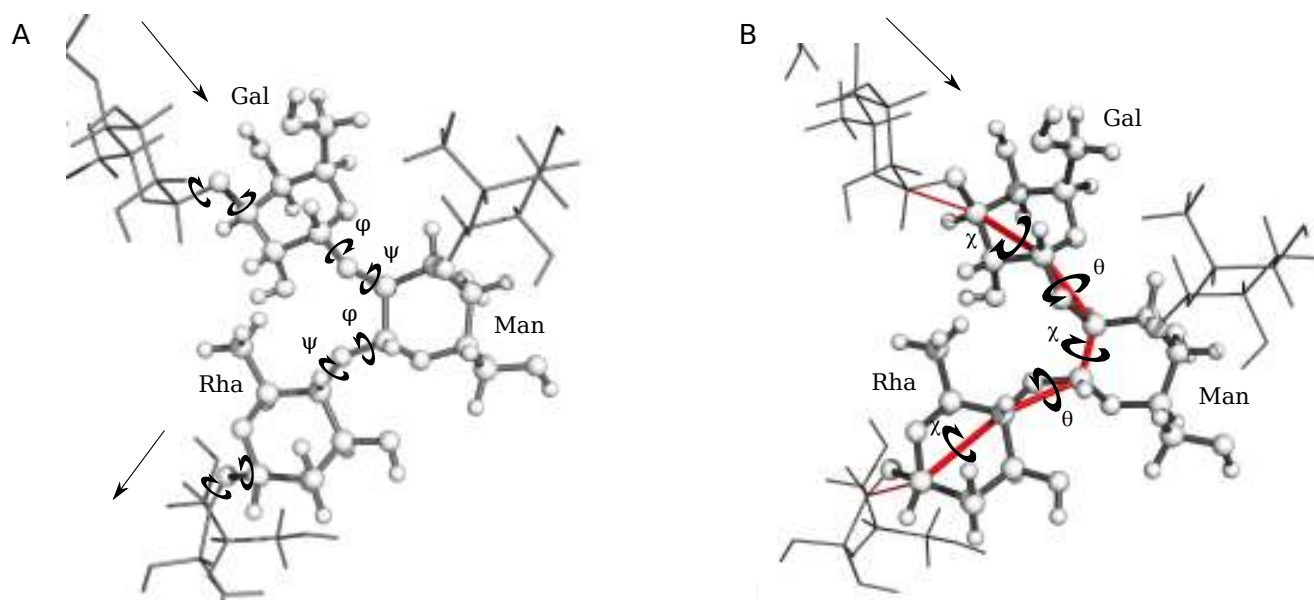


Рис. 2.2: Двугранные углы, использованные для анализа конформационной подвижности О-антигенной цепи. Классические углы (φ, ψ) (А) и нативные углы (χ, θ) (В) отмечены на фрагменте полисахаридной цепи О-антигена *S. typhimurium*. Прямые стрелки показывают направление измерения двугранных углов. Красные линии добавлены для визуализации нативных двугранных углов.

могут существенно влиять на пространственную структуру молекулы [25, 29, 30], поэтому мы предлагаем альтернативный подход для описания подвижности длинной гибкой цепи и вместе с классическими углами рассматриваем “нативные” двугранные углы, образованные углеродными атомами гликозидных связей (рис. 2.2 В). Эти углы (χ, θ) можно легко представить, если соединить воображаемой линией атомы углерода последовательных О-гликозидных связей (рис. 2.2 В, красные линии). Угол χ отражает конформацию углеводного остатка, а угол θ описывает конформацию О-гликозидной связи между остатками. Мы использовали три пары таких двугранных углов для анализа конформаций цепочек О-антигена: ($\chi_{Man}, \theta_{ManRha}$), ($\chi_{Rha}, \theta_{RhaGal}$) и ($\chi_{Gal}, \theta_{GalMan}$).

1.4.2 Расчет свободной энергии

Расчет относительной свободной энергии конформаций О-гликозидных связей для молекул дисахаридов был проведен с использованием метода потенциала средней силы (Potential of Mean Force, PMF). Для каждой конформации i , энергия рассчитывалась, исходя из отношения количества реализаций этой конформации (N_i) к количеству реализаций наиболее часто

встречающейся конформации (N), свободная энергия которой принималась равной нулю:

$$\Delta G = -RT \ln \frac{N_i}{N}.$$

Достижение распределением заселенностей равновесного состояния было оценено сравнением результирующих распределений энергий для полной траектории с распределениями, рассчитанным для ее частей.

2 Численное решение уравнений в частных производных

Интегрирование реакционно-диффузионных моделей, описывающих основные реакции каскада свертывания крови, рассматриваемых в разделе 1 главы 3, производилось в среде MATLAB с использованием встроенного функционала `pdepe`. Моделирование системы, рассматриваемой в разделе 2 главы 3, проводилось с помощью программы на C++, написанной аспирантом университета Лион 1 Анассом Бушнита. Система уравнений реакция-диффузия-адвекция, описывающая динамику изменения распределения концентраций факторов крови, решалась численно с помощью метода конечных разностей. Использовалась схема против потока в дискретных конвективных членах во избежание числовых неустойчивостей в случаях с преобладанием конвекции. Численная схема рассматривалась на двумерной сетке размером 2000×400 . Точность вычислений контролировалась сравнением с результатами, полученными при меньшем шаге интегрирования (см. раздел 1 приложения для примера дискретизации). Уравнение потока решалось численно методом проекций [258], подробно описанным в [259]. Описание применения метода к нашей системе приведено в разделе 1 приложения.

3 Метод Лере-Шаудера доказательства существования решений типа пульс

Метод Лере-Шаудера состоит в построении непрерывной деформации (гомотопии) исходной системы к некоторой системе, для которой известно существование решений, обладающих требуемыми свойствами. Для этих систем рассматривается векторное поле, порожденное ими в функциональном пространстве, и предполагается существование гомотопического инварианта, а именно, вращения векторного поля, иначе называемого топологической степенью, удовлетворяющей следующим свойствам:

1. Принцип отличия от нуля. Если на границе области в функциональном пространстве степень определена и отлична от нуля, то в этой области существуют стационарные точки.
2. Гомотопическая инвариантность. Если при непрерывной деформации системы решение не достигает границы области, то значение степени на этой границе неизменно.

Тогда, при условии существования априорных оценок решений таких, что в процессе гомотопии решения находятся в некотором шаре в функциональном пространстве, и при условии, что для финальной системы топологическая степень на границе шара отлична от нуля, то она также отлична от нуля для исходной системы, откуда следует существование решений для исходной системы. Таким образом, для применения метода Лере-Шаудера необходимо определить степень с указанными свойствами, и построить непрерывную гомотопическую деформацию к некоторой модельной системе, для которой степень отлична от нуля на границе шара достаточно большого радиуса, при условии существования априорных оценок решений.

4 Интегрирование и оценка параметров для кинетической модели активации контактной системы

Модели контактной активации были разработаны, опираясь на экспериментальные результаты по активации фактора XII агрегатами ЛПС в чистых системах FXII+PK [17] и FXII+PK+HMWK [18]. Полученные кинетические модели были проинтегрированы с использованием метода LSODA программы COPASI (<http://www.copasi.org>). Подбор параметров модели был осуществлен следующим образом.

Мы предполагали, что один агрегат состоит из $8 \cdot 10^3$ молекул ЛПС и имеет площадь поверхности (A_{lps}), равную 0.02 мкм^2 , оценив ее через средний радиус ЛПС-агрегатов, образуемых на высоких концентрациях ЛПС ($\sim 40 \text{ нм}$), в работе [260]. Объем раствора, приходящийся на один ЛПС-агрегат (V_{sol}) был рассчитан как величина, обратная к концентрации агрегатов в растворе. Конвертирование концентраций, измеренных в работе [17], из мкг/мл в мкМ производилось, считая массу одного ЛПС равной 4.5 кДа [261].

Начальные концентрации FXII и PK были взяты равными 0.16 и 0.14 мкМ , соответственно, как это было сделано в эксперименте [17]. Начальная концентрация сайтов связывания на поверхности ЛПС агрегатов ($\bar{S}$) была оценена из данных о размерах FXII. Мы предположили, что сайты связывания FXII и HMWK имеют примерно одинаковый размер, равный 10 нм

в диаметре [262], что соответствует площади сайтов связывания в 50–140 нм² или концентрации 7.1–20 · 10³ мкм^{−2}. После подбора параметров, окончательное значение было выбрано равным 11510 мкм^{−2}.

Кинетические константы модели варьировались с целью воспроизведения экспериментальных данных из [17]. Мы использовали значения кинетических констант, полученные в модели активации контактного пути на микровезикулах, в качестве стартовых значений для процедуры подгонки [153]. Далее мы поочередно варьировали параметры модели с целью достичь наиболее близкие к экспериментальным значения финальной концентрации Кг, наблюдаемой в эксперименте.

В модели с учетом присутствия НМWK мы использовали концентрации FXII, РК и НМWK равными опубликованным в [18]. Все кинетические константы для реакций, совпадающих с реакциями в модели без НМWK, были унаследованы из первой модели без изменений. Оставшиеся параметры были подобраны при дополнительном допущении, что НМWK и комплекс [НМWK, РК] имеют одинаковые кинетики связывания: $k_7 = k_8$, $k_{-7} = k_{-8}$. Мы также учитывали опубликованные данные [263] $k_{-5}/k_5 = K_{d5} = 18$ нМ. Окончательный набор параметров для обеих моделей представлен в табл. 2.1.

Таблица 2.1: Кинетические константы, использованные в моделях активации контактного пути на ЛПС.

парам.	реакция	значение
Параметры, использованные в обеих моделях (2.1) и (2.3)		
k_1	связывание с поверхностью FXII	$2.27 \cdot 10^3 \text{ мкМ}^{-1} \text{ с}^{-1}$
k_{-1}	диссоциация FXII с поверхности	$6.02 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$
k_2	активация FXII за счет взаимодействия с поверхностью	$1.55 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$
m_3	активация РК фактором XIIa	0.007 с^{-1}
M_3	активация РК фактором XIIa	1 мкМ
m_4	активация фактора XIIb (Kr)	22.4 с^{-1}
$\overline{M}_4$	активация фактора XIIb (Kr)	$1.04 \cdot 10^5 \text{ мкМ}^{-2}$
Дополнительные параметры, использованные модели (2.3)		
k_5	формирование комплекса [РК, НМWK]	$5.55 \cdot 10^3 \text{ мкМ}^{-1} \text{ с}^{-1}$
k_{-5}	диссоциация комплекса [РК, НМWK]	100 с^{-1}
k_6	связывание с поверхностью НМWK	$2.27 \cdot 10^3 \text{ мкМ}^{-1} \text{ с}^{-1}$
k_{-6}	диссоциация НМWK с поверхности	602 с^{-1}
k_7	связывание с поверхностью комплекса [РК, НМWK]	$2.27 \cdot 10^3 \text{ мкМ}^{-1} \text{ с}^{-1}$
k_{-7}	диссоциация комплекса [РК, НМWK] с поверхности	602 с^{-1}
k_8	связывание Кг с НМWK на поверхности	$2.27 \cdot 10^3 \text{ мкМ}^{-1} \text{ с}^{-1}$
k_{-8}	диссоциация Кг с поверхностного комплекса [РК, НМWK]	602 с^{-1}
m_9	активация поверхностного комплекса [РК, НМWK] (FXIIa)	0.034 с^{-1}
$\overline{M}_9$	активация поверхностного комплекса [РК, НМWK] (FXIIa)	$6.16 \cdot 10^3 \text{ мкМ}^{-2}$

Глава 3

Математическое моделирование режимов свертывания крови

Попадание ЛПС в кровяное русло при сепсисе ведет к активации внешнего и внутреннего путей системы свертывания крови (см. раздел 1.5 главы 1). В данной главе мы проводим теоретический анализ различных стадий этого процесса: инициации, распространения и остановки роста тромба, а также переходных режимов, — с помощью математических моделей. В разделе 1 рассматривается одномерная реакционно-диффузионная модель основных реакций каскада свертывания, описывающая поведение волны тромбина на этапе распространения волны свертывания. Подробный теоретический анализ этой модели позволяет нам сформулировать аналитические условия существования автоволновых решений и оценить скорость их распространения. В этом разделе нами также исследуются достаточные условия сходимости решения системы к автоволне в зависимости от величины начального стимула, то есть переход системы от стадии инициации к стадии распространения. Основные результаты раздела 1 относятся к общей части каскада свертывания (см. рис. 1.1 в главе 1) и не зависят от природы начального активатора. В последующих разделах мы более подробно рассматриваем каждый из путей активации свертывания. В разделе 2 нами рассмотрена модель типа реакция-диффузия-конвекция активации внешнего пути при повреждении стенки сосуда. В модели учитывается роль потока и пути APC в регуляции роста тромба и рассматриваются переходные режимы между полной и частичной закупоркой сосуда в зависимости от различных параметров системы. В разделе 3 рассматривается кинетическая модель активации контактного пути ЛПС, построенная на основании доступных экспериментальных данных и учитывающая поверхностные эффекты, имеющие решающее значение для активации FXII и PK. Данная модель позволяет нам воспроизвести кинетику наработки FXII

и сделать предварительные выводы о влиянии агрегатного состояния ЛПС на активацию контактной системы.

1 Распространение волны тромбина

Данный раздел посвящен исследованию математической модели основных реакций каскада свертывания. Функционирование этого каскада обеспечивает резкий переход от устойчивого жидкого состояния крови к режиму образованию тромба при превышении величины порогового возбуждения (см. раздел 1.4 главы 1). Подобное поведение характерно для автоволновых решений в двухустойчивых системах (см. раздел 1.1 главы 1). В данном разделе мы рассматриваем упрощенную модель основных реакций каскада свертывания (раздел 1.1) и получаем условия существования и устойчивости автоволновых решений и оценки скорости их распространения (раздел 1.2), а также формулируем условия существования решений типа пульс, определяющих достаточное начальное условие для сходимости решения к автоволне (раздел 1.3).

1.1 Математическая модель

Наработку тромбина в покоящейся плазме во время фазы распространения волны свертывания можно описать следующей системой уравнений:

$$\begin{aligned}
 \frac{\partial v_1}{\partial t} &= D \frac{\partial^2 v_1}{\partial x^2} + k_V T - h_V v_1, \\
 \frac{\partial v_2}{\partial t} &= D \frac{\partial^2 v_2}{\partial x^2} + k_{VIII} T - h_{VIII} v_2, \\
 \frac{\partial v_3}{\partial t} &= D \frac{\partial^2 v_3}{\partial x^2} + k_{XI} T - h_{XI} v_3, \\
 \frac{\partial v_4}{\partial t} &= D \frac{\partial^2 v_4}{\partial x^2} + k_{IX} v_3 - h_{IX} v_4, \\
 \frac{\partial v_5}{\partial t} &= D \frac{\partial^2 v_5}{\partial x^2} + k_X v_4 + k_X^* v_2 v_4 - h_X v_5, \\
 \frac{\partial T}{\partial t} &= D \frac{\partial^2 T}{\partial x^2} + (k_{II} v_5 + k_{II}^* v_1 v_5) \left(1 - \frac{T}{T_0} \right) - h_{II} T.
 \end{aligned} \tag{1.1.1}$$

Здесь T обозначает концентрацию тромбина, v_i , $i = 1, \dots, 5$ обозначают концентрации факторов V, VIII, XI, IX и X, соответственно, T_0 обозначает максимальную доступную концентрацию тромбина, равную начальной концентрации протромбина в плазме крови. Первый член каждого уравнения описывает диффузию соответствующего фермента в плазме крови, остальные члены описывают реакции активации и ингибирования. Полагается, что

концентрации неактивированных факторов находятся в избытке и реакции активации описываются реакциями квази-первого порядка с константами k_i , $i = V, VIII, XI, IX, X, II$, и k_i^* , $i = II, X$. Также мы предполагаем, что концентрации плазменных ингибиторов достаточно велики, и скорости ингибирования постоянны и равны h_i , $i = V, VIII, XI, IX, X, II$. Концентрации комплексов внутренней теназы и протромбиназы приняты равными их квазиравновесным концентрациям: $k_X^* v_2 v_4$ и $k_{II}^* v_1 v_5$, соответственно. Данная модель получена из ранее опубликованной модели [107], показавшей хорошее соответствие с экспериментальными данными.

Мы рассматриваем одномерный случай: контактная активация каскада свертывания происходит на левой границе домена, запуская образование тромбина и распространение волны свертывания слева направо, то есть ось x перпендикулярна стенке сосуда и направлена от стенки к просвету сосуда (рис. 3.1).

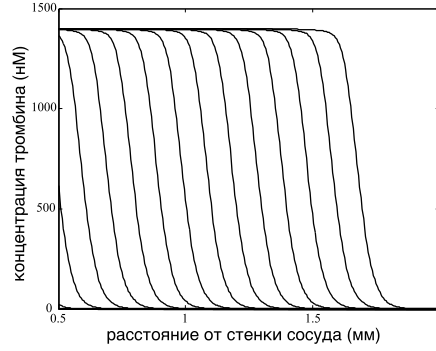


Рис. 3.1: Распространение автоволны тромбина в модели (1.1.1) при значениях параметров из [107] (см. раздел 2 приложения)

Положим $\mathbf{w} = (w_1, \dots, w_5, T)$ (мы также будем обозначать $w_6 = T$). Тогда система (1.1.1) может быть записана в векторной форме:

$$\frac{\partial \mathbf{w}}{\partial t} = \mathbf{D} \frac{\partial^2 \mathbf{w}}{\partial x^2} + \mathbf{F}(\mathbf{w}), \quad (1.1.2)$$

где $\mathbf{F} = (F_1, \dots, F_6)$, — вектор скоростей реакций в уравнениях (1.1.1), и $\mathbf{D}$ — положительная диагональная матрица. Функции F_i имеют вид:

$$\begin{aligned} F_i(\mathbf{w}) &= \alpha_i(\beta_i T - w_i) \text{ для } i = 1, 2, 3, \\ F_4(\mathbf{w}) &= \alpha_4(\beta_4 w_3 - w_4), \\ F_5(\mathbf{w}) &= \alpha_5(\beta_5 w_4 + \gamma w_2 w_4 - w_5), \\ F_6(\mathbf{w}) &= \alpha_6 w_5 (1 + \delta w_1) \left(1 - \frac{T}{T_0}\right) - \sigma T, \end{aligned} \quad (1.1.3)$$

где все константы положительны и заданы выражениями:

$$\begin{aligned}\alpha_1 &= h_V, \alpha_2 = h_{VIII}, \alpha_3 = h_{XI}, \alpha_4 = h_{IX}, \alpha_5 = h_X, \alpha_6 = k_{II}, \\ \beta_1 &= \frac{k_V}{h_V}, \beta_2 = \frac{k_{VIII}}{h_{VIII}}, \beta_3 = \frac{k_{XI}}{h_{XI}}, \beta_4 = \frac{k_{IX}}{h_{IX}}, \beta_5 = \frac{k_X}{h_X}, \\ \gamma &= \frac{k_X^*}{h_X}, \delta = \frac{k_{II}^*}{k_{II}}, \sigma = h_{II}.\end{aligned}$$

Нули функции $\mathbf{F}$, $\mathbf{w}^* = (w_1^*, \dots, w_5^*, T^*)$ заданы следующими уравнениями:

$$w_1^* = \beta_1 T^*, w_2^* = \beta_2 T^*, w_3^* = \beta_3 T^*, w_4^* = \beta_3 \beta_4 T^*, w_5^* = \beta_3 \beta_4 T^* (\beta_5 + \gamma \beta_2 T^*), \quad (1.1.4)$$

где T^* — это корень полинома четвертой степени P :

$$P(T) = TQ(T), \text{ где } Q(T) = aT^3 + bT^2 + cT + d. \quad (1.1.5)$$

Здесь $a < 0$, а остальные коэффициенты P не имеют априорных знаков (см. раздел 1.3.1.2 для явных значений коэффициентов P). Следовательно, нули F находятся во взаимно однозначном соответствии с нулями P . Ясно, что 0 всегда является нулем P , и соответствующим нулем для F является начало координат $\mathbf{0}$ в $\mathbb{R}^6$.

В дальнейшем мы сосредоточимся на случае, когда P имеет ровно два положительных корня, которые мы обозначим как $0 < \bar{T} < T^-$, т. е. на случае двухустойчивой системы. Мы также будем считать, что

$$Q(0) < 0, Q'(\bar{T}) > 0, Q'(T^-) < 0. \quad (1.1.6)$$

Так как Q — многочлен третьей степени с отрицательным старшим коэффициентом, то нетрудно показать, что $T^- < T_0$ (см. раздел 1.3.1.2). Следовательно, $\mathbf{F}$ имеет ровно три корня в $\mathbb{R}_+^6$. Обозначим их через $\mathbf{w}^-$, $\bar{\mathbf{w}}$ и $\mathbf{w}^+$, где $\mathbf{w}^+ = \mathbf{0} < \bar{\mathbf{w}} < \mathbf{w}^-$ (здесь и всюду далее неравенства для векторов означают, что каждая компонента векторов удовлетворяет этому неравенству). Более того, предположения (1.1.6) гарантируют, что главное собственное значение матрицы якобиана $\mathbf{F}$ точках $\mathbf{w}^\pm$ ($\bar{\mathbf{w}}$) отрицательно (соответственно, положительно) (см. раздел 1.3.2.3). Следовательно, нелинейность $\mathbf{F}$ имеет две устойчивые точки.

Нетрудно показать, что F_i удовлетворяют следующему свойству для $j \neq i$:

$$\frac{\partial F_i}{\partial w_j}(\mathbf{w}) \geq 0, \text{ если } w_k \geq 0 \text{ для } 1 \leq k \leq 5 \text{ и } T < T_0.$$

Таким образом, система монотонна в области $\mathbb{R}^6$, включающей в себя положительный корень $\mathbf{F}$. Как следствие, система удовлетворяет ряду свойств, аналогичным таковым для скалярного уравнения, включая принцип максимума.

1.2 Существование, устойчивость и скорость распространения авто- волновых решений

Как будет показано в разделе 1.3.1.2 для более общего случая, стационарные точки системы (1.1.2) находятся во взаимно однозначном соответствии с корнями многочлена $P(T)$. Это утверждение позволяет нам сформулировать следующую теорему:

Теорема 1.2.1. *Предположим, что $P(T^-) = 0$ для некоторого $T^- > 0$ и $P'(0) \neq 0$, $P'(T^-) \neq 0$. Пусть $\mathbf{w}^*$ — соответствующая стационарная точка (1.1.2), заданная отношениями (1.1.4). Если существует положительный корень полинома $P(T)$ в интервале $0 < T < T^-$, то система (1.1.2) обладает монотонно убывающими автоволновыми решениями $\mathbf{w}(x, t) = \mathbf{u}(x - ct)$ уравнения*

$$D\mathbf{u}'' + c\mathbf{u}' + \mathbf{F}(\mathbf{u}) = \mathbf{0}, \quad \mathbf{u}(\pm\infty) = \mathbf{w}^\pm, \quad (1.2.1)$$

для единственного значения скорости c .

Доказательство теоремы 1.2.1 следует из общих результатов о существовании автоволновых решений в монотонных системах уравнений [264, 265]. Монотонные автоволновые решения для монотонных систем являются асимптотически устойчивыми [264, 265], откуда следует глобальная устойчивость таких решений в двустойчивом случае.

1.2.1 Оценка скорости распространения автоволны

Расчет точного значения скорости распространения волны в рассматриваемой системе представляет собой трудную задачу, однако мы можем получить некоторые аналитические оценки. Автоволна будет являться решением следующей системы:

$$\begin{aligned} Du_i'' + cu_i' + \alpha_i(\beta_i T - u_i) &= 0, \quad i = 1, 2, 3, \\ Du_4'' + cu_4' + \alpha_4(\beta_4 u_3 - u_4) &= 0, \\ Du_5'' + cu_5' + \alpha_5(\beta_5 u_4 + \gamma u_2 u_4 - u_5) &= 0, \\ DT'' + cT' + \alpha_6 u_5(1 + \delta u_1) \left(1 - \frac{T}{T_0}\right) - \sigma T &= 0, \end{aligned} \quad (1.2.2)$$

с пределами на бесконечности:

$$\mathbf{u}(\pm\infty) = \mathbf{u}^\pm.$$

Перепишем систему (1.2.2) в следующем виде:

$$\begin{aligned} Du_i'' + cu_i' + \frac{1}{\varepsilon} G^i(u_1, \dots, u_5, T) &= 0, \quad i = 1, \dots, 5 \\ DT'' + cT' + F_6(u_1, \dots, u_5, T) &= 0, \end{aligned} \quad (1.2.3)$$

где ε — это некоторый малый параметр, $G^i = \bar{\varepsilon}F_i$. При $\varepsilon = \bar{\varepsilon}$ система (1.2.3) совпадает с системой (1.2.2). Для системы (1.2.3) функции $\varphi_i(u)$, заданные (1.3.8), удовлетворяют следующему свойству:

$$G^i(\varphi_1(u), \dots, \varphi_5(u), T) = 0, \quad i = 1, \dots, 5. \quad (1.2.4)$$

Функции $\varphi_i(u)$ непрерывны как и их производные второго порядка, и $\varphi'_i(u) \neq 0$, $i = 1, \dots, 5$. Если мы совершим формальный переход к пределу $\varepsilon \rightarrow 0$ в (1.2.3), то $u_i \rightarrow \varphi_i(u)$, и подставив их в последнее уравнение, мы получим:

$$T'' + cT' + F_6(\varphi_1(T), \dots, \varphi_5(T), T) = 0, \quad T(\pm\infty) = T^\pm, \quad (1.2.5)$$

где $F_6(\varphi_1(T), \dots, \varphi_5(T), T) = P(T)$ — полином из (1.1.5). Справедлива следующая теорема:

Теорема 1.2.2. *Скорость распространения автоволны в системе (1.2.3) сходится к скорости распространения автоволны в уравнении (1.2.5) при $\varepsilon \rightarrow 0$.*

Доказательство. Следующие оценки могут быть получены из минимаксного представления скорости волны в двустойчивом случае [264, 265]:

$$\min \left(\inf_x S_1(\boldsymbol{\rho}), \dots, \inf_x S_6(\boldsymbol{\rho}) \right) \leq c \leq \max \left(\sup_x S_1(\boldsymbol{\rho}), \dots, \sup_x S_6(\boldsymbol{\rho}) \right), \quad (1.2.6)$$

где

$$S_i(\boldsymbol{\rho}) = \frac{\rho''_i + \frac{1}{\varepsilon}G^i(\boldsymbol{\rho})}{-\rho'_i}, \quad i = 1, \dots, 5, \quad S_6(\boldsymbol{\rho}) = \frac{\rho''_6 + F_6(\boldsymbol{\rho})}{-\rho'_6},$$

$\boldsymbol{\rho} = (\rho_1, \dots, \rho_6)$ — произвольная пробная функция, непрерывная вместе со своими вторыми производными, монотонно убывающая (покомпонентно) и имеющая те же пределы на бесконечности, что и автоволна: $\boldsymbol{\rho}(+\infty) = 0$, $\boldsymbol{\rho}(-\infty) = \mathbf{u}^-$.

Выберем следующие пробные функции:

$$\rho_i = \varphi_i(u_0) + \varepsilon_i H_i, \quad i = 1, \dots, 5, \quad \rho_6 = u_0, \quad (1.2.7)$$

где u_0 — решение уравнения (1.2.5), а H_i , $i = 1, \dots, 5$ — функции, непрерывные со своими вторыми производными, точные выражения для которых мы определим ниже.

Пренебрегая членами второго порядка по ε , мы получаем:

$$S_6(\boldsymbol{\rho}) = \frac{u''_0 + F(\varphi_1(u_0) + \varepsilon H_1, \dots, \varphi_5(u_0) + \varepsilon H_5, u_0)}{-u'_0} =$$

$$\frac{u''_0 + F(\varphi_1(u_0), \dots, \varphi_5(u_0), u_0) + \varepsilon \sum_{i=1}^5 F_{u_i}(u_0, \varphi_1(u_0), \dots, \varphi_5(u_0), u_0) H_i}{-u'_0} = c_0 + \varepsilon \Phi, \quad (1.2.8)$$

где $\Phi = \sum_{i=1}^n \frac{F_{u_i}(u_0, \varphi_1(u_0), \dots, \varphi_n(u_0)) H_i}{-u'_0}$ и c_0 — значение скорости распространения автоволны в уравнении (1.2.5). Далее, для $i = 1, \dots, 5$:

$$S_i(\rho) = \frac{\varphi''_i(u_0)(u'_0)^2 + \varphi'_i(u_0)u''_0 + \varepsilon H''_i + \frac{1}{\varepsilon} G^i(\varphi_1(u_0), \dots, \varphi_5(u_0), u_0)}{-\varphi'_i(u_0)u'_0 - \varepsilon H'_i} + \frac{\sum_{j=1}^5 G^i_{u_j}(\varphi_1(u_0), \dots, \varphi_5(u_0), u_0) H_j}{-\varphi'_i(u_0)u'_0 - \varepsilon H'_i} = \frac{\varphi''_i(u_0)(u'_0)^2 + \varphi'_i(u_0)u''_0 + \varepsilon H''_i + \sum_{j=1}^5 G^i_{u_j}(\varphi_1(u_0), \dots, \varphi_5(u_0), u_0) H_j}{-\varphi'_i(u_0)u'_0 - \varepsilon H'_i}. \quad (1.2.9)$$

Обозначим $F(\varphi_1(u_0), \dots, \varphi_n(u_0), u_0)$ как F и $G^i_{u_j}(\varphi_1(u_0), \dots, \varphi_5(u_0), u_0)$ как $G^i_{u_j}$. Если мы выберем функции H_i , $i = 1, \dots, 5$ такими, что

$$\begin{pmatrix} G^1_{u_1} & G^1_{u_2} & \dots & G^1_{u_5} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ G^5_{u_1} & G^5_{u_2} & \dots & G^5_{u_5} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} H_1 \\ \dots \\ H_5 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\varphi''_1(u_0)(u'_0)^2 + \varphi'_1(u_0)F \\ \dots \\ -\varphi''_5(u_0)(u'_0)^2 + \varphi'_5(u_0)F \end{pmatrix}, \quad (1.2.10)$$

считая, что матрица G' в левой части необратима, то будет выполнено

$$S_i(\rho) = \frac{\varphi'_i(u_0)(u''_0 + F(\varphi_1(u_0), \dots, \varphi_n(u_0), u_0)) + \varepsilon H''_i}{-\varphi'_i(u_0)u'_0 - \varepsilon H'_i} = c_0 + \varepsilon \Psi_i, \quad i = 1, \dots, 5, \quad (1.2.11)$$

где $\Psi_i = \frac{-H''_i - c_0 H'_i}{\varphi'_i(u_0)u'_0}$, $i = 1, \dots, 5$, c_0 — скорость распространения автоволны в уравнении (1.2.5). Таким образом, мы получаем окончательную оценку на скорость распространения волны в (1.2.3):

$$c_0 + \varepsilon \max \left\{ \min_x \Phi, \min_x \Psi_1, \dots, \min_x \Psi_5 \right\} \leq c \leq c_0 + \varepsilon \min \left\{ \max_x \Phi, \max_x \Psi_1, \dots, \max_x \Psi_5 \right\}, \quad (1.2.12)$$

и, принимая во внимание тот факт, что Φ, Ψ_i , $i = 1, \dots, 5$ ограничены, мы получаем доказательство теоремы.

Остается проверить, что матрица G' необратима. Получим явные выражения для функций H_i , $i = 1, \dots, 5$ для системы (1.2.3). Матрица $\frac{1}{\varepsilon} G'$ имеет следующий вид:

$$\begin{pmatrix} -\alpha_1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -\alpha_2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -\alpha_3 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \alpha_4 \beta_4 & -\alpha_4 & 0 \\ 0 & \alpha_5 \gamma \varphi_4(u_0) & 0 & \alpha_5 (\beta_5 + \gamma \varphi_2(u_0)) & -\alpha_5 \end{pmatrix}$$

Таким образом, решая систему (1.2.10), мы получаем:

$$H_i = -\frac{1}{\alpha_i} \bar{\varepsilon} (-\varphi_i(u_0)(u'_0)^2 + \varphi_i(u_0)F), \quad i = 1, \dots, 3, \quad (1.2.13)$$

$$H_4 = -\frac{1}{\alpha_4} (\bar{\varepsilon} (-\varphi_4(u_0)(u'_0)^2 + \varphi_4(u_0)F) - \alpha_4 \beta_4 H_3), \quad (1.2.14)$$

$$H_5 = -\frac{1}{\alpha_5} (\bar{\varepsilon} (-\varphi_5(u_0)(u'_0)^2 + \varphi_5(u_0)F) - \alpha_5 \gamma \varphi_4(u_0) H_2 - \alpha_5 (\beta_5 + \gamma \varphi_2(u_0)) H_4), \quad (1.2.15)$$

где $\varphi_i(u_0)$ заданы выражениями (1.3.8), а u_0 — решение (1.2.5). Функции H_i , $i = 1, \dots, 5$ непрерывны со своими вторыми производными и превращают (1.2.10) в тождество. Таким образом, подставляя их в (1.2.6), мы получаем оценку (1.2.12). Теорема доказана. $\square$

Скорость распространения автоволны в уравнении (1.2.5) положительна тогда и только тогда, когда

$$\int_{T^+}^{T^-} P(T) dT > 0.$$

Как следует из теоремы 1.2.2, данное неравенство дает нам приближенное условие на положительность скорости автоволны в исходной системе. Более того, для уравнения (1.2.5) мы можем получить приближенные значения скорости распространения волны. Уравнение (1.2.5) задает скорость распространения волны в уравнении

$$\frac{\partial T}{\partial t} = DT'' + P(T), \quad (1.2.16)$$

полученной методом квази-стационарного приближения для уравнения на концентрации всех факторов, кроме тромбина (T), с $P(T)$ заданным (1.3.11).

Перейдем к безразмерным переменным аналогично тому, как это было сделано в [108]:

$$T = T_0 u, \quad t = \frac{\tilde{t}}{h_2}, \quad D = \tilde{D} h_2, \quad (1.2.17)$$

тогда модель (1.2.16) принимает вид:

$$\frac{\partial u}{\partial \tilde{t}} = \tilde{D} \Delta u + M_1 u (1 + M_2 u) (1 + M_3 u) (1 - u) - u, \quad (1.2.18)$$

где:

$$M_1 = \frac{\alpha_6 \beta_3 \beta_4 \beta_5}{\sigma}, \quad M_2 = \beta_2 \gamma, \quad M_3 = \beta_1 \delta.$$

Заметим, что скорости активации протромбина и фактора X комплексом протромбиназы и комплексом внутренней теназы соответственно существенно выше, чем скорости активации этих факторов фактором X и фактором IX, соответственно [92]. Таким образом, мы можем пренебречь соответствующими слагаемыми в правой части и записать окончательно упрощенное уравнение:

$$\frac{\partial u_1}{\partial \tilde{t}} = \tilde{D} \Delta u_1 + b u_1^3 (1 - u_1) - u_1, \quad (1.2.19)$$

где $b = M_1 M_2 M_3$, или, в более общей форме,

$$\frac{\partial u}{\partial t} = D\Delta u + bu^n(1-u) - \sigma u. \quad (1.2.20)$$

Для такого уравнения мы можем получить аналитические оценки скорости распространения автоволны, удовлетворяющей уравнению:

$$Dw'' + cw' + bw^n(1-w) - \sigma w = 0. \quad (1.2.21)$$

Ниже мы рассмотрим два способа аналитической оценки скорости решения уравнения (1.2.21).

1.2.1.1 Метод узкой зоны реакции. Одним из методов оценки скорости распространения автоволнового решения в уравнении типа реакция-диффузия является метод узкой зоны реакции, разработанный в теории горения [266]. Перепишем уравнение (1.2.21) в виде:

$$Dw'' + cw' + F(w) - \sigma w = 0, \quad F(w) = w^n(1-w). \quad (1.2.22)$$

Предположим, что реакция происходит в единственной точке пространства: $x = 0$ в координатах фронта волны. Тогда вне зоны реакции можно рассмотреть следующие линейные уравнения:

$$\begin{cases} Dw'' + c_1 w' - \sigma w = 0, & x > 0, \\ Dw'' + c_1 w' = 0, & x < 0. \end{cases} \quad (1.2.23)$$

Запишем условия перехода в зоне реакции. В зоне реакции мы можем пренебречь значением w' , так как оно мало в сравнении с остальными членами:

$$Dw'' + F(w) = 0. \quad (1.2.24)$$

Домножая (1.2.24) на w' и интегрируя по зоне реакции, получим следующие условия перехода:

$$(w'(+0))^2 - (w'(-0))^2 = \frac{2}{D} \int_0^{w^*} F(w) dw, \quad (1.2.25)$$

которые должны быть дополнены условием непрерывности решения: $w(+0) = w(-0)$.

Решая (1.2.23), получаем:

$$w = \begin{cases} w_*, & x < 0, \\ w_* \exp\left(x \frac{-c - \sqrt{c^2 + 4D\sigma}}{2D}\right), & x > 0. \end{cases} \quad (1.2.26)$$

Тогда, используя (1.2.25) и (1.2.26), мы получаем следующее уравнение на приближенное значение скорости автоволны:

$$c_1^2 + c_1 \sqrt{c_1^2 + 4D\sigma} + 2D\sigma = A, \quad A = \frac{4D}{w_*^2} \int_0^{w_*} F(w)dw. \quad (1.2.27)$$

Таким образом,

$$c_1 = \frac{A - 2D\sigma}{\sqrt{2A}}, \quad A = 4bD \left(\frac{w_*^{n-1}}{n+1} - \frac{w_*^n}{n+2} \right). \quad (1.2.28)$$

Формула (1.2.28) дает хорошее приближение численной скорости распространения волны для $n \geq 3$. Точность приближения тем выше, чем больше значение n (рис. 3.2).

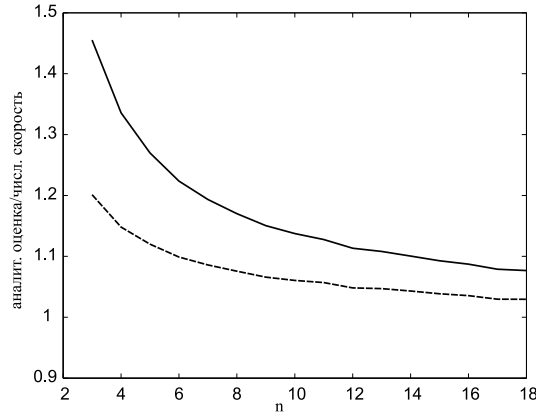


Рис. 3.2: Отношение аналитических оценок и численной скорости распространения волны тромбина для разных значений n ; $\sigma = 0.01$, $D = 2$, $b = 10$. Сплошная линия — метод узкой зоны реакции (c/c_1 , (1.2.28)), пунктир — кусочно-линейное приближение (c/c_2 , (1.2.40)).

Утверждение 1.2.1. *Метод узкой зоны реакции дает оценку снизу.*

Доказательство. Рассмотрим уравнение (1.2.22) и для простоты положим, что $F(u) = 0$ для $u \leq u_0$ и $F(u) > 0$ для $u_0 < u < 1$. Пусть u^* — максимальный корень уравнения $F(u) = \sigma u$ (рис. 3.3). Мы ищем убывающее решение уравнения (1.2.22) с пределами на бесконечности:

$$u(-\infty) = u^*, \quad u(+\infty) = 0.$$

Умножая уравнение (1.2.22) на u' и интегрируя по всей оси, получаем:

$$c = \frac{\int_0^{u^*} F(u)du - \frac{1}{2}\sigma(u^*)^2}{\int_{-\infty}^{\infty} (u'(x))^2 dx}. \quad (1.2.29)$$

Вместе с уравнением (1.2.22) рассмотрим систему двух уравнений первого порядка:

$$\begin{cases} u' = p, \\ p' = -cp - F(u) + \sigma u. \end{cases} \quad (1.2.30)$$

Автоволновое решение уравнения (1.2.22) соответствует траектории, соединяющей стационарные точки $(u^*, 0)$ и $(0, 0)$ (рис. 3.3). Эта траектория совпадает с линией $p = \lambda u$ для $0 < u \leq u_0$, где λ — отрицательное решение уравнения

$$\lambda^2 + c\lambda - \sigma = 0.$$

Интеграл в знаменателе (1.2.29) может быть приближен, если мы заменим траекторию функции прямой линией $p = -\lambda u$:

$$\int_{-\infty}^{\infty} (u'(x))^2 dx = \int_0^{u^*} p(u) du \approx \frac{1}{2} \lambda (u^*)^2.$$

Подставляя это выражение в (1.2.29), мы получаем приближенное значение скорости распространения автоволны, эквивалентное скорости, полученной методом узкой зоны реакции (1.2.28).

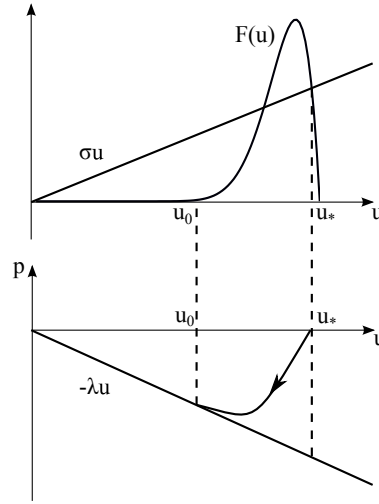


Рис. 3.3: Иллюстрация идеи метода узкой зоны реакции.

Таким образом, метод узкой зоны реакции эквивалентен замене траектории уравнения на прямую. Отсюда можно заключить, что этот метод дает оценку скорости снизу, а также дает асимптотически точный результат в предельном случае при стремлении носителя функции $F(u)$ к точке.

□

1.2.1.2 Кусочно-линейное приближение. Перепишем уравнение (1.2.22) в виде

$$Dw'' + cw' + f(w) = 0,$$

где $f(w) = w^n(1 - w) - \sigma w$ и $f(0) = f(w_*) = 0$, и рассмотрим следующее приближение этого уравнения:

$$Dw'' + c_2w' + f_0(w) = 0, \quad (1.2.31)$$

где

$$f_0(w) = \begin{cases} \alpha w, & 0 < w < w_0, \\ \beta(w - w_*), & w_0 < w < w_*, \end{cases}, \quad \alpha = f'(0), \quad \beta = f'(w_*). \quad (1.2.32)$$

Для уравнения (1.2.20) выполнено:

$$\alpha = -\sigma, \quad \beta = bnw_*^{n-1} - b(n+1)w_*^n - \sigma. \quad (1.2.33)$$

Значение w_0 может быть получено из дополнительного условия:

$$\int_0^{w_*} f(w)dw = \int_0^{w_*} f_0(w)dw. \quad (1.2.34)$$

Таким образом, мы получаем следующее уравнение относительно w_0 :

$$\frac{\alpha - \beta}{2}w_0^2 + \beta w_* w_0 + r = 0, \quad \text{где } r = -\beta w_*^2 - \int_0^{w_*} f(w)dw. \quad (1.2.35)$$

Для явного вида рассматриваемой функции $f(w)$ мы имеем:

$$r = bw_*^{n+1} \left(-\frac{n}{2} - \frac{b}{n+1} \right) + bw_*^{n+2} \left(\frac{n+1}{2} + \frac{1}{n+2} \right) + \sigma w_*^2. \quad (1.2.36)$$

Из (1.2.35) получаем:

$$w_0 = \frac{-\beta w_* + \sqrt{\beta^2 w_*^2 - 2(\alpha - \beta)r}}{\alpha - \beta}. \quad (1.2.37)$$

Таким образом, вместо (1.2.31) мы рассматриваем следующие уравнения:

$$\begin{cases} Dw'' + cw' + \beta(w - w_*) = 0, & x < 0, \\ Dw'' + cw' + \alpha w = 0, & x > 0, \end{cases} \quad (1.2.38)$$

и дополнительные условия на непрерывность решения и его первой производной:

$$w(0) = w_0, \quad w'(-0) = w'(+0).$$

Мы получаем решение в явном виде:

$$\begin{cases} w = (w_0 - w_*) \exp \left(x \frac{\sqrt{c_2^2 - 4\beta D} - c_2}{2D} \right) + w_*, & x < 0, \\ w = w_0 \exp \left(x \frac{-\sqrt{c_2^2 - 4\alpha D} - c_2}{2D} \right), & x > 0. \end{cases} \quad (1.2.39)$$

Из условия непрерывности решения и его производной получаем окончательную формулу:

$$c_2 = \frac{\sqrt{D}(\alpha \bar{w}^2 - \beta)}{\sqrt{(\bar{w} - 1)(\alpha \bar{w}^2 - \beta \bar{w})}}, \quad \bar{w} = \frac{w_0}{w_0 - w_*}. \quad (1.2.40)$$

Данная формула дает хорошее приближение скорости распространения автоволны в уравнении (1.2.22) (рис. 3.2).

1.2.1.3 Сравнение аналитической оценки с результатами вычислений для системы (1.1.1). Возвращаясь к исходной системе (1.1.2), получаем:

$$b = \alpha_5 \beta_2 \beta_3 \beta_4 \beta_5 \gamma \delta, \quad (1.2.41)$$

$$\bar{T} = \frac{T_*}{T_* - T_0}, \quad T_* = \frac{-3bT_0^2 + 4bT_0^4 + \sigma}{4bT_0^2 - 3bT_0} + \frac{\sqrt{(3bT_0^2 - 4bT_0^3 - \sigma)^2 - 2b(4T_0 - 3)T_0^2 \left(-\frac{3}{2}bT_0^2 - \frac{b^2}{4}T_0^2 + \frac{11}{5}bT_0^3 + \sigma\right)}}{4bT_0^2 - 3bT_0}, \quad (1.2.42)$$

и оценки (1.2.28) и (1.2.40) принимают вид:

$$c_1 = \sqrt{D} \frac{bT_0^2 - \frac{4}{5}bT_0^3 - 2\sigma}{\sqrt{2 \left(bT_0^2 - \frac{4}{5}bT_0^3\right)}}, \quad (1.2.43)$$

$$c_2 = \frac{\sqrt{D} (-3bT_0^2 - \sigma\bar{T} + 4bT_0^3 - \sigma)}{\sqrt{(T_0 - 1)\bar{T} (-\sigma\bar{T} - 3bT_0^2 + 4bT_0^3 + \sigma)}}. \quad (1.2.44)$$

Полученные аналитические оценки можно сравнить с найденной численно скоростью распространения тромбина в модели (1.1.1) (рис. 3.4). Скорость распространения автоволны в модели, состоящей из одного уравнения (1.2.5), выше, чем скорость распространения тромбина в модели (1.1.2). Аналитические оценки скорости для одного уравнения, в свою очередь, дают оценку снизу (рис. 3.2). В результате, аналитические оценки скорости для одного уравнения дают лучшее приближение скорости распространения волны в системе (1.1.2), чем численная скорость волны в уравнении (1.2.19). Более того, из двух аналитических оценок, оценка, полученная методом узкой зоны реакции, дает значение скорости ближе к результатам моделирования в модели (1.2.5), чем кусочно-линейное приближение.

1.3 Существование решений типа пульс

Сходимость решения системы к автоволне определяется величиной начального условия. Пороговое значение начального условия, гарантирующее сходимость решения к автоволне в случае одного уравнения, соответствует стационарному решению типа пульс. Этот критерий был также доказан для системы двух уравнений в особой форме [126, 127]. В данном разделе мы формулируем аналогичный результат для модели реакций каскада свертывания, и в разделах 1.3.1–1.3.3 проводим доказательство существования решений типа пульс для рассматриваемой модели основных реакций каскада свертывания крови с использованием метода Лере-Шаудера (см. раздел 3 главы 2).

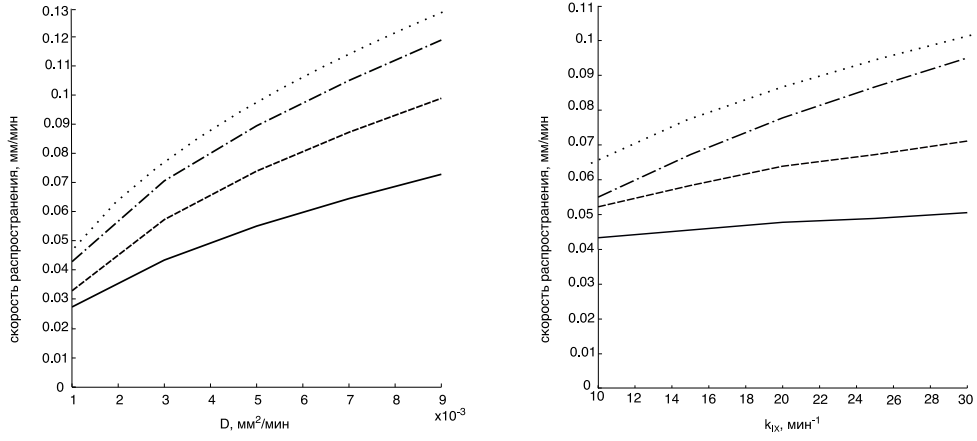


Рис. 3.4: Скорость распространения волны тромбина при разных значениях D (слева) и k_{IX} (справа). Сплошная линия — численная скорость в модели (1.1.1), точки — численная скорость в уравнении (1.2.5), пунктир — оценка, полученная методом узкой зоны реакции (1.2.43), штрихпунктир — кусочно-линейное приближение (1.2.44). Параметры расчетов приведены в разделе 2 приложения].

Стационарные решения системы (1.1.2) удовлетворяют эллиптической системе:

$$\begin{aligned}
 Dw''_i + \alpha_i(\beta_i T - w_i) &= 0, \quad i = 1, 2, 3, \\
 Dw''_4 + \alpha_4(\beta_4 w_3 - w_4) &= 0, \\
 Dw''_5 + \alpha_5(\beta_5 w_4 + \gamma w_2 w_4 - w_5) &= 0, \\
 DT'' + \alpha_6 w_5(1 + \delta w_1) \left(1 - \frac{T}{T_0}\right) - \sigma T &= 0.
 \end{aligned} \tag{1.3.1}$$

В дальнейшем мы будем рассматривать систему (1.3.1) на вещественной оси и искать четное положительное решение, обращающееся в нуль на бесконечности:

$$\mathbf{w}(x) > \mathbf{0}, \quad \mathbf{w}(x) = \mathbf{w}(-x), \quad x \in \mathbb{R}, \quad \mathbf{w}(\pm\infty) = \mathbf{0}.$$

Такие решения мы будем называть решениями типа пульс. Вместо задачи на всей оси мы можем рассмотреть систему (1.3.1) на полуоси $\mathbb{R}_+$ с граничным условием

$$\mathbf{w}'(0) = \mathbf{0}. \tag{1.3.2}$$

Мы ищем убывающие решения, определенные на $\mathbb{R}_+$, и такие, что:

$$\mathbf{w}'(0) = \mathbf{0}, \quad \mathbf{w}(x) > \mathbf{0} \text{ и } \mathbf{w}'(x) < \mathbf{0} \text{ для } x > 0, \quad \mathbf{w}(\infty) = \mathbf{0}. \tag{1.3.3}$$

Тогда решение типа пульс может быть получено через отражение этого решения на $\mathbb{R}$ в силу симметрии. Сформулируем основную теорему.

Теорема 1.3.1. *При выполнении условия (1.1.6) задача (1.3.1) имеет решение на $\mathbb{R}_+$, удовлетворяющее (1.3.3), тогда и только тогда, когда значение скорости c в задаче (1.2.1) положительно.*

Теорема 1.3.1 легко доказывается для случая скалярного уравнения. Действительно, предположим, что мы имеем дело с некоторым скалярным уравнением с нелинейной правой частью F с двумя положительными устойчивыми особыми точками. Тогда скорость c распространения автоволны для скалярной задачи (1.2.1) имеет знак интеграла $\int_0^{w^-} F(s)ds$. Далее, если мы перепишем скалярное уравнение для решения типа пульс в виде:

$$\begin{cases} w' = p, \\ p' = -F(w), \end{cases} \quad (1.3.4)$$

то можно легко показать, что:

$$\frac{w'(x)^2}{2} = - \int_0^{w(x)} F(s)ds.$$

Отсюда следует, что условие $\int_0^{w^-} F(s)ds > 0$ необходимо и достаточно для существования решений типа пульс, что доказывает теорему 1.3.1 для двустойчивого скалярного уравнения.

Для систем уравнений положительность интеграла не является достаточным условием для заключения о существовании решения типа пульс и/или положительности скорости автоволны. Тем не менее, связь между знаками скорости волны и наличием решений типа пульс может сохраняться, как было впервые показано в [126] и [127] для монотонных систем двух уравнений. В данном разделе мы получим такой результат для рассматриваемой реакционно-диффузионной модели каскада свертывания крови. Как и в случае работ [126, 127], доказательство имеет существенно более сложную структуру по сравнению со скалярным случаем и опираются на метод Лере-Шаудера (см. раздел 3 главы 2). Данный метод предполагает построение некоторой подходящей гомотопической деформации. Основная идея заключается в том, чтобы свести последнее уравнение в системе (1.3.1) к некоторому скалярному уравнению, которое зависит только от T . В то же время, мы хотим, чтобы свойства исходной системы оставались неизменными, и чтобы знак скорости волны в предположение, что $c > 0$ для задачи (1.2.1), сохранялся. Мы начнем описание построения гомотопии в разделе 1.3.1. Затем, в разделе 1.3.2 будет показана отделимость монотонных решений и мы получим априорные оценки этих решений независимо от гомотопического параметра. Раздел 1.3.3 посвящен доказательству части существования в теореме 1.3.1. Наконец, мы сделаем некоторые заключительные замечания в разделе 1.4.

1.3.1 Гомотопия

1.3.1.1 Описание. Рассмотрим гомотопию системы (1.3.1) следующего вида:

$$\mathbf{D}\mathbf{w}'' + \mathbf{F}^\tau(\mathbf{w}) = \mathbf{0}, \quad \tau \in [0, 1], \quad (1.3.5)$$

где только последняя компонента реакционного члена $F_6^\tau(\mathbf{w})$ изменяется при изменении $\tau \in [0, 1]$. Тогда гомотопная система имеет вид:

$$\begin{aligned} Dw_1'' + \alpha_1(\beta_1 T - w_1) &= 0, \\ Dw_2'' + \alpha_2(\beta_2 T - w_2) &= 0, \\ Dw_3'' + \alpha_3(\beta_3 T - w_3) &= 0, \\ Dw_4'' + \alpha_4(\beta_4 w_3 - w_4) &= 0, \\ Dw_5'' + \alpha_5(\beta_5 w_4 + \gamma w_2 w_4 - w_5) &= 0, \\ DT'' + F_6^\tau(w) &= 0. \end{aligned} \quad (1.3.6)$$

При $\tau = 0$ гомотопия совпадает с исходной системой (1.3.1) и мы имеем

$$F_6^0(\mathbf{w}) = F_6(\mathbf{w}) = \alpha_6 w_5 (1 + \delta w_1) \left(1 - \frac{T}{T_0}\right) - \sigma T, \quad (1.3.7)$$

то есть F_6^0 является нелинейной функцией переменных w_1 , w_5 и T .

В процессе гомотопической трансформации мы редуцируем F_6^0 до некоторого нелинейного выражения F_6^1 , которое будет зависеть только от переменной T . Мы также потребуем, чтобы нули функции $\mathbf{F}^\tau$ в $\mathbb{R}_+^6$ оставались неизменными при изменении τ от 0 до 1 и совпадали с нулями исходной нелинейности правой части $\mathbf{F} = (F_1, \dots, F_6)$.

Для того, чтобы построить функцию $F_6^\tau(\mathbf{w})$, введем дополнительные функции $\varphi_i(T)$, $i = 1, \dots, 5$, полученные из уравнений $F_i(\mathbf{w}) = 0$ для $i = 1, \dots, 5$:

$$\begin{aligned} w_i &= \beta_i T \equiv \varphi_i(T), \quad i = 1, 2, 3, \\ w_4 &= \beta_4 \beta_3 T \equiv \varphi_4(T), \\ w_5 &= \beta_4 \beta_3 T (\beta_5 + \gamma \beta_2 T) \equiv \varphi_5(T). \end{aligned} \quad (1.3.8)$$

Также дополнительно введем некоторую гладкую функцию $g(T)$, которая будет определена ниже, таким образом, чтобы она не меняла нули функции в процессе гомотопии (другие свойства, касающиеся положительности скорости распространения волны, будут сформулированы в разделе 1.3.3.1).

Окончательно гомотопия определяется следующим образом. Для $\tau \in [0, \tau_1]$, где $\tau_1 \in (0, 1)$ (например, $\tau_1 = 1/2$) мы полагаем

$$F_6^\tau(\mathbf{w}) = \alpha_6 w_5 (1 + \delta w_1) \left(1 - \frac{T}{T_0}\right) - \sigma T + \tau g(T), \quad (1.3.9)$$

в то время как для $\tau \in (\tau_1, 1]$ мы рассматриваем

$$F_6^\tau(\mathbf{w}) = \alpha_6 [\alpha^\tau w_5 + \beta^\tau \varphi_5(T)] (1 + \delta [\alpha^\tau w_1 + \beta^\tau \varphi_1(T)]) \left(1 - \frac{T}{T_0}\right) - \sigma T + \tau_1 g(T), \quad (1.3.10)$$

$$\text{где } \alpha^\tau = \frac{1 - \tau}{1 - \tau_1}, \quad \beta^\tau = \frac{\tau - \tau_1}{1 - \tau_1}.$$

Для $\tau \in [0, \tau_1]$ целесообразно положить $\alpha^\tau = 1$ и $\beta^\tau = 0$, так что формула (1.3.10) будет так же верна для $\tau \in [0, \tau_1]$.

1.3.1.2 Неподвижные точки системы. Прежде, чем приступить к исследованию особых точек $\mathbf{F}^\tau$, внесем следующие предварительные замечания. Для $\tau = 0$ нули функции заданы уравнениями

$$w_i = \varphi_i(T) \text{ для } 1 \leq i \leq 5, \quad \alpha_6 \varphi_5(T) (1 + \delta \varphi_1(T)) \left(1 - \frac{T}{T_0}\right) - \sigma T = 0.$$

Таким образом, прямая проверка показывает, что

$$\alpha_6 \varphi_5(T) (1 + \delta \varphi_1(T)) \left(1 - \frac{T}{T_0}\right) - \sigma T \equiv P(T) = aT^4 + bT^3 + cT^2 + dT, \quad (1.3.11)$$

где

$$\begin{aligned} a &= -\alpha_6 \beta_1 \beta_2 \beta_3 \beta_4 \gamma \delta T_0^{-1}, \quad c = \alpha_6 \beta_2 \beta_3 \beta_4 \gamma + \alpha_6 \beta_1 \beta_3 \beta_4 \beta_5 \delta - \alpha_6 \beta_3 \beta_4 \beta_5 T_0^{-1}, \\ b &= -\alpha_6 \beta_1 \beta_3 \beta_4 \beta_5 \delta T_0^{-1} + \alpha_6 \beta_1 \beta_2 \beta_3 \beta_4 \gamma \delta - \alpha_6 \beta_2 \beta_3 \beta_4 \gamma T_0^{-1}, \quad d = \alpha_6 \beta_3 \beta_4 \beta_5 - \sigma. \end{aligned} \quad (1.3.12)$$

Напомним, что ранее мы предположили, что полином $P(T) = TQ(T)$ имеет ровно два положительных корня $0 < \bar{T} < T^-$. Так как Q — полином третьей степени с отрицательным коэффициентом при главном члене, то

$$P < 0 \text{ при } T \in (0, \bar{T}), \quad P > 0 \text{ при } T \in (\bar{T}, T^-), \quad P < 0 \text{ при } T \in (T^-, \infty). \quad (1.3.13)$$

Стоит также заметить, что

$$T^- < T^0. \quad (1.3.14)$$

В самом деле, как следует из определения (1.3.11), $P(T) \leq -\sigma T < 0$ для $T \geq T^0$. Также напомним, что мы считаем выполненным (1.1.6), что подразумевает следующее ограничение на значения параметров

$$Q(0) = \alpha_6 \beta_3 \beta_4 \beta_5 - \sigma < 0. \quad (1.3.15)$$

Таким образом, нули функции $\mathbf{F} = (F_1, \dots, F_6)$ не изменяются, если мы заменим F_6 на следующую функцию

$$\alpha_6 [\alpha w_5 + \beta \varphi_5(T)] (1 + \delta [\alpha w_1 + \beta \varphi_1(T)]) \left(1 - \frac{T}{T_0}\right) - \sigma T,$$

где $0 \leq \alpha \leq 1$, $\beta = 1 - \alpha$. То же касается замены F_6 на

$$\alpha_6 [\alpha w_5 + \beta \varphi_5(T)] (1 + \delta [\alpha w_1 + \beta \varphi_1(T)]) \left(1 - \frac{T}{T_0}\right) - \sigma T + g(T),$$

при условии, что функция $g = g(s)$ такова, что

$$g(s) \geq 0 \text{ для } s \geq 0, \text{ supp } g \subset (\bar{T}, T^-). \quad (1.3.16)$$

В самом деле, в этом случае, уравнение на корни функции $P(T)$ имеет отличную форму только в области $P(T) > 0$, где к ней добавляется некоторый неотрицательный член.

Всюду далее мы будем полагать, что функция g удовлетворяет (1.3.16). Тогда нули функции $\mathbf{F}^\tau = (F_1, \dots, F_5, F_6^\tau)$, где F_6^τ задана (1.3.9) или (1.3.10), совпадают с нулями $\mathbf{F}$. В частности, эти функции обладают ровно тремя корнями в $\mathbb{R}_+^6$: $\mathbf{w}^-$, $\bar{\mathbf{w}}$ и $\mathbf{w}^+$.

1.3.1.3 Монотонность системы и устойчивость ее стационарных точек. Так как $\mathbf{F}$ задана (1.1.3), то

$$\frac{\partial F_i}{\partial w_j}(\mathbf{w}) \geq 0 \text{ для } i, j = 1, \dots, 6, i \neq j,$$

при условии, что

$$w \in \mathcal{D} = \{\mathbf{w} = (w_1, \dots, w_5, T), w_k \geq 0 \text{ для } 1 \leq k \leq 5, 0 \leq T < T_0\}.$$

Это свойство монотонности остается верным и для гомотопии $\mathbf{F}^\tau$. В самом деле, для этой функции выражения для $F_1^\tau, \dots, F_5^\tau$ неизменны, а для последней компоненты свойство положительности производных легко проверяется. Таким образом, для всех $\tau \in [0, 1]$ система монотонна в $\mathcal{D}$:

$$\frac{\partial F_i^\tau}{\partial w_j}(\mathbf{w}) \geq 0 \text{ для } i \neq j \text{ для } \mathbf{w} \in \mathcal{D}. \quad (1.3.17)$$

Рассмотрим далее устойчивость особых точек $\mathbf{F}^\tau$ в $\mathbb{R}_+^6$. Заметим, что благодаря (1.3.14), нули функции лежат в $\mathcal{D}$, так что внедиагональные элементы матрицы Якоби в этих точках неотрицательны. Таким образом, из теоремы Фробениуса-Перрона следует, что главное собственное значение (с.з.) матрицы, то есть с.з. с максимальной вещественной частью, действительно.

Мы также можем утверждать, что устойчивость корней правой части не изменяется при изменении τ . Точнее, для всех корней знак главного с.з. не меняется при изменении τ . В самом деле, обозначим через $\mathbf{w}^*$ некоторые корни $\mathbf{F}^\tau$ в $\mathbb{R}_+^6$. При расчете матрицы Якоби $(\mathbf{F}^\tau)'(\mathbf{w}^*)$ члены, содержащие g , исчезают вследствие (1.3.16). Таким образом, якобиан системы не меняется при изменении τ от 0 до τ_1 . Далее, рассматривая ядро этой матрицы для

$\tau \in [\tau_1, 1]$, можно показать, что

$$\ker(\mathbf{F}^\tau)'(\mathbf{w}^*) = \ker \mathbf{F}'(\mathbf{w}^*) \text{ для } \tau \in [0, 1].$$

Таким образом, ее определитель удовлетворяет следующему свойству:

$$\det(\mathbf{F}^\tau)'(\mathbf{w}^*) \neq 0 \Leftrightarrow \det \mathbf{F}'(\mathbf{w}^*) \neq 0 \Leftrightarrow \det(\mathbf{F}^1)'(\mathbf{w}^*) \neq 0, \tau \in [0, 1].$$

Если эти определители отличны от нуля, то знак главного с.з. не может измениться при изменении τ , и устойчивость нулей останется неизменна.

По построению гомотопии, для $\tau = 1$, $F_6^1(\mathbf{w})$ зависит только от T и $F_6^1(\mathbf{w}) = P(T) = TQ(T)$, заданных (1.3.11). Таким образом, знак главного с.з. матрицы $(\mathbf{F}^\tau)'(\mathbf{w}^*)$ совпадает со знаком главного с. з. матрицы $(\mathbf{F}^1)'(\mathbf{w}^*)$, имеющей вид:

$$(\mathbf{F}^1)'(\mathbf{w}^*) = \begin{pmatrix} -\alpha_1 & 0 & 0 & 0 & 0 & \alpha_1\beta_1 \\ 0 & -\alpha_2 & 0 & 0 & 0 & \alpha_2\beta_2 \\ 0 & 0 & -\alpha_3 & 0 & 0 & \alpha_3\beta_3 \\ 0 & 0 & \alpha_4\beta_4 & -\alpha_4 & 0 & 0 \\ 0 & \alpha_5\gamma w_4^* & 0 & \alpha_5(\beta_5 + \gamma w_2^*) & -\alpha_5 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \frac{\partial P}{\partial T}(\mathbf{w}^*) \end{pmatrix}.$$

Перестановкой строк и столбцов эта матрица сводится к диагональной матрице $\text{diag}(\partial P/\partial T, -\alpha_1, -\alpha_2, -\alpha_3, -\alpha_4, -\alpha_5)$, то есть с.з. $(F^1)'(\mathbf{w}^*)$ равны $-\alpha_i$, $1 \leq i \leq 5$, и $P'(T^*)$.

Таким образом, верна следующая теорема:

Теорема 1.3.2. *Существует взаимно однозначное соответствие между стационарными решениями системы (1.3.6) $\mathbf{w}^*$ и корнями T^* многочлена $P(T)$, определяемое отношениями (1.3.8). Главное собственное значение матрицы $(\mathbf{F}^\tau)'(\mathbf{w}^*)$ положительно (отрицательно) тогда и только тогда, когда $P'(T^*) > 0$ ($P'(T^*) < 0$).*

Напомним, что, в силу предположения (1.1.6), для $T^* = T^+$, $\bar{T}$ и T^- выполнено

$$P'(T^+) < 0, P'(\bar{T}) > 0, P'(T^-) < 0.$$

Таким образом, можно заключить, что для $\tau \in [0, 1]$:

$$\mathbf{F}^\tau(\mathbf{w}^\pm) = \mathbf{0}, \text{ с.з. матрицы } (\mathbf{F}^\tau)'(\mathbf{w}^\pm) \text{ имеют отрицательные действительные части,} \quad (1.3.18)$$

$$\mathbf{F}^\tau(\bar{\mathbf{w}}) = \mathbf{0}, \text{ матрица } (\mathbf{F}^\tau)'(\bar{\mathbf{w}}) \text{ имеет положительное с.з.} \quad (1.3.19)$$

1.3.2 Функциональные пространства и оценки решений

Для доказательства существования решений типа пульс в рассматриваемой системе необходимо перейти к рассмотрению взвешенных пространств.

1.3.2.1 Операторы и пространства. Мы рассматриваем систему

$$\mathbf{D}\mathbf{w}'' + \mathbf{F}^\tau(\mathbf{w}) = \mathbf{0}, \quad (1.3.20)$$

где для $\tau \in [0, 1]$ нелинейный член $\mathbf{F}^\tau$ определен, как было описано выше. Мы хотим исследовать решения (1.3.20), определенные на полуоси $x \geq 0$ и такие, что:

$$\mathbf{w}(x) > \mathbf{0} \text{ для } x \in \mathbb{R}_+, \quad \mathbf{w}'(0) = \mathbf{0}, \quad \mathbf{w}(\infty) = \mathbf{0}. \quad (1.3.21)$$

Для задания класса функций введем пространство Гельдера $C^{k+\alpha}(\mathbb{R}_+)$, состоящее из вектор-функций класса C^k , непрерывных и ограниченных на полуоси $\mathbb{R}_+$ вместе с их производными k -го порядка и такие, что их производные k -го порядка удовлетворяют условию Гельдера для экспоненты с показателем $\alpha \in (0, 1)$. Норма в таком пространстве совпадает с обычной нормой Гельдера:

$$\|f\|_{C^{k+\alpha}} = \|f\|_{C^k} + \max_{|\beta|=k} |D^\beta f|_{C^{0+\alpha}},$$

где

$$\|f\|_{C^k} = \max_{|\beta| \leq k} \sup_{x \in \mathbb{R}_+} |D^\beta f(x)|, \quad |f|_{C^{0+\alpha}} = \sup_{x \neq y \in \mathbb{R}_+} \frac{|f(x) - f(y)|}{|x - y|^\alpha}.$$

Положим

$$E^1 = \{\mathbf{w} \in C^{2+\alpha}(\mathbb{R}_+), \mathbf{w}'(0) = \mathbf{0}\}, \quad E^2 = C^\alpha(\mathbb{R}_+).$$

Далее, введем взвешенные пространства E_μ^1 и E_μ^2 , где $\mu(x) = \sqrt{1+x^2}$, с соответствующими нормами:

$$\|\mathbf{w}\|_{E_\mu^i} = \|\mathbf{w}\mu\|_{E^i}, \quad i = 1, 2.$$

Принимая во внимание (1.3.20), рассмотрим оператор

$$\mathbf{A}^\tau(\mathbf{w}) = \mathbf{D}\mathbf{w}'' + \mathbf{F}^\tau(\mathbf{w}), \quad (1.3.22)$$

действующий из E_μ^1 в E_μ^2 . Тогда оператор, линеаризованный вокруг любой функции из E_μ^1 , является фредгольмовым и имеет нулевой индекс. Нелинейный оператор является собственным на замкнутых ограниченных множествах. Таким образом, прообраз компактного множества в E_μ^2 компактен в любом замкнутом ограниченном множестве в E_μ^1 .

1.3.2.2 Оценки априори для монотонных решений. В данном разделе мы рассматриваем решения (1.3.20)-(1.3.21), убывающие на $\mathbb{R}_+$, то есть решения типа пульс. Прежде всего, получим оценку в L^∞ для этих решений.

Утверждение 1.3.1. *Предположим, что система (1.3.20) имеет решение $\mathbf{w}(x)$, определенное для $x \geq 0$ и удовлетворяющее (1.3.3). Тогда*

$$\mathbf{w}(x) \leq \mathbf{w}^- \text{ для } x \geq 0, \quad (1.3.23)$$

где $\mathbf{w}^-$ — максимальный корень $\mathbf{F}$. В частности, $\mathbf{w}(x) \in \mathcal{D}$ для всех $x \geq 0$.

Доказательство. Напомним, что координаты $\mathbf{w}^-$ равны $\varphi_i(T^-)$, $1 \leq i \leq 5$, и T^- , где T^- — максимальный корень P . Сформулируем промежуточный результат.

Лемма 1.3.1. *Существует гладкая функция $\Psi(s) = (\psi_1(s), \dots, \psi_6(s))$, определенная для $s \geq 0$ такая, что*

$$\begin{aligned} \Psi(0) &= \mathbf{w}^-, \psi'_i(s) > 0 \text{ для } s > 0, \psi_i(s) \rightarrow \infty \text{ при } s \rightarrow \infty, \\ \mathbf{F}^\tau(\Psi(s)) &< 0 \text{ для } s > 0 \text{ и } \tau \in [0, 1]. \end{aligned} \quad (1.3.24)$$

В частности, $\Psi(s) > \mathbf{w}^-$ для $s > 0$.

Доказательство. Рассмотрим функцию Ψ^0 с координатами:

$$\psi_i^0(s) = \varphi_i(T^- + s), \quad i = 1, \dots, 5, \quad \psi_6^0(s) = T^- + s. \quad (1.3.25)$$

Видно, что

$$\Psi^0(0) = \mathbf{w}^-, \quad (\psi_i^0)'(s) > 0 \text{ для } s > 0, \quad \psi_i^0(s) \rightarrow \infty \text{ при } s \rightarrow \infty, \quad (1.3.26)$$

и, так как $P < 0$ на (T^-, ∞) , то (см. (1.3.13)),

$$F_i(\Psi^0(s)) = 0, \quad F_6^\tau(\Psi^0(s)) = P(T^- + s) < 0 \text{ при } s > 0 \text{ и } \tau \in [0, 1]. \quad (1.3.27)$$

Далее, рассмотрим следующую модификацию функции Ψ^0 :

$$\psi_i(s) = \varphi_i(T^- + \kappa_i s) \text{ для } i = 1, \dots, 5, \quad \psi_6(s) = T^- + \kappa_6 s, \quad (1.3.28)$$

где κ_i , $i = 1, \dots, 6$ — некоторые положительные коэффициенты. При выполнении условия

$$\kappa_i > \kappa_6 \text{ для } i = 1, 2, 3, \quad \kappa_3 < \kappa_4, \quad \kappa_2 < \kappa_5, \quad \kappa_4 < \kappa_5, \quad (1.3.29)$$

выполнено следующее неравенство:

$$F_i(\Psi(s)) < 0 \text{ для } s > 0 \text{ и } i = 1, \dots, 5. \quad (1.3.30)$$

Остается исследовать знак $F_6^\tau(\Psi(s))$. В соответствие с определениями (1.3.9) и (1.3.10) для F_6^τ , можно заключить, что для $\mathbf{w} \geq \mathbf{0}$ и $T \geq T_0$ выполнено $g(T) = 0$ и $F_6^\tau(\mathbf{w}) < 0$. Следовательно, $F_6^\tau(\Psi(s)) < 0$ для $s \geq s_*$, где $s_* = (T_0 - T^-)/\kappa_6$. Рассмотрим теперь это неравенство на ограниченном интервале $0 < s < s_*$. Для этой цели выберем $\kappa_i = 1 + \varepsilon\rho_i$, $i = 1, \dots, 6$, где $\varepsilon > 0$ достаточно мал и константы $\rho_i > 0$ выбраны таким образом, чтобы условие (1.3.29) было выполнено для любого ε . Отметим, что s_* зависит от ε , но мы можем пренебречь этой зависимостью, выбрав ε достаточно маленьким. Тогда

$$\psi_i(s) = \psi_i^0(s) + \varepsilon s \psi_i^1(s), \quad \psi_i^1(s) > 0 \text{ для } s > 0,$$

где $\psi_i^1(s)$ — некоторые ограниченные положительные функции на интервале $0 \leq s \leq s_*$ (некоторые из них — константы). Таким образом,

$$F_6^\tau(\Psi(s)) = F_6^\tau(\Psi^0(s)) + \varepsilon s H^\tau(s),$$

где $H^\tau(s)$ — ограниченная функция для $s \in [0, s_*]$ и $\tau \in [0, 1]$. Здесь $F_6^\tau(\Psi^0(s)) < 0$ на интервале $(0, s_*]$ в силу (1.3.27). Более того, производная функции $s \rightarrow F_6^\tau(\Psi(s))$ в точке $s = 0$ имеет вид

$$(F_6^\tau \circ \Psi)'(0) = \nabla F_6^\tau(\mathbf{w}^-) \cdot (\Psi^0)'(0) + \varepsilon \nabla F_6^\tau(\mathbf{w}^-) \cdot \Psi^1(0) = P'(T^-) + \varepsilon \nabla F_6^\tau(\mathbf{w}^-) \cdot \Psi^1(0), \quad (1.3.31)$$

где $P'(T^-) < 0$. Из этих свойств немедленно следует, что $F_6^\tau(\Psi(s)) < 0$ на $(0, s_*]$ для всех $\tau \in [0, 1]$, если ε достаточно мал.

□

Вернемся к доказательству утверждения 1.3.1. Пусть $\tilde{\mathbf{w}}$ обозначает некоторое решение системы (1.3.20), удовлетворяющее (1.3.3). Тогда для доказательства (1.3.23), достаточно показать, что

$$\tilde{\mathbf{w}}(0) \leq \mathbf{w}^-. \quad (1.3.32)$$

Рассмотрим функцию Ψ , заданную в лемме 1.3.1. Для $s \geq 0$ введем множество

$$\mathcal{E}(s) = \{\mathbf{w} \mid \mathbf{0} \leq \mathbf{w} \leq \Psi(s)\},$$

с граничными гиперплоскостями, обозначенными как

$$\Gamma^i(s) = \{\mathbf{w} \mid w_i = \Psi_i(s), \quad 0 \leq w_j \leq \Psi_j(s), \quad j = 1, \dots, 6, \quad j \neq i\}.$$

Заметим, что для $0 \leq s_1 \leq s_2$ выполнено $\mathcal{E}(s_1) \subset \mathcal{E}(s_2)$.

Проведем доказательство от противного и положим, что (1.3.32) не выполнено, что эквивалентно $\tilde{\mathbf{w}}(0) \notin \mathcal{E}(0)$. Ясно, что для достаточно больших $s > 0$ будет выполнено $\tilde{\mathbf{w}}(0) < \Psi(s)$

и $\tilde{\mathbf{w}}(0) \in \mathcal{E}(s)$. Выберем минимальное значение переменной s , для которой $\tilde{\mathbf{w}}(0) \in \mathcal{E}(s)$. Тогда для некоторого i мы получим $\tilde{w}_i(0) > w_i^-$ и $\tilde{w}_i(0) \in \Gamma^i(s)$. Утверждается, что

$$F_i^\tau(\tilde{\mathbf{w}}(0)) < 0. \quad (1.3.33)$$

Предположим, что это неравенство выполнено. Так как $\tilde{w}_i'(0) = 0$ и $\tilde{w}_i'(x) < 0$ для $x > 0$, мы также имеем $\tilde{w}_i''(0) \leq 0$. Таким образом, мы получаем противоречие в знаках в i -ом уравнении системы (1.3.20).

Остается проверить выполнение условия (1.3.33). Вернемся к свойству монотонности (1.3.17) и отметим, что для $1 \leq i \leq 5$ оно выполнено при условии, что $\mathbf{w} \geq \mathbf{0}$. Следовательно, если $\tilde{w}_i(0) \in \Gamma^i(s)$ для некоторого $1 \leq i \leq 5$, то из монотонности системы следует, что $F_i^\tau(\tilde{\mathbf{w}}(0)) \leq F_i^\tau(\Psi(s)) < 0$. Теперь предположим, что $\tilde{w}_6(0) = \Psi_6(s)$ и $\tilde{w}_i(0) < \Psi_i(s)$ для $1 \leq i \leq 5$. Нелинейный член в правой части F_6^τ таков, что $F_6^\tau(\mathbf{w}) < 0$, если $\mathbf{w} \geq \mathbf{0}$ и $w_6 \geq T^0$. Таким образом, вследствие выполнения принципа максимума для рассматриваемого решения, $\tilde{\mathbf{w}}$ удовлетворяет $\tilde{w}_6(x) < T^0$ для $x \geq 0$. В частности, $\tilde{w}_6(0) = \Psi_6(s) \leq T_0$. Аналогичное обращение к монотонности системы может быть применено, чтобы показать, что $F_6^\tau(\tilde{\mathbf{w}}(0)) < 0$. Этот факт завершает доказательство утверждения 1.3.1. $\square$

Как следует из уравнений (1.3.18)–(1.3.19), $\mathbf{F}^\tau$ имеет две положительные устойчивые стационарные точки, и монотонна в $\mathcal{D}$ (1.3.17). Следовательно, автоволновая задача:

$$\mathbf{D}\mathbf{u}'' + c^\tau \mathbf{u}' + \mathbf{F}^\tau(\mathbf{u}) = \mathbf{0}, \quad \mathbf{u}(\pm\infty) = \mathbf{w}^\pm, \quad (1.3.34)$$

имеет единственное с точностью для некоторого переноса в пространстве решение, которое мы обозначим как $(c^\tau, \mathbf{u}^\tau)$.

Оценки монотонных решений типа пульс в E_μ^1 могут быть получены при дополнительном ограничении на положительность скорости c^τ . Следующий результат был доказан в [126] и остается верным в нашем случае, благодаря утверждению 1.3.1.

Теорема 1.3.3. *При выполнении условий (1.1.6) положим также, что $c^\tau > 0$ для всех $\tau \in [0, 1]$. Тогда существует некоторая константа $R > 0$ такая, что для всех $\tau \in [0, 1]$ и для всех монотонных решений $\mathbf{w}$ системы (1.3.20), удовлетворяющих (1.3.3), верна следующая оценка:*

$$\|\mathbf{w}\|_{E_\mu^1} \leq R.$$

Полное доказательство этой теоремы приведено в [126], приведем здесь основную его идею. Решения уравнения (1.3.20) равномерно ограничены в $\mathbb{C}(\mathbb{R}_+)$ -норме в силу предположения 1.3.1. Однако этого недостаточно, чтобы сделать вывод о том, что решения равномерно

ограничены во взвешенном пространстве E_μ^1 . Действительно, если существует последовательность $\mathbf{u}^k$ решений, которые сходятся к $\mathbf{w}^-$ на любом ограниченном интервале (и к $\mathbf{w}^+ = \mathbf{0}$ на бесконечности), то эта последовательность равномерно ограничена по равномерной норме, но не во взвешенном пространстве. Поясним, почему такая ситуация невозможна. Предположим, что такая последовательность существует. Рассмотрим тогда последовательность функций $\mathbf{v}^k(x) = \mathbf{u}^k(x + h_k)$, где h_k — некоторое действительное число, выбранное таким образом, что $\|\mathbf{u}^k(h_k)\| = \|\mathbf{w}^-\|/2$ (где $\|\cdot\|$ обозначает евклидову норму в $\mathbb{R}^6$). Так как последовательность $\mathbf{u}^k(x)$ сходится к $\mathbf{w}^-$ равномерно на каждом ограниченном интервале (на положительной полуоси), то $h_k \rightarrow \infty$ при $k \rightarrow \infty$. Следовательно, функции $\mathbf{v}^k(x)$ определены для $x \geq -h_k$. Выбирая локально сходящуюся подпоследовательность последовательности $\mathbf{v}^k(x)$, получаем функцию $\mathbf{v}^0(x)$, определенную на всей оси и удовлетворяющую (1.3.34) с $c^\tau = 0$. Этот вывод противоречит условиям теоремы.

1.3.2.3 Отделимость монотонных решений. Предположим, что все монотонные решения системы (1.3.20)–(1.3.21) равномерно ограничены в пространстве E_μ^1 (условия теоремы 1.3.3 гарантируют выполнение этого свойства, и их выполнение будет проверено в разделе 1.3.3.1). Мы хотим показать отделимость решений (1.3.20)–(1.3.21), монотонно убывающих на бесконечности для всех компонент и далее обозначаемых как $\mathbf{w}^M(x)$, от решений (1.3.20)–(1.3.21), не удовлетворяющих этому свойству и далее обозначаемых как $\mathbf{w}^N(x)$. Последние мы будем называть немонотонными решениями.

Теорема 1.3.4. *Предположим, что все монотонные решения (1.3.20)–(1.3.21) равномерно ограничены в пространстве E_μ^1 . Тогда существует константа $r > 0$ такая, что для всех $\tau \in [0, 1]$ для любого монотонного решения $\mathbf{w}^M(x)$ и любого немонотонного решения $\mathbf{w}^N(x)$ системы (1.3.20)–(1.3.21), выполняется*

$$\|\mathbf{w}^M - \mathbf{w}^N\|_{E_\mu^1} \geq r. \quad (1.3.35)$$

Доказательство. Начнем с доказательства двух промежуточных результатов.

Лемма 1.3.2. *Предположим, что $\mathbf{w}$ — некоторое решение системы (1.3.20) для $0 \leq \tau \leq 1$, удовлетворяющее*

$$\mathbf{w}(x) \in \mathcal{D} \text{ для } x \in \mathbb{R}^+, \quad \mathbf{w}'(0) = \mathbf{0}. \quad (1.3.36)$$

Тогда либо все компоненты $\mathbf{w}$ положительны для всех $x \geq 0$, либо все они тождественно равны 0.

Доказательство. Каждое уравнение системы (1.3.20) (или, аналогично, (1.3.6)) может быть записано в виде

$$Dz'' - \gamma z + f(x) = 0, \quad z'(0) = 0, \quad (1.3.37)$$

где γ — положительная константа и $f(x) \geq 0$ для всех $x \geq 0$. Тогда можно доказать, что либо $z(x) > 0$ для всех $x \geq 0$, либо $z(x) \equiv 0$. Покажем, что все компоненты решения равноправны с точки зрения реализации одного из вариантов. Другими словами, если одна из компонент решения тождественно равна нулю, то все остальные компоненты тоже тождественно равны нулю.

Предположим, что $w_1(x) \equiv 0$. Тогда из первого уравнения (1.3.6) следует, что $T(x) \equiv 0$. Тогда из второго и третьего уравнений (1.3.6) мы можем заключить, что $w_2(x) \equiv w_3(x) \equiv 0$, так как единственные ограниченные решения этих уравнений — убывающие экспоненты, и для удовлетворения граничных условий необходимо, чтобы эти функции были тождественно нулевыми. Из следующих двух уравнений мы получаем $w_4(x) \equiv w_5(x) \equiv 0$. Таким образом, лемма доказана для случая $w_1(x) \equiv 0$. Аналогичные рассуждения применимы для случая $w_2(x) \equiv 0$ или $w_3(x) \equiv 0$.

Если $w_4(x) \equiv 0$, то из четвертого уравнения (1.3.6) мы можем заключить, что $w_3(x) \equiv 0$, что возвращает нас к рассмотренному случаю. Если $w_5(x) \equiv 0$, то из пятого уравнения (1.3.6) мы можем сделать вывод, что $w_4(x) \equiv 0$, что возвращает нас к предыдущим рассуждениям. Наконец, если $T(x) \equiv 0$, то из первого уравнения (1.3.6) следует, что $w_1(x) \equiv 0$, и мы возвращаемся к аналогичному случаю. $\square$

Лемма 1.3.3. *Существует некоторый вектор $\mathbf{q} > \mathbf{0}$ такой, что для всех $\tau \in [0, 1]$ выполнено $(\mathbf{F}^\tau)'(\mathbf{0})\mathbf{q} < \mathbf{0}$.*

Доказательство. Для $\tau \in [0, 1]$ матрица $(\mathbf{F}^\tau)'(\mathbf{0})$ принимает вид

$$(\mathbf{F}^\tau)'(\mathbf{0}) = \begin{pmatrix} -\alpha_1 & 0 & 0 & 0 & 0 & \alpha_1\beta_1 \\ 0 & -\alpha_2 & 0 & 0 & 0 & \alpha_2\beta_2 \\ 0 & 0 & -\alpha_3 & 0 & 0 & \alpha_3\beta_3 \\ 0 & 0 & \alpha_4\beta_4 & -\alpha_4 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \alpha_5\beta_5 & -\alpha_5 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \alpha_6\alpha^\tau & \alpha_6\beta_3\beta_4\beta_5\beta^\tau - \sigma \end{pmatrix} \quad (1.3.38)$$

Мы хотим выбрать положительный вектор $\mathbf{q} = (q_1, \dots, q_6)$ такой, что $(\mathbf{F}^\tau)'(\mathbf{0})\mathbf{q} < \mathbf{0}$, то есть должны выполняться следующие неравенства:

$$\beta_i q_6 < q_i \text{ для } i = 1, 2, 3, \quad \beta_4 q_3 < q_4, \quad \beta_5 q_4 < q_5, \quad \alpha_6 \alpha^\tau q_5 < (\sigma - \alpha_6 \beta_3 \beta_4 \beta_5 \beta^\tau) q_6. \quad (1.3.39)$$

Для $\tau = 1$ выполнено $\alpha^\tau = 0$ и существование действительных $q_i > 0$, удовлетворяющих (1.3.39), немедленно следует из (1.3.15). Проверим, что аналогичное свойство сохраняется для $\tau \in [0, 1)$. Из последних четырех неравенств (1.3.39) мы получаем:

$$q_6 < \frac{\sigma - \alpha_6 \beta_3 \beta_4 \beta_5 \beta^\tau}{\beta_3 \beta_4 \beta_5 \alpha_6 \alpha^\tau} q_6, \quad (1.3.40)$$

в то время как первые два неравенства остаются неизменными. Таким образом, искомые q_i существуют тогда и только тогда, когда

$$1 < \frac{\sigma - \alpha_6 \beta_3 \beta_4 \beta_5 \beta^\tau}{\beta_3 \beta_4 \beta_5 \alpha_6 \alpha^\tau}. \quad (1.3.41)$$

Для $\tau \in [0, \tau_1]$ выполнено $\alpha^\tau = 1$, $\beta^\tau = 0$ и неравенство (1.3.41) верно в силу (1.3.15). Так как функция в правой части возрастает при $\tau \in [\tau_1, 1)$, то неравенства также выполнены и для всех τ из этого интервала. $\square$

Мы хотим доказать неравенство (1.3.35). Проведем доказательство от противного и положим, что существует некоторая последовательность монотонных решений $\mathbf{w}^{M,k}(x)$ и некоторая последовательность немонотонных решений $\mathbf{w}^{N,k}(x)$ такие, что:

$$\|\mathbf{w}^{M,k} - \mathbf{w}^{N,k}\|_{E_\mu^1} \rightarrow 0 \text{ при } k \rightarrow \infty. \quad (1.3.42)$$

Так как монотонные решения равномерно ограничены и рассматриваемый оператор является собственным, то множество $\{\mathbf{w}^{M,k}, k \in \mathbb{N}\}$ относительно компактно в E_μ^1 . Следовательно, существует некоторая подпоследовательность монотонных решений, которую мы дальше для простоты будем также обозначать как $\mathbf{w}^{M,k}$, сходящаяся к некоторой функции $\hat{\mathbf{w}}(x)$. Ясно, что предельная функция $\hat{\mathbf{w}}(x)$ является решением системы (1.3.20) для некоторого $\tau = \tau_0$; более того, она удовлетворяет $\hat{\mathbf{w}}(x) \geq 0$, $\hat{\mathbf{w}}(x) \in \mathcal{D}$, $\hat{\mathbf{w}}'(x) \leq 0$ для $x \geq 0$, $\hat{\mathbf{w}}'(0) = 0$, $\hat{\mathbf{w}}(\infty) = 0$.

В двух следующих леммах более точно сформулированы свойства функции $\hat{\mathbf{w}}(x)$.

Лемма 1.3.4. *Предельная функция $\hat{\mathbf{w}}$ положительна: для любого $x \geq 0$, $\hat{\mathbf{w}}(x) > 0$.*

Доказательство. Проверим сначала, что $\hat{\mathbf{w}}(0) \neq \mathbf{0}$. Проводя доказательство от противного, положим, что $\mathbf{w}^{M,k}(0) \rightarrow \mathbf{0}$. Из леммы 1.3.3 следует, что существует вектор $\mathbf{q} > \mathbf{0}$ такой, что $(\mathbf{F}^{\tau_0})'(\mathbf{0})\mathbf{q} < \mathbf{0}$. Вследствие непрерывности $\mathbf{F}^\tau(\mathbf{w})$ и ее производных, для значений τ близких к τ_0 и достаточно маленького ε выполнено $\mathbf{F}^\tau(\varepsilon\mathbf{q}) < \mathbf{0}$. Тогда свойство монотонности (1.3.17) гарантирует, что для любого $\mathbf{w} \in B_\varepsilon = [0, \varepsilon\mathbf{q}]$, $\mathbf{w} \neq \mathbf{0}$ хотя бы одна компонента $\mathbf{F}^\tau(\mathbf{w})$ отрицательна. Так как $\mathbf{w}^{M,k}(0)$ сходится к $\mathbf{0}$, то для достаточно большого k $\mathbf{w}^{M,k}(0)$ попадает в B_ε . Следовательно, для некоторого k и некоторого i выполнено $F_i^{\tau_k}(\mathbf{w}^{M,k}(0)) < 0$. Значит,

из (1.3.20) можно заключить, что $w_i^{M,k''}(0) > 0$ и $w_i^{M,k}(0)$ не может убывать, что противоречит (1.3.21). Таким образом, $\hat{\mathbf{w}}(0)$ отлична от $\mathbf{0}$. В силу леммы 1.3.2 этот факт влечет за собой положительность $\hat{\mathbf{w}}$. $\square$

Лемма 1.3.5. *Предельная функция $\hat{\mathbf{w}}$ убывает: для всех $x > 0$, $\hat{\mathbf{w}}'(x) < \mathbf{0}$.*

Доказательство. Напомним, что функция $\hat{\mathbf{w}}$ удовлетворяет (1.3.20) для некоторого $\tau = \tau_0$. Предположим, что $\hat{w}_i'(x_0) = 0$ в некоторой точке $x_0 > 0$ и для некоторого i . Дифференцируя i -ое уравнение системы (1.3.20) для $\tau = \tau_0$, получаем, что $v(x) = -\hat{w}_i'(x)$ удовлетворяет:

$$-Dv'' - \frac{\partial F_i^{\tau_0}}{\partial w_i}(\hat{\mathbf{w}})v = - \sum_{j=1, j \neq i}^6 \frac{\partial F_i^{\tau_0}}{\partial w_j}(\hat{\mathbf{w}})\hat{w}_j'. \quad (1.3.43)$$

Здесь $v(x) \geq 0$, $v(x_0) = 0$ для $x_0 > 0$ и из (1.3.17) следует, что правая часть (1.3.43) неотрицательна. Тогда теорема положительности гарантирует, что $v \equiv 0$. Следовательно, с учетом значения предела на бесконечности, $\hat{w}_i(x) \equiv 0$, что противоречит лемме 1.3.4. $\square$

Рассмотрим теперь последовательность немонотонных функций $\mathbf{w}^{N,k}$, сходящуюся к монотонной функции $\hat{\mathbf{w}}$ при $k \rightarrow \infty$. Без потери общности мы можем предположить, что первые компоненты решения немонотонны. Тогда существуют значения $x_k > 0$ такие, что $w_1^{N,k'}(x_k) = 0$ и с точностью до некоторой подпоследовательности выполнено либо $x_k \rightarrow x_* > 0$, либо $x_k \rightarrow \infty$, либо $x_k \rightarrow 0$ при $k \rightarrow \infty$.

Если $x_k \rightarrow x_*$ для некоторого $x_* > 0$, то $\hat{w}_1'(x_*) = 0$ и мы получаем противоречие с леммой 1.3.4. Далее, утверждается, что для достаточно большого $y > 0$ и достаточно большого k выполнено

$$(\mathbf{w}^{N,k})' < \mathbf{0} \text{ на } [y, \infty[. \quad (1.3.44)$$

Отсюда следует, что x_k не может стремиться к бесконечности.

В самом деле, вновь рассмотрим положительный вектор $\mathbf{q}$, определенный в лемме 1.3.3. Тогда $(\mathbf{F}^{\tau_0})'(\mathbf{0})\mathbf{q} < \mathbf{0}$. Значит, существует $k_0 > 0$ и $\delta > 0$ такие, что $(\mathbf{F}^{\tau_k})'(\mathbf{w})\mathbf{q} < \mathbf{0}$ для $k \geq k_0$ и $\|\mathbf{w}\| \leq \delta$ (где $\|\cdot\|$ означает евклидову норму в $\mathbb{R}^6$). Так как $\hat{\mathbf{w}}(x)$ — решение (1.3.20)-(1.3.21) для некоторого $\tau = \tau_0$, то она экспоненциально убывает и мы можем выбрать $\tilde{y}$ такой, что $\|\hat{\mathbf{w}}(x)\| < \delta$ для $x \geq \tilde{y}$. Так как $\mathbf{w}^{N,k}$ сходится к монотонной функции $\hat{\mathbf{w}}$, мы можем выбрать $y \geq \tilde{y}$ и $k_1 \geq k_0$ такие, что $\|\mathbf{w}^{N,k}(x)\| \leq \delta$ при $x \geq y$ и $k \geq k_1$ и $\mathbf{w}^{N,k'}(y) < \mathbf{0}$ при $k \geq k_1$. Покажем, что из этих свойств следует, что при выполнении (1.3.44) также выполнено:

$$\mathbf{w}^{N,k'}(x) < \mathbf{0} \text{ для } x \geq y \text{ и } k \geq k_1. \quad (1.3.45)$$

В самом деле, функция $\mathbf{v}^k(x) = -(\mathbf{w}^{N,k})'(x)$ является решением системы:

$$D\mathbf{v}^{k''} + (\mathbf{F}^{\tau_k})'(\mathbf{w}^{N,k})\mathbf{v}^k = 0. \quad (1.3.46)$$

Предположим, что $\mathbf{v}^k(x)$ не положительна для некоторого $x > y$ и $k \geq k_1$. Так как $\mathbf{v}^k(y) > 0$ и $\mathbf{v}^k(+\infty) = 0$ (вследствие экспоненциального убывания $\mathbf{v}^k$), то мы можем выбрать некоторое число $\alpha > 0$ такое, что функция $\mathbf{u}^k(x) \equiv \mathbf{v}^k(x) + \alpha \mathbf{q}$ удовлетворяет неравенству $\mathbf{u}^k(x) \geq 0$ для всех $x \geq y$, и $\mathbf{u}^k(x_1) = 0$ для некоторого $x_1 > y$ хотя бы для одной компоненты этого вектора. Из системы (1.3.46) следует, что

$$D(\mathbf{u}^k)'' + (\mathbf{F}^{\tau_k})'(\mathbf{w}^{N,k})\mathbf{u}^k + \mathbf{b}_k(x) = 0, \quad (1.3.47)$$

где второй член (1.3.47) положителен вследствие (1.3.17), и $\mathbf{b}_k(x) = -\alpha(\mathbf{F}^{\tau_k})'(\mathbf{w}^{N,k})\mathbf{q} > 0$ на $[y, +\infty)$. Тогда $(\mathbf{u}^k)''(x_1)$ должна быть отрицательна, и мы получаем противоречие в знаках в уравнении для компоненты вектор-функции $\mathbf{u}^k$, достигающей минимума в точке $x = x_1$.

Остается рассмотреть случай $x_k \rightarrow 0$. Покажем, что

$$\mathbf{F}^{\tau_0}(\hat{\mathbf{w}}(0)) > 0. \quad (1.3.48)$$

Очевидно, неравенство $\mathbf{F}^{\tau_0}(\hat{\mathbf{w}}(0)) \geq 0$ выполнено, так как в противном случае, если хотя бы одна компонента этого вектора была бы отрицательна, то соответствующая компонента вектора $\hat{\mathbf{w}}''(0)$ была бы положительна. Так как $\hat{\mathbf{w}}'(0) = 0$, то это приводит к противоречию с предположением о том, что $\hat{\mathbf{w}}$ убывает. Таким образом, нам нужно показать, что компоненты вектора $\mathbf{F}^{\tau_0}(\hat{\mathbf{w}}(0))$ не могут обращаться в ноль. Предположим, что то не так, и $F_i^{\tau_0}(\hat{\mathbf{w}}(0)) = 0$ для некоторого i такого, что $\hat{w}_i''(0) = 0$. Тогда $v(x) = -\hat{w}_i'(x)$ удовлетворяет

$$Dv'' + \frac{\partial F_i^{\tau_0}}{\partial w_i}(\hat{\mathbf{w}})v + b(x) = 0,$$

где

$$b(x) = - \sum_{j=1, j \neq i}^6 \frac{\partial F_i^{\tau_0}}{\partial w_j}(\hat{\mathbf{w}})\hat{w}_j' \geq 0.$$

Так как $v(0) = 0$ и $v'(0) = 0$, то мы получаем противоречие с леммой Хопфа.

Таким образом, мы показали, что все компоненты вектора $\mathbf{F}^{\tau_0}(\hat{\mathbf{w}}(0))$ положительны. Так как функции $\mathbf{w}^{N,k}$ сходятся к $\hat{\mathbf{w}}$, то для всех достаточно больших k выполнено $\mathbf{F}^{\tau_k}(\mathbf{w}^{N,k}(0)) > 0$. Таким образом, $\mathbf{w}^{N,k}(x)'' < 0$ в некотором интервале $0 < x < \delta$ независимо от k . Значит, $\mathbf{w}^{N,k}(x)' < 0$ на этом интервале и сходимость $x_k \rightarrow 0$ не может выполняться. Это противоречие завершает доказательство леммы. $\square$

Замечание. Монотонные решения системы (1.3.20)–(1.3.21) также отделимы от тривиальных решений $\mathbf{w} \equiv \mathbf{0}$ данной системы. Действительно, в силу аргументов, использованных при доказательстве теоремы 1.3.4, существует некоторая константа $\eta > 0$ такая, что для любого монотонного решения $\mathbf{w}^M$ и любого $\tau \in [0, 1]$ выполнено:

$$w_i^M(0) > \eta, \text{ для } i = 1, \dots, 6. \quad (1.3.49)$$

В самом деле, в противном случае существует последовательность монотонных решений $\mathbf{w}^{M,k}$, сходящаяся к некоторой $\hat{\mathbf{w}}$ в E_μ^1 и хотя бы одна компонента $\hat{\mathbf{w}}(0)$ обращается в ноль. Это противоречит лемме 1.3.4.

1.3.3 Доказательство теоремы 1.3.1

Часть теоремы 1.3.1, посвященная несуществованию решений для $c \leq 0$, может быть доказана аналогично тому, как это было сделано в [126]. Далее мы будем предполагать, что скорость автоволны в (1.2.1) положительна:

$$c > 0, \quad (1.3.50)$$

и докажем существование монотонно убывающего решения типа пульс в системе (1.2.1). Доказательство основано на методе Лере-Шаудера. Ключевым шагом является построение непрерывной деформации (гомотопии) нашей задачи к модельной задаче, для которой мы сможем доказать, что значение топологической степени отлично от нуля.

Непрерывная деформация была введена в разделе 1.3.1. В определениях (1.3.9) и (1.3.10) для F_6^τ функция g по-прежнему присутствует и выполнено условие (1.3.16). Сначала мы покажем, как выбрать функцию g так, чтобы c^τ из (1.3.34) оставалась положительной при изменении τ (раздел 1.3.3.1). В силу теоремы 1.3.3, это дает априорные оценки в E_μ^1 для монотонно убывающих решений. Далее, в разделе 1.3.3.2 мы рассмотрим предельный случай ($\tau = 1$) и в частности, некоторые спектральные свойства такой системы. Они позволят нам завершить доказательство существования монотонного пульса в разделе 1.3.3.3.

1.3.3.1 Положительность скорости автоволны . Вернемся к определению гомотопии для нашей системы и покажем, что при выборе некоторой подходящей функции g будет выполнено $c^\tau > 0$ для всех $\tau \in [0, 1]$.

Напомним, что для $\tau \in [0, \tau_1]$ функция F_6^τ задана выражением

$$F_6^\tau(\mathbf{w}) = \alpha_6 w_5 (1 + \delta w_1) \left(1 - \frac{T}{T_0} \right) - \sigma T + \tau g(T),$$

где g удовлетворяет условию (1.3.16). Так как $g \geq 0$, то $F_6^\tau(\mathbf{w}) \geq F_6(\mathbf{w})$ и, как следует из классического результата для монотонных систем [265], $c^\tau \geq c$. Следовательно, из (1.3.50) следует

$$c^\tau > 0 \text{ для } \tau \in [0, \tau_1]. \quad (1.3.51)$$

Стоит отметить, что для получения вышеописанного результата не нужно налагать никаких дополнительных ограничений на функцию g . Для $\tau \in (\tau_1, 1]$ ситуация отлична, так как F_6^τ принимает вид

$$F_6^\tau(\mathbf{w}) = \alpha_6 [\alpha^\tau w_5 + \beta^\tau \varphi_5(T)] (1 + \delta [\alpha^\tau w_1 + \beta^\tau \varphi_1(T)]) \left(1 - \frac{T}{T_0}\right) - \sigma T + \tau_1 g(T),$$

где $\alpha^\tau, \beta^\tau \geq 0$ и $\alpha^\tau + \beta^\tau = 1$. Отметим, что для $\mathbf{w} \in \mathcal{D}$ и $\tau \in (\tau_1, 1]$

$$F_6^\tau(\mathbf{w}) \geq G(T) \equiv \tau_1 g(T) - \sigma T. \quad (1.3.52)$$

В силу выполнения условия (1.3.16) для g , мы получаем $G(0) = 0$ и $G'(0) < 0$. Мы также можем предположить, что G двустойчива, и существуют $\bar{T} < \tilde{T} < T_* < T^-$ такие, что

$$\begin{aligned} \text{функция } G(T) = \tau_1 g(T) - \sigma T \text{ имеет три корня в } [0, T^-] : 0, \tilde{T} \text{ и } T_*, \quad G(T) < 0 \text{ для } 0 < T < \tilde{T}, \\ G(T) > 0 \text{ для } \tilde{T} < T < T_*, \quad G(T) < 0 \text{ для } T_* < T \leq T^-. \end{aligned} \quad (1.3.53)$$

Утверждение 1.3.2. *Предположим, что g удовлетворяет (1.3.16), (1.3.53), и более того,*

$$\int_0^{T_*} G(s) ds > 0. \quad (1.3.54)$$

Тогда $c^\tau > 0$ для $\tau \in [\tau_1, 1]$.

Доказательство. Рассмотрим скалярное параболическое уравнение

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} = D \frac{\partial^2 \theta}{\partial x^2} + G(\theta), \quad (1.3.55)$$

на всей оси с некоторым заданным начальным условием $\theta(x, 0)$, являющимся монотонно убывающей функцией, стремящейся к 0 на $+\infty$ и к T_* на $-\infty$. При выполнении условий (1.3.53) для функции G , для данного уравнения решение сходится к некоторой автоволне $\theta_*(x - c_* t)$. Скорость c_* имеет тот же знак, что и интеграл (1.3.54), так что условие (1.3.54) гарантирует выполнение неравенства $c_* > 0$.

Утверждается, что

$$c^\tau > c_* \text{ для } \tau \in [\tau_1, 1]. \quad (1.3.56)$$

В самом деле, рассмотрим параболическую задачу

$$\frac{\partial \mathbf{v}^\tau}{\partial t} = \mathbf{D} \frac{\partial^2 \mathbf{v}^\tau}{\partial x^2} + \mathbf{F}^\tau(\mathbf{v}^\tau), \quad \mathbf{v}^\tau(x, 0) = \hat{\mathbf{v}}(x). \quad (1.3.57)$$

Если $\hat{\mathbf{v}}(-\infty) = \mathbf{w}^-$ и $\hat{\mathbf{v}}(\infty) = \mathbf{w}^+ = \mathbf{0}$, то $\mathbf{v}^\tau(x, t)$ сходится к некоторой автоволне $\mathbf{u}^\tau(x - c^\tau t)$ со скоростью распространения равной c^τ .

Вместе с системой (1.3.57) рассмотрим также систему

$$\frac{\partial \mathbf{z}^\tau}{\partial t} = \mathbf{D} \frac{\partial^2 \mathbf{z}^\tau}{\partial x^2} + \Phi^\tau(\mathbf{z}^\tau), \quad \mathbf{z}^\tau(x, 0) = \hat{\mathbf{z}}(x), \quad (1.3.58)$$

где $F_6^\tau(\mathbf{w})$ заменено на $G(z_6^\tau)$, а все остальные компоненты вектор-функции неизменны. Выберем $\hat{z}_i(x) \equiv 0$ для $i = 1, \dots, 5$, и последнюю компоненту — совпадающей со значением ее начального условия в уравнении (1.3.55), то есть:

$$\hat{z}_6(x) = \theta(x, 0).$$

Предположим, что $\hat{v}_6(x) \geq \hat{z}_6(x)$ для всех $x \in \mathbb{R}$. Так как $\mathbf{F}^\tau(\mathbf{w}) \geq \Phi^\tau(\mathbf{w})$ и $\hat{\mathbf{v}}(x) \geq \hat{\mathbf{z}}(x)$, то $\mathbf{v}^\tau(x, t) > \mathbf{z}^\tau(x, t)$ для всех $x \in \mathbb{R}$ и $t > 0$. Так как $\mathbf{v}^\tau(x, t)$ сходится к автоволне со скоростью распространения c^τ и $u_6^\tau(x, t)$ — к автоволне со скоростью распространения c_* , то $c^\tau \geq c_* > 0$. $\square$

Далее мы будем предполагать, что функция g выбрана таким образом, что выполняются условия (1.3.16), (1.3.53) и (1.3.54). Это гарантирует выполнение следующего свойства:

$$c^\tau > 0 \text{ для } \tau \in [0, 1]. \quad (1.3.59)$$

1.3.3.2 Предельный случай $\tau = 1$. Для $\tau = 1$ система принимает вид

$$\mathbf{D}\mathbf{w}'' + \mathbf{F}^1(\mathbf{w}) = \mathbf{0}, \quad (1.3.60)$$

на полуоси $x > 0$ с граничным условием

$$\mathbf{w}'(0) = \mathbf{0}. \quad (1.3.61)$$

Утверждение 1.3.3. *Задача (1.3.60)-(1.3.61) имеет единственное монотонно убывающее решение типа пульс.*

Доказательство. В соответствии с определением $\mathbf{F}^1$, последнее уравнение в (1.3.60) принимает вид

$$DT'' + P(T) + \tau_1 g(T) = 0. \quad (1.3.62)$$

Здесь функция $T \rightarrow P(T) + \tau_1 g(T)$ имеет две устойчивые особые точки. Более того, вследствие (1.3.54)

$$\int_0^{T^-} (P(s) + \tau_1 g(s)) ds > 0.$$

Как было показано разделе 1.3, из этого следует, что скалярное уравнение (1.3.62) имеет единственное решение типа пульс на $\mathbb{R}_+$. Обозначим его за $T(x)$. Тогда уравнения для w_i , $i = 1, 2, 3$ принимают вид:

$$Dw_i''(x) - \alpha_i w_i(x) = -\alpha_i \beta_i T(x), \quad w_i'(0) = 0.$$

Так как операторы, соответствующие левым частям этих уравнений действуют из E_μ^1 в E_μ^2 и обратимы, а $T(x) \in E_\mu^2$, то эти уравнения также обладают единственными решениями $w_1(x), w_2(x), w_3(x) \in E_\mu^1$ (здесь пространства E_μ^i являются скалярными функциональными пространствами, аналогичными описанным в разделе 1.3.2.1). Далее, рассмотрим уравнение $w_4(x)$:

$$Dw_4''(x) - \alpha_4 w_4(x) = -\alpha_4 \beta_4 w_3(x), \quad w_4'(0) = 0, \quad (1.3.63)$$

которое, в свою очередь, обладает единственным решением $w_4(x)$, и уравнение для w_5 :

$$Dw_5''(x) - \alpha_5 w_5(x) = -\alpha_5 \beta_5 w_4(x) - \alpha_5 \gamma w_2(x) w_4(x), \quad w_5'(0) = 0, \quad (1.3.64)$$

обладающее единственным решением $w_5(x)$.

Остается показать, что функции $w_i(x)$ монотонно убывают. Начнем с $w_1(x)$. Положим $v_1(x) = -w_1'(x)$. Дифференцируя первое уравнение в (1.3.60), мы получаем:

$$Dv_1'' - \alpha_1 v_1 + h(x) = 0, \quad v_1(0) = 0,$$

где $h(x) = -\alpha_1 \beta_1 T'(x) > 0$. Единственное ограниченное решение этой задачи положительно. Таким образом, $w_1'(x) < 0$. Аналогичным образом можно рассмотреть остальные компоненты решения. □

Далее, рассмотрим задачу на с.з. для линеаризации системы (1.3.60)-(1.3.61) вокруг решения типа пульс $\mathbf{w}(x)$, заданном в утверждении 1.3.3:

$$D\mathbf{v}'' + (\mathbf{F}^1)'(\mathbf{w})\mathbf{v} = \lambda\mathbf{v}, \quad (1.3.65)$$

на полуоси $x > 0$ с граничными условиями

$$\mathbf{v}'(0) = \mathbf{0}, \quad \mathbf{v}(\infty) = \mathbf{0}. \quad (1.3.66)$$

Лемма 1.3.6. *Все с. з. линеаризованной системы (1.3.65)–(1.3.66) отличны от нуля.*

Доказательство. Проведем доказательство от противного и предположим, что линеаризованная система (1.3.65)–(1.3.66) имеет нулевое с.з. В частности, для последнего уравнения в (1.3.65) для $\lambda = 0$ существует некоторая скалярная функция $v_6(x)$ такая, что:

$$Dv_6''(x) + \delta(x)v_6(x) = 0, \quad v_6'(0) = 0, \quad v_6(\infty) = 0, \quad (1.3.67)$$

где $\delta(x) = (F_6^1)'(T(x))$. Мы покажем, что это предположение влечет противоречие.

Рассмотрим функцию $v(x) = -T'(x)$. Дифференцируя (1.3.62), мы получаем:

$$Dv''(x) + \delta(x)v(x) = 0, \quad (1.3.68)$$

$$v(0) = 0, \quad v(x) > 0 \text{ for } x > 0, \quad v(\infty) = 0. \quad (1.3.69)$$

Выберем x_* такими образом, чтобы $\delta(x) < 0$ для всех $x > x_*$.

Для начала предположим, что $v_6(x) > 0$ для всех $x \geq 0$. Тогда мы можем выбрать k достаточно большим, чтобы

$$kv_6(x) > v(x) \text{ для } 0 \leq x \leq x_*. \quad (1.3.70)$$

Обозначим через k_0 инфимум всех значений k , для которых выполняется (1.3.70). Тогда $k_0v_6(x) \geq v(x)$ и существует x_0 такой, что $k_0v_6(x_0) = v(x_0)$. Из леммы 1.3.7, сформулированной ниже, следует, что $k_0v_6(x_*) \geq v(x_*)$ влечет $k_0v_6(x) > v(x)$ для всех $x > x_*$. Таким образом, $x_0 \in [0, x_*]$. Мы исключаем случай $x_0 = 0$, так как он противоречит (1.3.69). Таким образом, существует $x_0 \in (0, x_*)$ такой, что $kv_6(x_0) = v(x_0)$, что противоречит теореме о положительности.

Рассмотрим теперь случай, когда функция $v_6(x)$ имеет переменный знак. Отметим, что $v_6(0) \neq 0$. В противном случае, $v_6(x) \equiv 0$. Без потери общности предположим, что $v_6(0) < 0$ (в противном случае, мы могли бы его домножить на -1). Тогда мы можем выбрать достаточно большое k так, что $kv(x) > v_6(x)$ для $0 \leq x \leq x_*$. Повторяя рассуждения из предыдущего параграфа, поменяв местами $v(x)$ и $v_6(x)$, получаем аналогичное противоречие. Это противоречие доказывает лемму. $\square$

Лемма 1.3.7. *Рассмотрим уравнение*

$$Dz''(x) + \delta(x)z(x) = 0, \quad z(\infty) = 0. \quad (1.3.71)$$

Если существует некоторое N такое, что $\delta(x) < 0$ для $x > N$ и $z(N) \geq 0$, то $z(x) > 0$ для всех $x > N$.

Доказательство. Предположим противное: $\exists x_0 > N$ такой, что $z(x_0) < 0$. Так как $z(N) \geq 0$ и $z(\infty) = 0$, то существует отрицательный минимум этой функции, достигаемый в точке $x_1 > N$. Тогда $z''(x_1) \geq 0$ и $\delta(x_1) < 0$, что противоречит (1.3.71). $\square$

1.3.3.3 Доказательство существования решений типа пульс. В разделах 1.3.1 и 1.3.3.1 мы построили гомотопию $\mathbf{F}^\tau$ с $c^\tau > 0$ для $\tau \in [0, 1]$. Напомним, что мы рассматриваем оператор $\mathbf{A}^\tau$, заданный (1.3.22), и соответствующие функциональные пространства.

В силу теоремы 1.3.3, существует шар $\mathbf{B}$ во взвешенном пространстве, содержащем все монотонные решения $\mathbf{A}^\tau(\mathbf{w}) = \mathbf{0}$. Оператор $\mathbf{A}^\tau$ является собственным на замкнутых ограниченных множествах относительно обеих переменных $\mathbf{w}$ и τ , так что множество монотонных решений $\mathbf{A}^\tau(\mathbf{w}) = \mathbf{0}$ компактно. Таким образом, в силу теоремы 1.3.4, мы можем построить область $\tilde{\mathbf{B}}$, содержащую все монотонные решения, и такую, что ее замыкание не содержит ни одного немонотонного решения для всех $\tau \in [0, 1]$. В самом деле, возьмем $\tilde{\mathbf{B}}$ равной объединению всех шаров радиуса r , определенного в теореме 1.3.4. Для этой области мы можем определить топологическую степень $\gamma(\mathbf{A}^\tau, \tilde{\mathbf{B}})$, которая сохраняет свое значение для всех $\tau \in [0, 1]$:

$$\gamma(\mathbf{A}^0, \tilde{\mathbf{B}}) = \gamma(\mathbf{A}^\tau, \tilde{\mathbf{B}}) = \gamma(\mathbf{A}^1, \tilde{\mathbf{B}}). \quad (1.3.72)$$

Так как в предельном случае ($\tau = 1$) система имеет единственное решение и оператор, линеаризованный вокруг этого решения, не имеет нулевых с.з., то топологическая степень для такой системы задана

$$\gamma(\mathbf{A}^1, \tilde{\mathbf{B}}) = (-1)^{\nu_k},$$

где ν_k — число положительных с.з. линеаризованного вокруг решения оператора с учетом их кратности.

Следовательно, $\gamma(\mathbf{A}^1, \tilde{\mathbf{B}}) \neq 0$. Тогда степень $\gamma(\mathbf{A}^0, \tilde{\mathbf{B}})$ также отлична от нуля. Это гарантирует существования хотя бы одного решения задачи $\mathbf{A}^0(\mathbf{w}) = \mathbf{0}$ в $\tilde{\mathbf{B}}$, что и завершает доказательство существования в теореме 1.3.1.

1.4 Неустойчивость решений типа пульс

Решение типа пульс $\mathbf{w}(x)$ — это положительное стационарное решение системы

$$\frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} = \mathbf{D} \frac{\partial^2 \mathbf{u}}{\partial x^2} + \mathbf{F}(\mathbf{u}), \quad (1.4.1)$$

рассмотренной на всей оси, с нулевыми пределами на бесконечности. Это решение неустойчиво относительно малых возмущений. В самом деле, дифференцируя уравнение

$$\mathbf{D}\mathbf{w}'' + \mathbf{F}(\mathbf{w}) = 0,$$

мы можем заключить, что $\mathbf{v}(x) = \mathbf{w}'(x)$ является собственной функцией (с.ф.), соответствующей нулевому с.з. соответствующего линеаризованного оператора. Эта с.ф. имеет переменный знак. С другой стороны, с.ф., соответствующая с.з. с максимальной действительной частью, положительна [265, 267]. Следовательно, $\mathbf{0}$ не является главным с.з., и существует положительное с.з. линеаризованного оператора.

Таким образом, решение задачи Коши для уравнения (1.4.1) с начальным условием $\mathbf{u}(x, 0) = \mathbf{w}(x) + \mathbf{s}(x)$, где $\mathbf{s}(x)$ — малое возмущение, не будет, вообще говоря, сходиться к $\mathbf{w}(x)$. Чтобы проанализировать поведение решения $\mathbf{u}(x, t)$, рассмотрим два следующих уравнения:

$$\mathbf{u}^1(x, 0) = \min(\mathbf{w}(x), \mathbf{w}(x + h)), \quad \mathbf{u}^2(x, 0) = \max(\mathbf{w}(x), \mathbf{w}(x + h)),$$

где h — некоторое вещественное число. При малых значениях h решение этого уравнения соответствует малому возмущению решения типа пульс. Легко показать, что $\mathbf{u}^1(x, 0)$ — это верхняя функция, и соответствующее решение убывает по времени и сходится к $\mathbf{w}^- = \mathbf{0}$ равномерно на всей оси. Аналогично, $\mathbf{u}^2(x, 0)$ — это нижняя функция. Соответствующее решение растет во времени и сходится к $\mathbf{w}^-$ равномерно на каждом ограниченном интервале. Сходимость этого решения к двум автоволнам, распространяющимся в противоположных направлениях, была показана для скалярного уравнения [268, 269] и можно ожидать схожего поведения для рассматриваемой системы, хотя мы и не приводим строгого доказательства.

Таким образом, неустойчивое решение типа пульс разделяет убывающее и возрастающее решения системы (1.2.1). С точки зрения интерпретации модели каскада свертывания, решение типа пульс определяет критическую начальную концентрацию тромбина, которая необходима для начала распространения автоволны тромбина при условии, что скорость распространения волны положительна.

2 Режим полной и частичной закупорки сосуда

В случае, если начальное возмущение достаточно велико, волна распространения концентрации тромбина в плазме ведет к образованию сгустка, неограниченный рост которого может

привести к закупорке сосуда. Основными механизмами, ограничивающими рост тромба, является механическое удаление активированных факторов потоком, а также путь отрицательной обратной связи, не позволяющий тромбу распространяться в направлении здоровой стенки сосуда, — путь активированного протеина С (см. раздел 1.2 главы 1). В данном разделе мы рассмотрим переход между режимами полной и частичной закупорки для упрощенной модели каскада свертывания крови в небольшом сосуде (венуле) в присутствии потока. Химические реакции каскада свертывания в потоке описываются уравнениями реакции-диффузии-конвекции на концентрации факторов свертывания (раздел 2.1). Мы считаем стенки сосуда жесткими и не подверженными деформации за счет образования тромба. Скорость потока рассчитывается из уравнений Навье-Стокса, учитывающих изменение скорости потока в областях сосуда, занятых фибриновым сгустком (раздел 2.2). Модель позволяет идентифицировать режимы как частичной, так и полной закупорки сосудов (раздел 2.3). Для более подробного аналитического анализа перехода системы из одного режима в другой мы оцениваем коэффициент Дамкелера для разных значений параметров в нашей системе (раздел 2.4), а также проводим анализ упрощенной одномерной модели, состоящей из одного уравнения реакции-диффузии для концентрации тромбина (раздел 2.5).

2.1 Математическая модель: химические реакции

Реакции каскада свертывания моделируются реакционно-диффузионной системой с конвекцией. Для уменьшения вычислительной стоимости расчетов мы рассматриваем упрощенную схему реакций, изображенную на рис. 3.5. Мы рассматриваем концентрации протромбина и тромбина (P и T , соответственно), а также общую концентрацию активирующих факторов свертывания IX и X и их активированных форм (B и B_a), и концентрацию основных плазменных ингибиторов: антитромбина (A) и протеина С и его активированной формы (C и C_a).

2.1.1 Уравнения реакций в плазме

Образование фибрина из фибриногена под действием тромбина и последующая полимеризация фибрина описывается следующими уравнениями:

$$\frac{\partial F_g}{\partial t} + \nabla \cdot (v F_g) = D \Delta F_g - k_1 T F_g, \quad (2.1.1)$$

$$\frac{\partial F}{\partial t} + \nabla \cdot (v F) = D \Delta F + k_1 T F_g - k_2 F, \quad (2.1.2)$$

$$\frac{\partial F_p}{\partial t} = k_2 F. \quad (2.1.3)$$

Аналогично мы полагаем, что

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \nabla \cdot (vC) = D\Delta C - k_c C, \quad \frac{\partial C_a}{\partial t} + \nabla \cdot (vC_a) = D\Delta C_a - k_c C_a. \quad (2.1.9)$$

2.1.2 Краевые условия

Мы рассматриваем двумерный вычислительный домен, соответствующей сечению сосуда вдоль тока крови. Границу домена обозначим как $\Gamma = \Gamma_1 \cup \Gamma_2 \cup \Gamma_3 \cup \Gamma_4$, где Γ_1 — здоровая стенка сосуда, Γ_2 — зона повреждения на нижней стенке сосуда, Γ_3, Γ_4 — левая и правая границы домена соответственно (рис. 3.6).

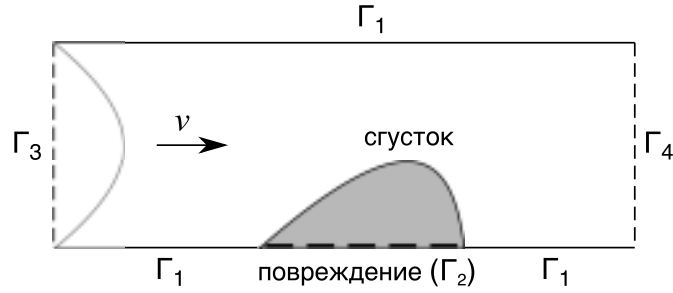


Рис. 3.6: Вычислительный домен в модели роста тромба в условиях потока: поперечное сечение сосуда, ток крови направлен слева направо. Пунктиром обозначена зона повреждения на нижней стенке сосуда.

Мы полагаем, что стенки сосуда непроницаемы для всех факторов и рассматриваются краевые условия нулевого потока через все границы для тромбина и фибрина:

$$\left. \frac{\partial T}{\partial n} \right|_{\Gamma} = 0, \quad \left. \frac{\partial F}{\partial n} \right|_{\Gamma} = 0. \quad (2.1.10)$$

Концентрация фибриногена, протромбина, антитромбина и неактивированных форм факторов IX и X на левой границе домена полагается постоянной и равной их начальной концентрации, подразумевая постоянный приток этих факторов с током крови:

$$F_g \Big|_{\Gamma_3} = F_{g0}, \quad P \Big|_{\Gamma_3} = P_0, \quad A \Big|_{\Gamma_3} = A_0, \quad B \Big|_{\Gamma_3} = B_0, \quad (2.1.11)$$

при этом на остальной границе краевые условия на концентрации фибриногена, протромбина и антитромбина также имеют вид нулевого потока:

$$\left. \frac{\partial F_g}{\partial n} \right|_{\Gamma_1 \cup \Gamma_2 \cup \Gamma_4} = 0, \quad \left. \frac{\partial P}{\partial n} \right|_{\Gamma_1 \cup \Gamma_2 \cup \Gamma_4} = 0, \quad \left. \frac{\partial A}{\partial n} \right|_{\Gamma_1 \cup \Gamma_2 \cup \Gamma_4} = 0. \quad (2.1.12)$$

На поврежденном участке сосуда Γ_2 происходит активация факторов IX и X за счет формирования их активного комплекса с тканевым фактором и фактором VII (рис. 3.5). Изменение

концентрации этого комплекса $([T_F B])$ можно описать уравнением:

$$\frac{\partial [T_F B]}{\partial t} = k_7^+ B(T_F - [T_F B]) - k_7^- [T_F B], \quad (2.1.13)$$

где первый член соответствует образованию комплекса фактора X и комплекса внешней теназы и пропорционален концентрации B и концентрации свободных сайтов связывания активного комплекса T_F , а второй член описывает деградацию комплекса $[T_F B]$. Полагая скорость реакции достаточно высокой, мы принимаем следующее приближенное значение концентрации активного комплекса:

$$[T_F B] = \frac{k_7^+ B T_F}{1 + k_7^+ B}, \quad k_7 = \frac{k_7^+}{k_7^-}. \quad (2.1.14)$$

Тогда краевые условия на участке домена, соответствующем поврежденной зоне сосуда, принимают вид:

$$\frac{\partial B}{\partial n} = -k_7^+ B(T_F - [T_F B]), \quad \frac{\partial B_a}{\partial n} = k_7^- [T_F B]. \quad (2.1.15)$$

Далее, рассмотрим уравнение на суммарную концентрацию $Z = B + B_a$, полученные из уравнений (2.1.8), (2.1.15):

$$\frac{\partial Z}{\partial t} + \nabla \cdot (vz) = D \Delta Z - k_b Z, \quad \frac{\partial Z}{\partial n} = 0. \quad (2.1.16)$$

Начальное условие $Z_0 = B_0$ дает нам константное решение $Z = B_0$. Таким образом, мы можем исключить из рассмотрения переменную B и записать окончательное краевое условие на приток активированных факторов IX и X в месте повреждения:

$$\frac{\partial B_a}{\partial n} \Big|_{\Gamma_2} = \frac{k_6(B_0 - B_a)}{1 + k_7(B_0 - B_a)}, \quad k_6 = k_7^- k_7^+ T_F. \quad (2.1.17)$$

На остальных границах домена мы задаем граничные условия нулевого потока для факторов IX и X:

$$\frac{\partial B_a}{\partial n} \Big|_{\Gamma_1 \cup \Gamma_3 \cup \Gamma_4} = 0, \quad \frac{\partial B}{\partial n} \Big|_{\Gamma_1 \cup \Gamma_2 \cup \Gamma_4} = 0. \quad (2.1.18)$$

Далее, следуя аналогичным рассуждениям, запишем краевые условия на концентрацию активированного протеина C, активируемого поверхностным комплексом тромбина и тромбо модулина на участке, соответствующем здоровой стенке сосуда Γ_1 (рис. 3.5):

$$\frac{\partial C_a}{\partial n} \Big|_{\Gamma_1} = \frac{k_8(C^0 - C)[TT_m]}{1 + k_9(C^0 - C_a)}, \quad [TT_m] = \frac{k_T TT_m}{1 + k_T TT_m}. \quad (2.1.19)$$

2.2 Модель потока

Ток плазмы крови моделируется уравнениями Навье-Стокса с дополнительным членом, описывающим замедление скорости потока в кровяном сгустке. Сгусток рассматривается как пористый материал, степень замедления потока которым зависит от концентрации полимера

фибрина. Таким образом, на всем домене рассматриваются одни и те же модельные уравнения, что снимает проблему вычисления переменной границы домена на каждом шаге по времени. Рассматривается следующее уравнение потока для несжимаемой жидкости:

$$\rho \left(\frac{\partial \vec{u}}{\partial t} + \vec{u} \nabla \vec{u} \right) = -\nabla p + \mu \Delta \vec{u} - \frac{\mu}{K_f(\vec{x})} \vec{u}, \quad \nabla \vec{u} = 0, \quad (2.2.1)$$

где $\vec{u} = (u_x, u_y)$ — вектор скорости потока, p — давление, ρ — плотность крови, μ — кинетическая вязкость, K_f — гидравлическая проницаемость полимера фибрина, заданная выражением [270]:

$$\frac{1}{K_f(\vec{x})} = \alpha^2 16 F_p(\vec{x})^{1.5} (1 + 56 F_p(\vec{x})^3), \quad (2.2.2)$$

где α — радиус волокна фибрина.

На границах домена, соответствующих стенке сосуда (Γ_1 и Γ_2), мы рассматриваем условие отсутствия скольжения, то есть приравниваем скорость потока нулю. На левой и правой границе рассматриваемого участка сосуда (Γ_3 и Γ_4) рассматриваются периодические условия для скорости потока, при этом фиксируется разница давления на левой и правой границе домена:

$$\Delta p = p_{out} - p_{in}. \quad (2.2.3)$$

Фиксирование разницы давления, а не скорости потока на левой границе, позволяет нам воспроизводить такие режимы образования сгустка, как полная закупорка сосуда. Данное допущение хорошо подходит для описания тока крови в небольших венах и капиллярах и не соответствует случаю больших артерий с высокой скоростью кровотока.

2.3 Результаты численного моделирования

Система была проинтегрирована с помощью численной схемы, описанной в разделе 2 главы 2 при значениях параметров, приведенных в разделе 2 приложения.

2.3.1 Режимы образования сгустка

Наша модель позволяет воспроизвести два качественно разных режима формирования тромба: образование сгустка конечного размера, не останавливающего ток крови в сосуде, и режим полной закупорки сосуда. Переход между режимами частичной и полной закупорки сосуда в значительной степени определяется пространственным распределением концентраций плазменных ингибиторов на удалении от зоны повреждения, а также механическим влиянием тока крови.

Фиксируя концентрации и скорости реакций в нашей модели, мы наблюдаем режим полной закупорки сосуда для низкой скорости потока (рис. 3.7) и частичное перекрывание сосуда при высокой скорости тока крови (рис. 3.8).

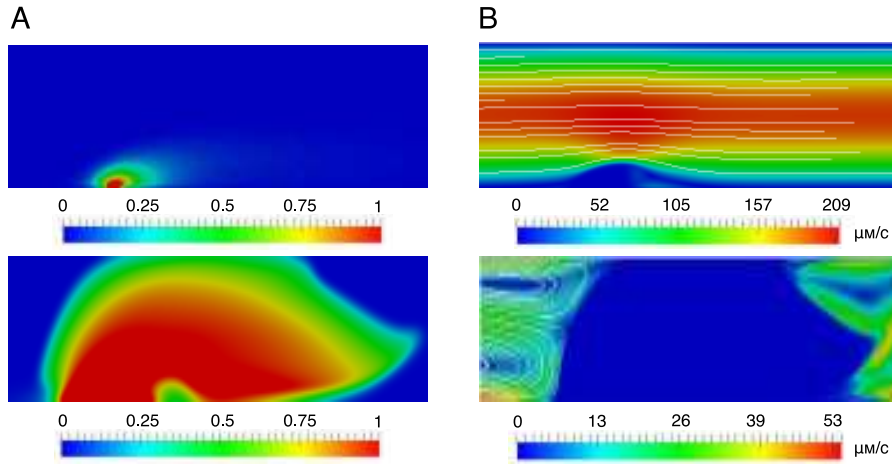


Рис. 3.7: Результаты вычислений для модели, описанной в разделах 2.1–2.2: режим образования кровяного сгустка, закупоривающего сосуд. Концентрация фибрина (А) и распределение значений скоростей потока (В) в момент времени $t = 100$ с (верхний ряд) и $t = 640$ с (нижний ряд). Начальная скорость потока составляет $200 \mu\text{m/s}$, число Дамкёлера равно 2.24. Рассматривается фрагмент сосуда длиной $250 \mu\text{m}$ с повреждением на нижней стенке сосуда размером $10 \mu\text{m}$.

Режим формирования тромба в большой степени зависит от размера повреждения. Считая, что значения концентрации полимера фибрина больше или равные 0.8 соответствуют сформировавшемуся тромбу, мы рассчитали финальную высоту сгустка, образующегося при разных размерах зоны повреждения и при разных скоростях потока (рис. 3.9). Для неподвижной плазмы полная закупорка сосуда в нашей модели происходит при размере повреждения, превосходящим $6 \mu\text{m}$ ($H = 50 \mu\text{m}$), при повреждениях меньших размеров высота сгустка не достигает диаметра сосуда (рис. 3.9 А). Основную роль в остановке роста тромба в неподвижной плазме играет АРС, активированный на здоровых участках стенки сосуда вблизи повреждения. При увеличении размера повреждения диффузия АРС оказывается недостаточной для предотвращения распространения волны тромбина, что соответствует экспериментальным наблюдениям *in vitro* [47].

Важно отметить, что переход от режима частичной закупорки к полной закупорке сосуда происходит резко по достижению размером повреждения критического значения. Это пороговое свойство сохраняется и при учете потока в модельной системе. Однако, механическое смывание активированных факторов свертывания, с одной стороны, и перенос АРС к

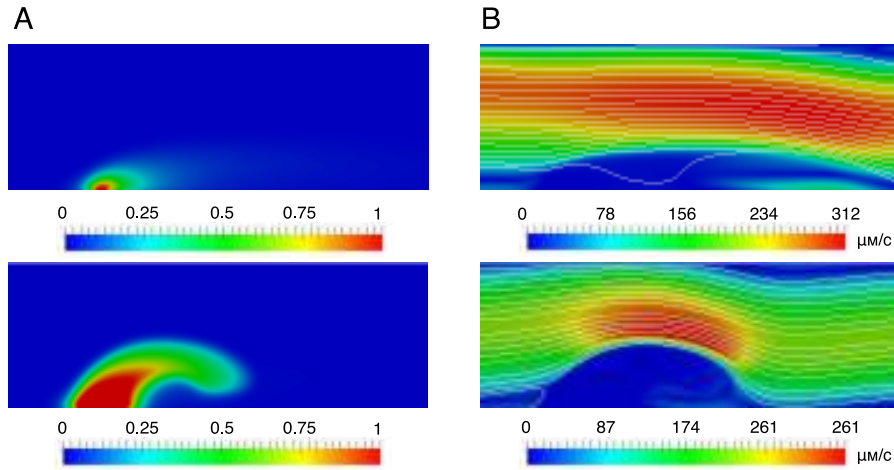


Рис. 3.8: Результаты вычислений для модели, описанной в разделах 2.1-2.2: режим образования кровяного сгустка, не перекрывающего ток крови. Концентрация фибрина (А) и распределение значений скоростей потока (В) в момент времени $t = 100$ с (верхний ряд) и $t = 640$ с (нижний ряд). Начальная скорость потока составляет 200 мкм/с, число Дамкёлера равно 1.12 . Рассматривается фрагмент сосуда длиной 250 мкм с повреждением на нижней стенке сосуда размером 10 мкм.

месту распространения тромбина, с другой стороны, ведут к тому, что критический размер повреждения увеличивается и составляет ~ 50 мкм для скорости потока равной 400 мкм/с (рис. 3.9 В) и ~ 90 мкм для скорости потока равной 1000 мкм/с (рис. 3.9 С).

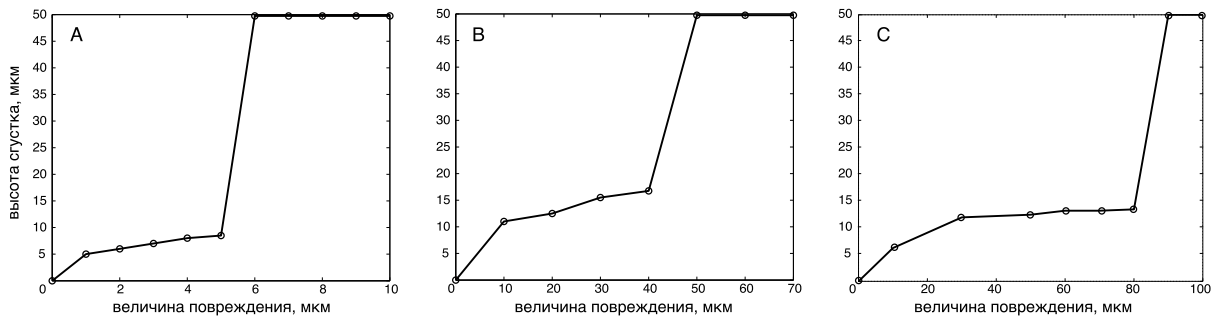


Рис. 3.9: Финальная высота фибринового сгустка в расчетах для модели, описанной в разделах 2.1–2.2 при различных размерах зоны повреждения в неподвижной плазме (А), и при скоростях потока с максимальным значением параболического профиля на левой границе сосуда $v(H/2)$ равным 400 мкм/с (В) и 1000 мкм/с (С). Расчеты велись в течение 10 мин модельного времени, сгустки достигали своей окончательной высоты после 2–3 мин расчета. Концентрация антитромбина была выбрана равной $A_0 = 0.4$.

2.4 Роль скорости потока в формировании тромба

Количественная характеристика реализации того или иного режима образования тромба может быть получена с помощью оценки числа Дамкёлера, представляющего собой отношение скорости наработки тромбина к скорости конвекции. Рассмотрим нашу модель в безразмерных переменных:

$$x^* = \frac{x}{H}, \quad \nabla = \frac{\nabla^*}{1/H}, \quad \Delta = \frac{\Delta^*}{1/H^2}, \quad v = \frac{v^*}{v_0}, \quad t^* = \frac{t}{H/v_0}, \quad (2.4.1)$$

$$k_i^* = \frac{k_i}{k^0} \quad i = 1, \dots, 9, \quad k_a^* = \frac{k_a}{k^0}, \quad (2.4.2)$$

где k^0 — характерная скорость реакций системы. Тогда уравнение (2.1.5) принимает вид:

$$\frac{\partial T}{\partial t^*} + \nabla^* \cdot (v^* T) = \frac{D}{v_0 H} \Delta^* T + \frac{H}{v_0} (\Phi^*(T, B_a, C_a) P - k_a^* A T), \quad (2.4.3)$$

$$\Phi^*(T, B_a, C_a) = k_3^* B_a + \frac{k_4^* T^3}{1 + k_5^* C_a}. \quad (2.4.4)$$

Рост кровяного сгустка на удалении от стенки сосуда определяется реакциями положительной обратной связи каскада свертывания, а значит, на границе фронта распространения волны тромбина мы можем положить $B_a = 0$ и $C_a = 0$. Тогда число Дамкёлера будет равно:

$$D_a = \frac{H}{v_0} (k_4^* P_0^4 - k_a^* A_0 P_0). \quad (2.4.5)$$

Два различных режима образования тромбов в микрососудах разделены критическим числом Дамкелера D_{ac} , равным примерно 2. В случае быстрой реакции и медленной конвекции ($D_a > D_{ac}$) распространение волны тромбина ведет к неограниченному росту фибринового сгустка и полной закупорке сосуда (рис. 3.7). При $D_a < D_{ac}$ характерное время конвекции меньше характерного времени реакции и конечная высота сгустка не достигает диаметра сосуда, а обратно пропорциональна числу Дамкелера (рис. 3.8), то есть, в нашем случае, оказывается примерно равной половине диаметра сосуда.

Зависимость конечного размера сгустка от начальной скорости потока при разных концентрациях антитромбина показана на рис. 3.10 А. Полная закупорка сосуда происходит только в том случае, если скорость потока достаточно мала. Если скорость потока достаточно велика, то размер сгустка остается ограниченным (частичная закупорка). Мы снова наблюдаем резкий переход между этими двумя режимами для нашей модели.

Таким образом, наблюдаемые три режима роста сгустка: инициация без распространения, инициация с ограниченным распространением (частичная окклюзия) и инициация с неограниченным распространением (полная окклюзия) качественно подобны для роста сгустка в покоящейся плазме и в кровотоке. В следующем разделе мы определим условия существования каждого из этих трех режимов на основе анализа упрощенной модели.

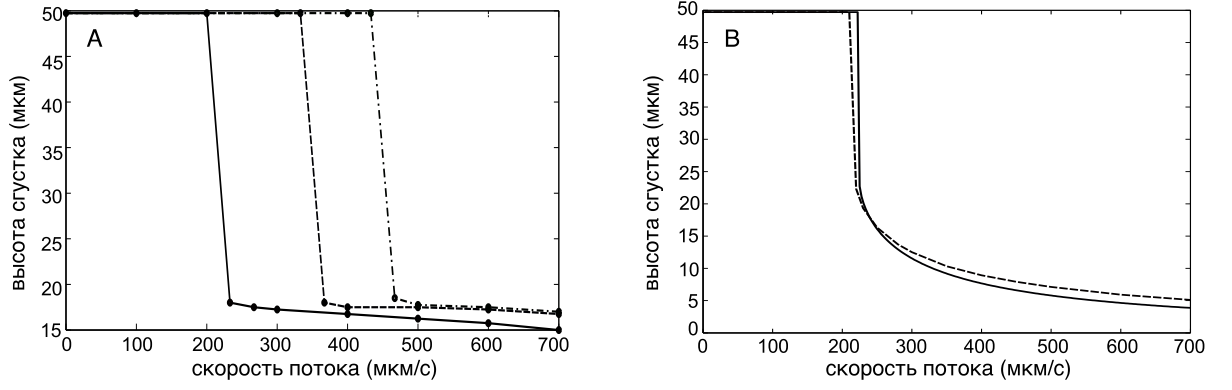


Рис. 3.10: Финальная высота сгустка при различных значениях начальной скорости кровотока. А. Результаты численного интегрирования модели, описанной в разделах 2.1–2.2 для трех различных значений концентрации антитромбина в плазме: $A_0 = 0.4$ (сплошная линия), $A_0 = 0.375$ (пунктир), $A_0 = 0.35$ (штрихпунктир). В. Численное (сплошная линия) и аналитическое (пунктир) решения упрощенной модели (2.5.1) для $A_0 = 0.4$.

2.5 Теоретический анализ упрощенной модели

Рассмотрим упрощенную модель образования кровяного сгустка. Пусть переменная T описывает изменение концентрации тромбина вдоль оси, перпендикулярной стенке сосуда. Мы также будем полагать, что распространение тромбина происходит в зоне, достаточно удаленной от здоровых стенок сосуда, а значит, не ингибируется активированным протеином С. В таком приближении распространение тромбина можно описать следующим уравнением:

$$\frac{\partial T}{\partial t} = D \frac{\partial^2 T}{\partial y^2} + \Phi(T, y), \text{ где } \Phi(T, y) = (k_3 B_a(y) + k_4 T^3)(P_0 - T) - \sigma(y)T. \quad (2.5.1)$$

Здесь $\sigma(y)$ включает в себя ингибирование тромбина как антитромбином, так и потоком: $\sigma(y) = \alpha_1 A_0 + \alpha_2 v(y)$. Концентрацию антитромбина мы полагаем постоянной, а скорость $v(y)$ соответствует скорости потока в горизонтальном направлении, полученной при решении уравнений Навье-Стокса, как будет показано ниже.

Считая, что с момента запуска системы свертывания прошло достаточно времени, мы полагаем, что распределение концентраций факторов IX и X достигло своего стационарного значения. Решение стационарной проблемы для второго уравнения (2.1.8) принимает вид: $B_a(y) = \lambda e^{-\sqrt{\frac{k_b}{D}} y}$.

Если $k_3 = \alpha_2 = 0$, то функция Φ не зависит от y , и (2.5.1) представляет собой автономное реакционно-диффузионное уравнение. Оно обладает автоволновым решением $T(y, t) = W(y - ct)$, где c — скорость распространения автоволны, удовлетворяющей сле-

дующему уравнению:

$$W'' + cW' + \Phi(W) = 0,$$

рассматриваемому на всей оси с пределами на бесконечности $W(-\infty) = T^*$, $W(\infty) = 0$, где T^* — максимальный корень уравнения $\Phi(T) = 0$. Решение уравнения (2.5.1) сходится к автоволне, если начальное условие достаточно велико. Скорость распространения волны положительна тогда и только тогда, когда выполнено следующее условие [264]:

$$\int_0^{T^*} \Phi(T, y) dT > 0. \quad (2.5.2)$$

Только при положительных значениях скорости c в модели будет наблюдаться рост сгустка. В случае отсутствия потока в нашей модели, ее знак будет определяться концентрацией антитромбина.

2.5.1 Критическая концентрация антитромбина

Пусть коэффициенты k_3 и k_4 отличны от нуля и функция Φ зависит от y . Если мы предположим, что эта зависимость слаба, то есть $\partial\Phi/\partial y$ достаточно мала, то неравенство (2.5.2) выполнено для каждого фиксированного значения y . Возьмем значение y равным нулю, что соответствует координате стенки сосуда, и будем увеличивать его, рассматривая концентрацию тромбина на некотором расстоянии от стенки. В определенный момент неравенство (2.5.2) перестанет выполняться и критическое значение y будет примерно соответствовать максимальной высоте сгустка.

Таким образом, для заданного выражения функции Φ условие (2.5.2) дает нам следующую оценку критической концентрации антитромбина, при значениях меньше которой мы наблюдаем рост тромба:

$$A_0 < \frac{1}{\alpha_1} \left(2k_3\lambda \frac{P_0}{T^*} - k_3\lambda + k_4 \frac{(T^*)^2 P_0}{2} - 2k_4 \frac{(T^*)^3}{5} \right). \quad (2.5.3)$$

2.5.2 Критическое значение скорости потока

Пусть концентрация антитромбина фиксирована. Рассмотрим влияние скорости потока в упрощенной модели. Пусть поток задается простым уравнением Пуазейля, а сгусток имеет строгую прямоугольную форму (рис. 3.11). Тогда скорость потока $\vec{v} = (v(y), 0)$ удовлетворяет уравнению:

$$\frac{d^2 v}{dy^2} = \frac{1}{\mu} \frac{dp}{dx}, \quad (2.5.4)$$

где μ — кинематическая вязкость, dp/dx — градиент давления.

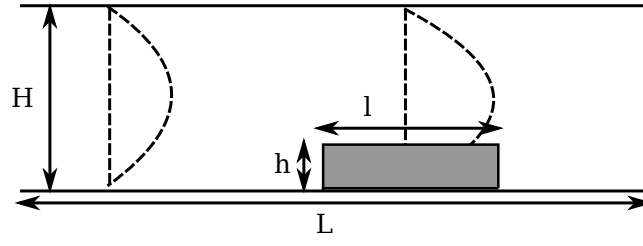


Рис. 3.11: Упрощенная модель потока в сосуде с прямоугольным сгустком.

В предположение, что проницаемость сгустка низкая, скорость потока на границе сгустка описывается граничным условием отсутствия скольжения [271]. Решением такого уравнения является усеченный параболический поток:

$$v_1(y) \simeq \begin{cases} ay(H - y), & \text{если } y > h, \\ 0, & \text{если } y \leq h, \end{cases} \quad (2.5.5)$$

где H — диаметр сосуда. Мы также рассматриваем поток Пуазейля в части сосуда без сгустка: $v_2(y) = by(H - y)$, где $b = 4v_m/H^2$.

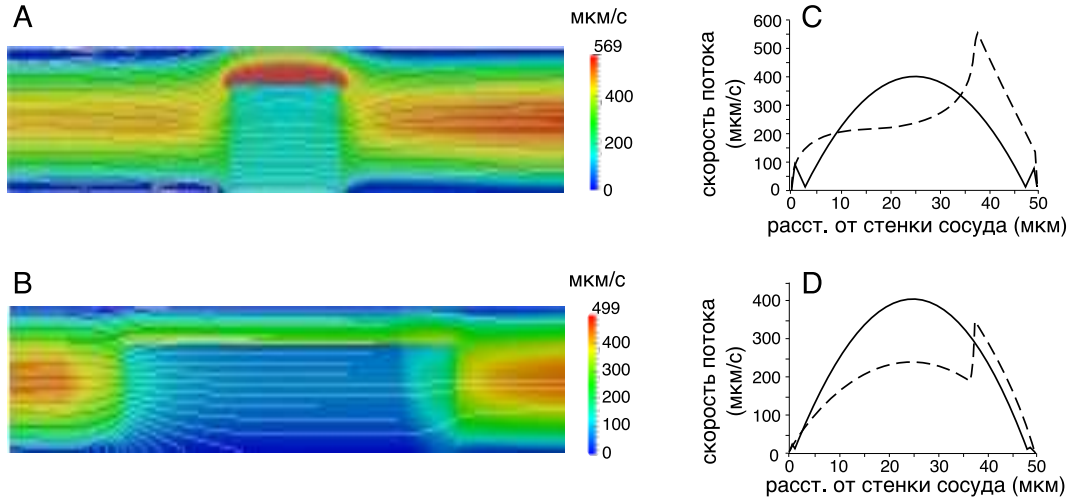


Рис. 3.12: Результаты численного моделирования кровотока в случае прямоугольных сгустков для концентрации полимера фибрина (F_p) равной 0.4 для сгустка размером 35×35 мкм (A,C) и 100×35 мкм (B,D). Двумерные профили скоростей показаны линиями тока (A,B). На рисунках (C,D) показано сравнение исходного параболического профиля (сплошная линия) и профиля скорости в вертикальном поперечном сечении в середине сгустка (пунктирная линия).

Из закона сохранения массы получаем равенство:

$$\int_0^H v_1(y) dy = \int_0^H v_2(y) dy.$$

Беря соответствующие интегралы, мы получаем:

$$a \left(\frac{(H-h)^3}{6} + \frac{h}{2}(H-h)^2 \right) = b \frac{H^3}{6}.$$

Общее падение давления равно разности давлений в узкой части канала (со сгустком) и широкой части канала (без сгустка):

$$al + b(L-l) = \beta,$$

где $\beta = \frac{dp}{dx}L/(2\mu)$. В силу предыдущих выкладок, мы можем определить значение a :

$$a = \frac{\beta}{l + (L-l)(1 - \frac{h}{H})^2(1 + 2\frac{h}{H})}. \quad (2.5.6)$$

Этот коэффициент зависит от ширины сгустка l и его высоты h . В предельном случае при $l = 0$, a является возрастающей функцией h , стремящейся к бесконечности при $h \rightarrow H$. Для положительного l функция a остается ограниченной с зависимостью параболического типа (рис. 3.13), а скорость потока уменьшается с увеличением размера сгустка l . При малых значениях l максимум a достаточно велик, чтобы обеспечить высокую скорость потока, достаточную для остановки роста сгустка, которая не может быть получена для больших l (рис. 3.12).

Мы можем определить окончательный размер сгустка, проинтегрировав условие (2.5.2):

$$v_1(y) < \frac{1}{\alpha_2} \left(2k_1 B_a(y) \frac{P_0}{T^*} - k_1 B_a(y) + k_2 \frac{(T^*)^2 P_0}{2} - 2k_2 \frac{(T^*)^3}{5} - \alpha_1 A_0 \right), \quad (2.5.7)$$

где $v_1(y)$ задано (2.5.5), (2.5.6). Если это условие выполнено, то сгусток продолжает расти, и его рост останавливается, если высота сгустка y достаточно велика, чтобы изменить знак неравенства. Следовательно, мы можем определить условия частичной или полной закупорки сосуда и конечный размер сгустка.

Напомним, что максимальная скорость потока v_m на входе в сосуд равна $bH^2/4$. Зависимость конечного размера сгустка от этого параметра приведена на рис. 3.10 В. Две кривые показывают численное решение уравнения (2.5.1) и представленное выше аналитическое приближение. Эти кривые близки друг к другу, и их поведение качественно аналогично зависимости, полученной при численном интегрировании задачи, сформулированной в разделах 2.1–2.2 (рис. 3.10 В). Как в полной задаче, так и в упрощенной модели мы наблюдаем полную закупорку сосуда, если скорость потока достаточно мала, и частичную закупорку, если скорость потока достаточно велика. Эти два режима разделены резким переходом, определяемым пороговыми значениями средней скорости потока.

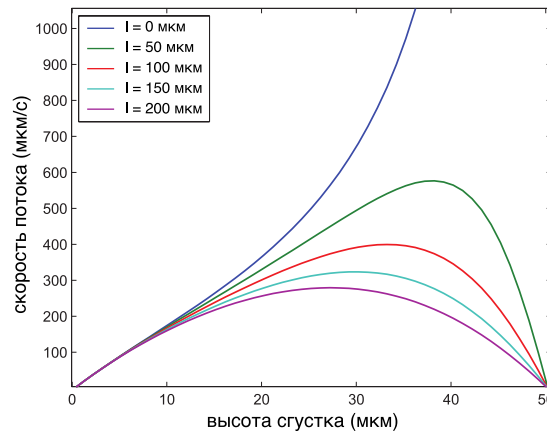


Рис. 3.13: Зависимость скорости потока от размера сгустка.

2.6 Заключение о результатах моделирования активации внешнего пути

Основной целью исследования, представленного в данном разделе, являлся анализ условий полной или частичной закупорки сосудов при активации внешнего пути каскада свертывания крови, на основании результатов численного моделирования роста тромба в просвете сосуда. Рассмотренная модель включала в себя ряд существенных допущений. В частности, реакции каскада свертывания были описаны упрощенной моделью, что позволило нам существенно сэкономить время вычислений. Из модели было полностью исключено тромбоцитарное звено. В то же время, присутствие активированных тромбоцитов должно существенно ускорять образование сгустка [122]. Наше допущение ведет к тому, что пороговая скорость потока, предотвращающая закупорку сосуда, оказывается существенно ниже характерной скорости потока в сосудах рассматриваемого размера. В наших будущих исследованиях текущая модель будет дополнена, и в ней в явном виде будет учтена концентрация тромбоцитов, что должно сделать результаты моделирования более близкими к условиям *in vivo*.

С точки зрения активации внешнего пути при сепсисе, представленные результаты численного моделирования дают косвенные оценки критической величины повреждения стенки сосуда в ответ на контакт с ЛПС. Размер повреждения, равный 50–90 мкм (рис. 3.9 В,С), примерно соответствует длине одного эндотелиоцита [272]. Таким образом, в нашей модели полное открепление одной клетки эндотелия в венуле ведет к закупорке сосуда при скоростях потока до 1000 мкм/с. В то же время, в экспериментах *in vitro* ЛПС в концентрации 10 нг/мл способны вызывать открепление до 15% клеток культуры эндотелиоцитов [147]. Несмотря на

то, что такие концентрации ЛПС существенно выше летальных и не могут наблюдаться по всему организму, такой сильный ответ эндотелия на контакт с ЛПС, видимо, свидетельствует в пользу образования локальных очагов нарушения целостности эндотелия, достаточных для провокации формирования тромбов, закупоривающих небольшие сосуды.

3 Активация контактного пути системы свертывания: роль агрегатного состояния ЛПС

Активация контактного пути при сепсисе является одним из важных факторов развития спонтанного внутрисосудистого тромбоза и происходит в частности в ответ на попадание в кровь ЛПС. В работе [17], была продемонстрирована *in vitro* активация FXII очищенным ЛПС в смеси очищенного FXII и РК. В работе [18] аналогичным образом была продемонстрировано действие ЛПС в смеси очищенного FXII, РК и НМWK. В обеих работах степень активации контактной системы определялась как значение амидолитической активности калликреина к концу эксперимента. Интересно, что в обеих системах увеличение значения этого параметра при увеличении концентрации ЛПС происходило только до достижения некоторой критической концентрации ЛПС. Дальнейшее увеличение концентрации ЛПС вело к снижению активности контактной системы на момент измерения. Подобный эффект, по-видимому, связан с ключевой ролью поверхностных эффектов в активации контактной системы. Роль поверхности в активации контактной системы была ранее изучена при помощи кинетической модели активации FXII на циркулирующих микровезикулах [153]. В данном разделе мы разрабатываем математические модели активации контактного пути агрегатами ЛПС на основе экспериментальных данных *in vitro* для систем FXII-РК [17] и FXII-РК-НМWK [18] с целью воспроизведения наблюдаемого эффекта поверхностного ингибирования.

Мы принимаем следующую схему реакций контактного пути, возникающих в чистой системе. Активация FXII может произойти при его контакте с чужеродной поверхностью ЛПС-агрегата, вызывающей конформационное изменение. FXIIa способствует активации растворимого прекалликреина. Связанный с поверхностью фактор XII (FXIIb), в свою очередь, расщепляется калликреином. В случае рассмотрения экспериментальной системы из [18], НМWK способствует локализации прекалликреина на поверхности агрегата и, таким образом, значительно ускоряет активацию FXII. Мы предполагаем, что FXII конкурирует с комплексами НМWK и НМWK за сайты связывания на поверхности агрегата. Как FXII, так и НМWK могут занимать только один сайт связывания. Результирующие модели реакций

для системы из работ [17] и [18] приведены на рисунках 3.14 А и В, соответственно.

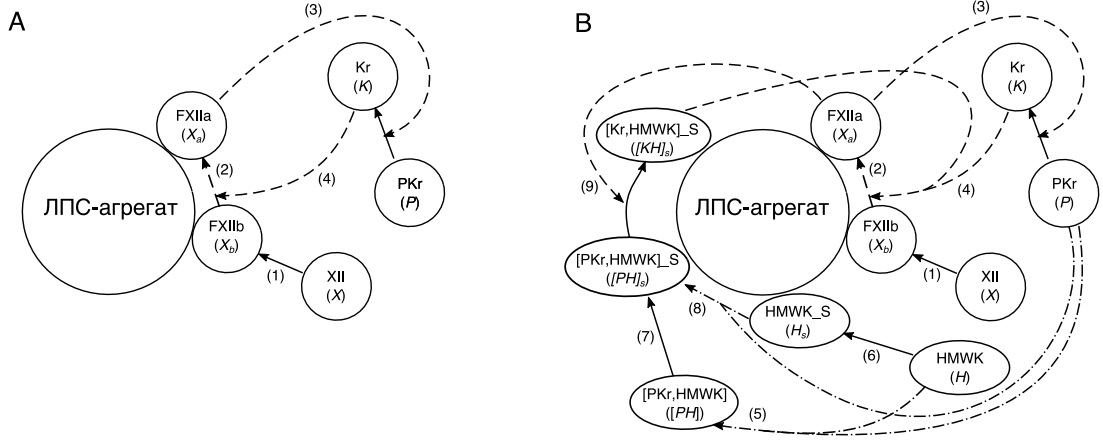


Рис. 3.14: Схематическое представление реакций активации контактного пути в чистых системах в отсутствие (А, [17]) или с добавлением (В, [18]) НМВК. Пунктирные стрелки соответствуют реакциям активации, штрих-пунктирные стрелки соответствуют реакциям образования комплексов, сплошные стрелки соответствуют реакциям связывания с поверхностью. Обратимые реакции связывания факторов с сайтами на поверхности агрегата (1,6,7), реакции комплексообразования (5,8) и реакция спонтанной активации FXIIb (2) описываются законом действующих масс с кинетическими константами k_i, k_{-i} , $i = 1, 5-8$, реакции активации (3,4,9) описываются кинетикой Михаэлиса-Ментена со скоростями равными m_j и константам Михаэлиса, равными M_j для $j = 3, 4, 9$.

3.1 Математическая модель

Мы моделируем кинетику активации контактного пути с помощью обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ) на концентрации участвующих белков (рис. 3.14). Переменные модели приведены в табл. 3.1. Заметим, что концентрации белков рассматриваются как объемные концентрации (мкМ) для факторов, растворенных в плазме (переменные $X, P, K, H, [PH]$) и как поверхностные концентрации для факторов, связанных с поверхностью ЛПС-агрегата (переменные $\bar{X}_a, \bar{X}_b, \bar{H}_s, [\bar{PH}]_s, [\bar{KH}]_s$). В последнем случае, концентрации измеряются в молекулах или комплексах на один квадратный микрометр поверхности агрегата ЛПС (обозначается как мкм^{-2}). Те же единицы используются для количественной оценки доступных сайтов связывания на поверхности агрегатов.

Чтобы сформулировать нашу модель с точки зрения концентраций, наблюдаемых в экспериментах, т. е. объемных концентраций, введем конвертирующий член $\kappa = A_{lps}F/V_{sol}$, где

A_{lps} — площадь поверхности агрегата ЛПС, V_{sol} — объем раствора, приходящийся на один агрегат ЛПС, а F — коэффициент преобразования. Тогда мы можем перейти к следующим переменным, соответствующим объемным концентрациям:

$$S = \kappa \bar{S}, \quad X_b = \kappa \bar{X}_b, \quad X_a = \kappa \bar{X}_a, \quad H_s = \kappa \bar{H}_s, \quad [PH]_s = \kappa [\bar{PH}]_s, \quad [KH]_s = \kappa [\bar{KH}]_s.$$

В нашей модели мы предполагаем, что изменения объемных концентраций как растворенных, так и поверхностных белков определяются реакциями, изображенными на рис. 3.14. Мы считаем, что реакции ферментативного катализа проходят согласно кинетике Михаэлиса-Ментена, а реакции связывания белка с поверхностью агрегата ЛПС, образования белкового комплекса и спонтанной активации FXII описываются законом действующих масс. Таким образом, первая модель, описывающая активацию FXII в чистой системе без НМWK (рис. 3.14 А), состоит из следующих шести уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{dS}{dt} &= -k_1 X S + k_{-1} X_b, \\ \frac{dX_b}{dt} &= k_1 X S - k_{-1} X_b - k_2 X_b - \frac{m_4 X_b K}{M_4 + X_b + K}, \\ \frac{dX_a}{dt} &= k_2 X_b + \frac{m_4 X_b K}{M_4 + X_b + K}, \\ \frac{dX}{dt} &= -k_1 X S + k_{-1} X_b, \\ \frac{dK}{dt} &= \frac{m_3 P X_a}{M_3 + P + X_a}, \\ \frac{dP}{dt} &= -\frac{m_3 P X_a}{M_3 + P + X_a}, \end{aligned} \tag{3.1.1}$$

удовлетворяющих следующим уравнениям сохранения:

$$P + K = P_0, \quad S + X_b + X_a = S_0, \quad X + X_b + X_a = X_0, \tag{3.1.2}$$

где P_0 , S_0 и X_0 — начальные концентрации РК, сайтов связывания и FXII соответственно.

Вторая модель, описывающая активацию FXII в присутствии НМWK (рис. 3.14 В), состоит из следующих 11 уравнений:

Таблица 3.1: Переменные, используемые в математической модели активации контактного пути на ЛПС агрегатах

переменная	вещество	компартмент	начальное значение в модели 3.1.1	начальное значение в модели 3.1.3
Переменные моделей 1 и 2				
$\bar{S}$	сайты связывания	поверхность	11510 мкм^{-2}	11510 мкм^{-2}
X	FXII	раствор	0.16 мкМ [17]	0.069 мкМ [18]
$\bar{X}_a$	FXIIa	поверхность	0	0
$\bar{X}_b$	FXIIb	поверхность	0	0
P	PK	раствор	0.14 мкМ^* [17]	0.28 мкМ [18]
K	Kr	раствор	0	0
Дополнительные переменные, используемые в модели 2				
H	HMWK	раствор	—	0.22 мкМ [18]
$\bar{H}_s$	связанный с поверхностью HMWK (HMWK_S)	поверхность	—	0
$[PH]$	комплекс [PK, HMWK]	раствор	—	0
$[\overline{PH}]_s$	связанный с поверхностью комплекс [PK, HMWK]_S	поверхность	—	0
$[\overline{KH}]_s$	связанный с поверхностью комплекс [Kr, HMWK]_S	поверхность	—	0
Конвертирующие параметры				
A_{lps}	площадь поверхности ЛПС-агрегата	0.02 мкм^2		
F	конвертирующий фактор	$1.66 \cdot 10^{-3} \text{ мкМмкм}^3$		
V_{sol}	объем раствора, приходящийся на один ЛПС-агрегат	варьировался в соответствии с экспериментальными установками в [18] и [17]		

* Под начальной концентрацией PK в модели 3.1.1 подразумевается начальная концентрация PK, добавленного в систему после 20 мин инкубирования FXII и ЛПС (см. раздел 3.2.2.1).

$$\begin{aligned}
\frac{dS}{dt} &= -k_7[PH]S + k_{-7}[PH]_s - k_1XS + k_{-1}X_b - k_6HS + k_{-6}H_s, \\
\frac{dX_b}{dt} &= k_1XS - k_{-1}X_b - k_2X_b - \frac{m_4X_b[KH]_s}{M_4 + X_b + [KH]_s} - \frac{m_4X_bK}{M_4 + X_b + K}, \\
\frac{dX_a}{dt} &= k_2X_b + \frac{m_4X_b[KH]_s}{M_4 + X_b + [KH]_s} + \frac{m_4X_bK}{M_4 + X_b + K}, \\
\frac{d[PH]_s}{dt} &= k_7[PH]S - k_{-7}[PH]_s + k_8PH_s - k_{-8}[PH]_s - \frac{m_9[PH]_sX_a}{M_9 + [PH]_s + X_a}, \\
\frac{d[KH]_s}{dt} &= \frac{m_9[PH]_sX_a}{M_9 + [PH]_s + X_a}, \\
\frac{dH_s}{dt} &= k_6HS - k_{-6}H_s - k_8PH_s + k_{-8}[PH]_s, \\
\frac{dH}{dt} &= -k_5PH + k_{-5}[PH] - k_6HS + k_{-6}H_s, \\
\frac{dX}{dt} &= -k_1XS + k_{-1}X_b, \\
\frac{d[PH]}{dt} &= k_5PH - k_{-5}[PH] - k_7[PH]S + k_{-7}[PH]_s, \\
\frac{dK}{dt} &= \frac{m_3PX_a}{M_3 + P + X_a}, \\
\frac{dP}{dt} &= -k_5PH + k_{-5}[PH] - \frac{m_3PX_a}{M_3 + P + X_a} - k_8PH_s + k_{-8}[PH]_s,
\end{aligned} \tag{3.1.3}$$

удовлетворяющих следующим уравнениям сохранения:

$$P + K + [PH] + [PH]_s + [KH]_s = P_0, \quad H + H_s + [PH] + [PH]_s + [KH]_s = H_0, \tag{3.1.4}$$

$$S + X_b + X_a + H_s + [PH]_s + [KH]_s = S_0, \quad X + X_b + X_a = X_0. \tag{3.1.5}$$

где P_0 , H_0 , S_0 и X_0 — начальные концентрации РК, НМWK, сайтов связывания и FXII соответственно.

Важно отметить, что константы Михаэлиса M_4 и M_9 зависят от размеров компартментов. Их значения заданы выражениями:

$$M_4 = \kappa \overline{M}_4, \quad M_9 = \kappa \overline{M}_9.$$

Экспериментальные кривые, полученные как в [17], так и в [18], имеют характерную куполообразную форму. Максимальная концентрация калликреина к концу эксперимента наблюдается для концентраций ЛПС равной ~ 180 мкг/мл в отсутствие НМWK (рис. 3.15 А) и ~ 20 мкМ (рис. 3.15 В) в системе с НМWK. Далее эти концентрации мы будем называть оптимальными. Концентрации ЛПС больше оптимального значения ведут к уменьшению наблюдаемой активности калликреина. Чтобы описать такое поведение системы, мы выполнили оценку неизвестных параметров наших математических моделей 3.1.1 и 3.1.3, варьируя

кинетические константы k_i , m_i , M_i и начальную поверхностную концентрацию доступных сайтов связывания $\bar{S}_0$ (см. раздел 4 главы 2). Основным параметром, используемым для валидации модели и выбора параметров, была наблюдаемая концентрация калликреина в конце эксперимента. В случае модели (3.1.1), весь калликреин присутствует в растворенном виде и его наблюдаемая концентрация совпадает с его объемной концентрацией. В случае модели (3.1.3), наблюдаемая концентрация калликреина определяется объемной концентрацией свободного калликреина и поверхностной концентрацией комплекса $[Kr, HMWK]$ относительно объема раствора:

$$K_{obs} = K + [KH]_s. \quad (3.1.6)$$

3.2 Результаты моделирования

Результаты подборки параметров в модели 3.1.1 для воспроизведения кривой из работы [17] и в модели 3.1.3 — для воспроизведения данных из работы [18], приведены на рис. 3.15 А и рис. 3.15 В соответственно. Значения параметров модели приведены в табл. 2.1 раздела 4 главы 2.

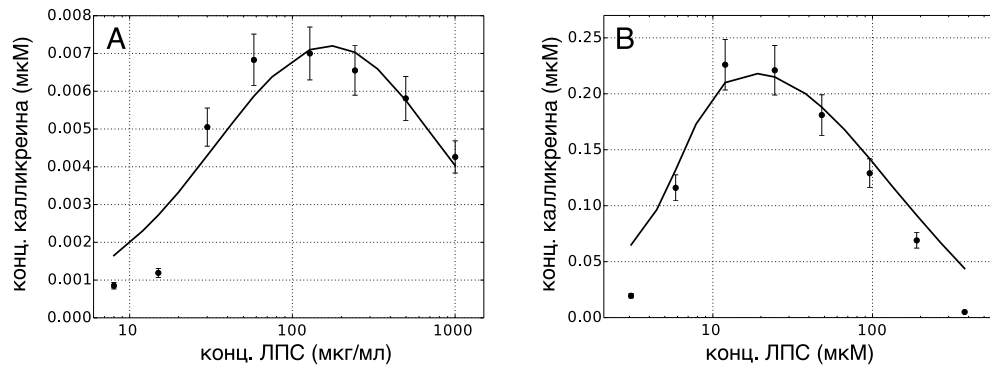


Рис. 3.15: Наблюдаемая концентрация калликреина (K_{obs}) к концу времени эксперимента для разных значений концентрации ЛПС. Кривая соответствует результатам моделирования, точки — экспериментальным данным. А. Результат подбора параметров в модели 3.1.1 для воспроизведения экспериментальных данных [17] (2400 с). В. Результат подбора параметров в модели 3.1.3 для воспроизведения экспериментальных данных [18] (1800 с). В [17] ЛПС и FXII были инкубированы в течение 20 мин до добавления в систему РК. Концентрации ЛПС на графике (А) соответствуют таковым для финальной системы.

3.2.1 Роль агрегатного состояния ЛПС

Существование оптимальной концентрации ЛПС можно объяснить ролью поверхностных эффектов в реакциях контактной активации. Действительно, основные реакции рассматриваемого процесса происходят на поверхности агрегатов ЛПС и, следовательно, сильно зависят от концентрации доступных сайтов связывания. Высокая концентрация ЛПС приводит к эффекту поверхностного ингибирования, то есть способствует быстрому связыванию всех растворенных факторов на поверхности агрегатов и, таким образом, предотвращает взаимодействие связанных факторов с белками плазмы, а также друг с другом. Эту гипотезу можно проверить с помощью разработанных математических моделей.

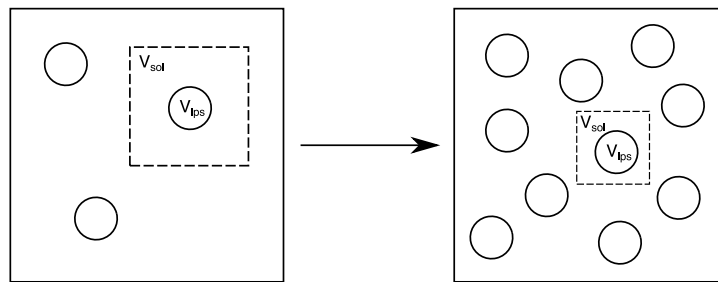


Рис. 3.16: Изменение объема доступного для контакта с ЛПС-агрегатами раствора при изменении концентрации ЛПС.

Чтобы воспроизвести экспериментальные результаты, полученные в [17] и [18], необходимо предположить, что ЛПС присутствуют в растворе в виде агрегатов. Действительно, при этом предположении увеличение концентрации ЛПС приводит к увеличению площади поверхности агрегатов ЛПС по отношению к имеющемуся объему раствора (рис. 3.16). В терминах математических моделей это соответствует уменьшению компартмента V_{sol} , соответствующего объему раствора, приходящегося на один агрегат ЛПС, и к увеличению коэффициента преобразования κ (см. раздел 3.1). В результате, начальная объемная концентрация доступных сайтов связывания, определяемая выражением $S(0) = \kappa \bar{S}(0)$, увеличивается, и для малых концентраций ЛПС наблюдается увеличение активности калликреина из-за увеличения скорости поверхностных реакций. В то же время, количество растворенных факторов, участвующих в поверхностных реакциях активации, уменьшается при малых значениях V_{sol} , и мы наблюдаем экспериментально описанный эффект поверхностного ингибирования (рис. 3.17, сплошные линии).

Такой эффект не может быть воспроизведен, если мы предположим, что ЛПС участвует в реакциях активации в растворенном виде. Действительно, если мы будем воспроизводить

увеличение концентрации ЛПС путем простого увеличения концентрации доступных сайтов связывания ($\bar{S}_0$), то результаты моделирования будут отличаться от экспериментально наблюдаемого поведения системы. Увеличение концентрации сайтов связывания для фиксированных объемов компартментов приводит к монотонному увеличению активности калликрейна до его максимального значения (рис. 3.17, пунктирные линии). Таким образом, можно сделать вывод, что в рассматриваемой системе ЛПС образуют агрегаты и обеспечивают активирующую поверхность для реакций контактной системы.

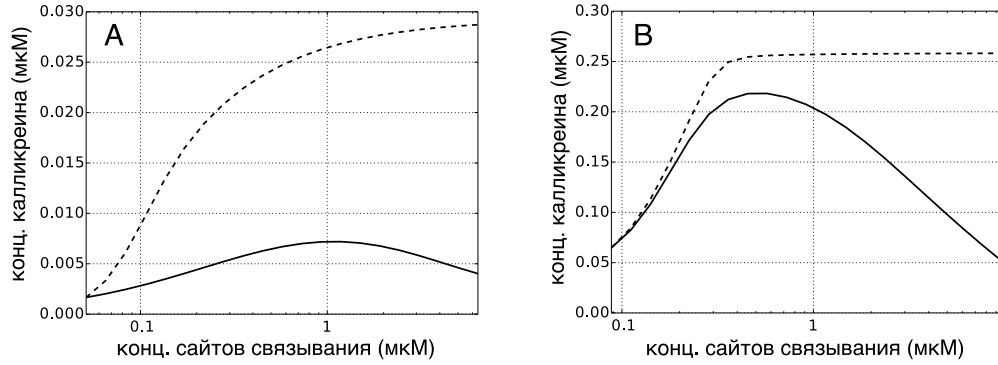


Рис. 3.17: Наблюдаемая концентрация калликрейна на момент окончания экспериментов модели 3.1.1 (K , А) и модели 3.1.3 (K_{obs} , определяемая (3.1.6), В) как функции объемной концентрации сайтов связывания на ЛПС агрегатах. Объем раствора на один агрегат V_{sol} был равен 7.47 мкм^3 для модели (3.1.1) (А) и 4.34 мкм^3 для модели (3.1.3) (В). Пунктир: площадь поверхности агрегата A_{lps} равна 0.02 мкм^2 для обеих моделей, поверхностная концентрация сайтов связывания S_0 варьировалась от 11510 до 1441002 мкм^{-2} для 3.1.1 (А) и до 1248835 мкм^{-2} для 3.1.3 (В). Сплошные линии: поверхностная концентрация сайтов связывания S_0 равна 11510 мкм^{-2} для обеих моделей, площадь поверхности агрегатов A_{lps} варьировалась от 0.02 до 2.5 мкм^2 для модели 3.1.1 (А) и до 2.46 мкм^2 для модели 3.1.3 (В). Горизонтальными линиями отмечены уровни концентрации калликрейна на момент окончания эксперимента и соответствующие концентрации ЛПС, рассмотренные на рис. 3.18 (А) и рис. 3.19 (В).

3.2.2 Кинетика активации факторов

В обеих экспериментальных установках [17, 18] активность калликрейна контролировалась по истечении фиксированного времени после добавления ЛПС к модельной системе. Авторы предположили, что к этому времени было достигнуто некоторое стационарное состояние. Однако истинное стационарное состояние в рассматриваемых системах может быть достигнуто

только тогда, когда весь прекалликреин, присутствующий в растворе, будет расщеплен. Таким образом, представляет интерес кинетика активации факторов. Мы сравнили кинетику активации контактного пути для концентраций ЛПС ниже и выше оптимальной концентрации ЛПС, обеспечивающей максимальную активность калликреина, наблюдаемую в [17, 18].

3.2.2.1 Активация контактной системы в отсутствие НМWK. Во-первых, рассмотрим кинетику активации контактной системы для оптимальной концентрации ЛПС, то есть для концентрации ЛПС, обеспечивающей максимальную активность калликреина к концу эксперимента. В эксперименте, описанном в [17], FXII и ЛПС инкубировали в отсутствие калликреина в течение первых двадцати минут. По истечении этого периода к системе добавляли калликреин и конечную систему инкубировали еще 20 мин. Согласно нашей модели, добавление калликреина к системе значительно ускоряет дальнейшую активацию FXII (рис. 3.18 А, серая линия). Однако, концентрация FXIIa достигает стационарного значения только на временах больше 40 мин с начала моделирования (примерно на 45-ой минуте). Момент измерения в [17], обозначен вертикальными линиями на рис. 3.18.

По результатам моделирования концентрация калликреина в растворе далека от стационарного значения к концу эксперимента (рис. 3.18 В, серая линия). Более того, к концу 40-ой минуты эксперимента скорость активации калликреина достигает стационарного значения около 0.0016 мкМ/мин (рис. 3.18 В, серая линия), и дальнейшее производство калликреина в системе происходит до момента активации всего прекалликреина в растворе.

Проанализируем поведение системы при различных значениях концентрации ЛПС. Вместе с оптимальным значением концентрации ЛПС (рис. 3.18, серые линии) рассмотрим две концентрации ЛПС, для которых к концу эксперимента количество наработанного калликреина составляло 0.005 мкМ (рис. 3.17 А, горизонтальная линия). Ясно, что равновесная поверхностная концентрация FXIIa тем выше, чем больше значение имеющегося объема раствора. В то время как кинетика активации калликреина очень близка в трех рассмотренных случаях (рис. 3.18 В), степень активации FXII на поверхности агрегата ЛПС достигает максимальных значений для концентрации ЛПС ниже оптимальной (рис. 3.18 А, пунктирная линия), и имеет меньшие значения при высокой концентрации ЛПС (рис. 3.18 А, сплошная черная линия).

3.2.2.2 Активация контактной системы в присутствии НМWK. Добавление НМWK в раствор существенно влияет на процесс активации контактной системы. Основное отличие заключается в том, что помимо активации калликреина в растворе, НМWK спо-

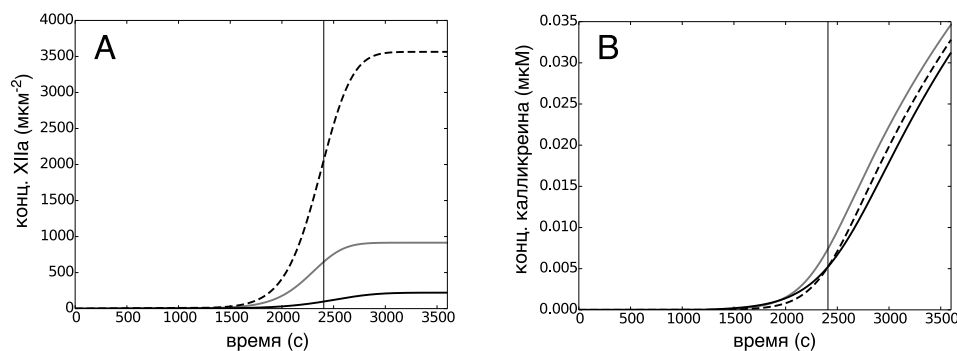


Рис. 3.18: Кинетика активации факторов в модели 3.1.1. Поверхностная концентрация FXIIa ($\bar{X}_{IIa}$, A) и объемная концентрация калликреина (K , B) как функции времени. Вертикальные линии обозначают время измерения в эксперименте [17] (40 мин). Кинетики рассчитаны для концентрации ЛПС, соответствующей максимальную активность калликреина к концу эксперимента (серые линии) и для концентраций ЛПС, для которых концентрация калликреина к концу эксперимента составила 0.005 мкМ (см. рис. 3.17 A): V_{sol} равен 0.092 мкМ³ (сплошная черная линия) и 1.48 мкМ³ (черный пунктир).

способствует активации прекалликреина на поверхности агрегатов путем образования поверхностного комплекса [PK, HMWK] (рис. 3.14). В результате, скорость наработки калликреина значительно увеличивается, что наблюдается и в нашей модели (рис. 3.17).

Рассмотрим кинетику активации для оптимальной концентрации ЛПС. Поверхностная концентрация FXIIa достигает своего стационарного значения в течение первых 12 минут моделирования (рис. 3.19 A, серая линия). В то же время, к моменту измерения мы наблюдаем усиленную активацию прекалликреина и его концентрация далека от стационарного значения (рис. 3.19 B, серая линия). Процесс активации прекалликреина продолжается как в растворе (рис. 3.19 D, серая линия), так и на поверхности агрегатов ЛПС, где он активируется как часть поверхностного комплекса [PK, HMWK] (рис. 3.19 C, серая линия).

Сравним кинетику реакции для концентраций ЛПС выше и ниже оптимального значения, обеспечивающие концентрацию калликреина в 0.1 мкМ на момент окончания эксперимента (рис. 3.17 B, горизонтальная линия). Во-первых, аналогично результатам модели 3.1.1 равновесное значение и скорость активации больше для низких концентраций ЛПС из-за большего количества растворенных факторов, доступных для связывания с поверхностью (рис. 3.19 A, пунктирная линия). В то же время, наблюдаемая скорость образования калликреина, по-видимому, выше для системы с высокой концентрацией ЛПС (рис. 3.19 B, сплошная черная линия). Хорошо видно, что при низкой концентрации ЛПС активация прекалликреина на поверхности протекает более эффективно (рис. 3.19 C). Однако активация растворенного

прекалликреина значительно более выражена для высоких концентраций ЛПС (рис. 3.19 D). В результате общая активность калликреина, одинаковая для обеих концентраций на момент измерения (рис. 3.19 B, рис. 3.17 B), имеет тенденцию к увеличению для более высоких концентраций ЛПС в НМWK-содержащей системе.

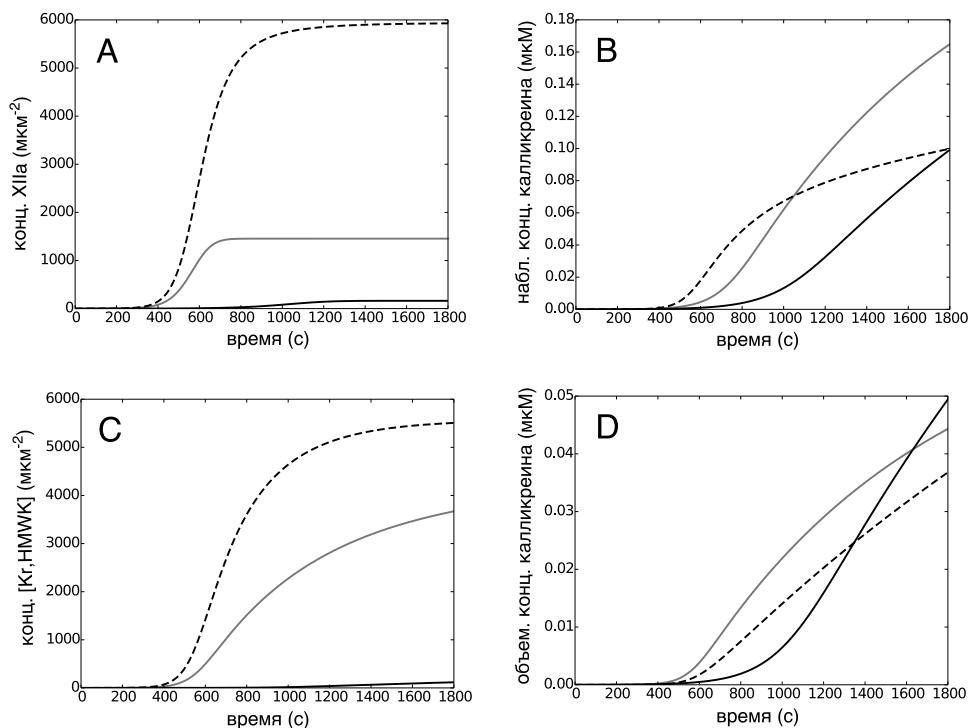


Рис. 3.19: Кинетика активации факторов в модели 3.1.3. Поверхностная концентрация FXIIa ($\bar{X}_a$, A), наблюдаемая концентрация калликреина (K_{obs} из (3.1.6), B), концентрация поверхностного комплекса калликреина и НМWK ($[\overline{KH}]_s$, C) и объемная концентрация растворенного калликреина (K , D) как функции времени. Кинетики рассчитаны для концентраций ЛПС, соответствующих максимальной активности калликреина на момент окончания эксперимента (серые линии) и для концентраций ЛПС, для которых наблюдаемая концентрация калликреина к концу эксперимента составила 0.1 μM (см. рис. 3.17 B): V_{sol} равен 0.078 μM^3 (сплошная черная линия) и 2.9 μM^3 (черный пунктир).

3.2.3 Анализ чувствительности модели

Чтобы определить параметры, оказывающие наибольшее влияние на результаты моделирования, мы проанализировали чувствительность моделей 3.1.1 и 3.1.3 (табл. 3.2). Процедура была выполнена с помощью соответствующей утилиты COPASI. В качестве ключевого выходного параметра мы использовали концентрацию калликреина в момент времени (K_{obs}). Автоматическая процедура, выполняемая COPASI, вычисляет относительную чувстви-

ность S выходного параметра $K_{obs}(t_{end})$ по отношению к изменениям некоторого параметра Y по следующей формуле:

$$S = \frac{Y \partial K_{obs}(t_{end})}{K_{obs}(t_{end}) \partial Y} = \frac{\partial \log K_{obs}(t_{end})}{\partial \log Y}. \quad (3.2.1)$$

Полученные значения относительной чувствительности для каждого параметра модели отражают чувствительность финальной концентрации калликреина к изменению этого параметра.

В обеих моделях начальные концентрации факторов оказывают большое влияние на результирующие концентрации калликреина. Начальная концентрация прекалликреина имеет самую высокую относительную чувствительность в обеих моделях. Второй набор важных параметров, определяющих динамику образования калликреина в обеих моделях, включает кинетические константы активации прекалликреина при участии FXIIa (m_3 , M_3). Более того, в модели 3.1.3 параметры активации прекалликреина на поверхности агрегата ЛПС в составе комплекса [PK, HMWK] (m_9 , M_9) оказывают еще более существенное влияние на результаты моделирования. В модели 3.1.3 также можно отметить важность кинетических параметров формирования поверхностного комплекса [PK, HMWK] (k_8 , k_{-8}).

3.3 Заключение о результатах моделирования активации контактного пути

В данном разделе мы описали первую математическую модель активации контактного пути ЛПС, разработанную на основе экспериментальных результатов [17] и [18]. Характерная куполообразная форма концентрации калликреина, наблюдаемая в экспериментах [17, 18], может быть воспроизведена в модели только при условии, что ЛПС присутствует в растворе в виде агрегатов. Другими словами, увеличение концентрации ЛПС нельзя смоделировать как увеличение концентрации сайтов связывания, а только как увеличение площади активирующей поверхности. Такое представление позволяет воспроизвести эффект поверхностного ингибирования, наблюдаемый в экспериментах [17, 18]. Мы получили кинетику активации калликреина и FXII и продемонстрировали, что к моменту измерения в рассматриваемых экспериментах [17, 18] система была далека от состояния равновесия. В результате, равные наблюдаемые концентрации калликреина были получены в экспериментах для концентраций ЛПС ниже и выше оптимального значения. Мы показали, что кинетика процесса активации значительно отличается для разных концентраций ЛПС, и эффект в большей степени выражен в присутствии HMWK. Активация прекалликреина на поверхности агрегата в составе

Таблица 3.2: Относительная чувствительность моделей 3.1.1, 3.1.3 к различным параметрам.

Серым отмечены параметры, имеющие наибольшее влияние на результат моделирования.

модель 1		модель 2	
параметр	относительная чувствительность	параметр	относительная чувствительность
объемы компартментов			
V_{sol}	0.003	V_{sol}	0.023
V_{lps}	-0.004	V_{lps}	-0.006
начальные концентрации			
X	0.905	X	0.35
P	1.209	P	0.727
$\bar{S}$	0.254	$\bar{S}$	0.266
		H	0.307
кинетические константы			
k_1	0.246	k_1	0.072
k_{-1}	-0.246	k_{-1}	-0.072
k_2	0.103	k_2	0.016
m_3	0.768	m_3	0.135
M_3	-0.866	M_3	-0.117
m_4	0.258	m_4	0.068
M_4	-0.257	M_4	-0.068
		k_5	0.025
		k_{-5}	-0.008
		k_6	0.025
		k_{-6}	-0.008
		k_7	0.025
		k_{-7}	-0.008
		k_8	0.147
		k_{-8}	-0.165
		m_9	0.285
		M_9	-0.222

комплекса [PK, HMWK] преобладает при низких концентрациях ЛПС, тогда как активация растворенного прекалликреина протекает более эффективно при высоких концентрациях

ЛПС.

Поверхностные эффекты имеют особое значение для функционирования контактной системы. Было показано, что активация FXII может происходить при его связывании с поверхностью тромбоцитов, и что этот процесс может выступать в роли чувствительного к потоку регулятора, сдвигающего баланс между поверхностно-зависимой активацией свертывания и плазменным ингибированием [273]. Активация контактной системы на циркулирующих микровезикулах может объяснить эффект гиперкоагуляции плазмы человека при разбавлении [153]. Из наших результатов следует, что агрегаты ЛПС активируют контактную систему через аналогичные механизмы, предполагающие присутствие ЛПС в плазме в агрегированном состоянии.

Химический состав ЛПС может иметь решающее влияние на степень активации свертывания за счет экранирования отрицательно заряженных частей молекулы полисахаридной цепью [18]. В самом деле, в то время как липид А, помещенный в раствор плазмы крови, вызывает сильный ответ контактной системы, цепи полисахарида не вызывают никакого эффекта [18]. Анализ доступных экспериментальных данных о структуре агрегатов, формируемых различными ЛПС, приведен в разделе 2.2 главы 1. В главе 4 мы подробно рассмотрим устройство ЛПС-содержащих систем при помощи молекулярных моделей.

Глава 4

МД моделирование структуры ЛПС, ЛПС-агрегатов и ЛПС-мембран

Основным объектом нашего исследования являлся ЛПС *S. typhimurium*, обладающий структурой, приведенной на рис. 4.1. На различных этапах работы нами были рассмотрены как R-мутанты форм Re- и Ra-, так и гладкие S-формы (рис. 4.1). Структура центрального олигосахарида и полисахарида О-антигена этой молекулы, были рассмотрены в раннем модельном исследовании [274]. Структура Re-LPS была получена в нашей лаборатории с помощью методов масс-спектрометрии (см. раздел 6.4). Так как О-антиген является наиболее объемной и вариабельной частью ЛПС, то, в первую очередь, нами было проведено детальное исследование его локальной и глобальной конформационной подвижности в растворе (раздел 1). Далее, нами была проведена валидация параметров модели для липидной части ЛПС (раздел 2) и корректировка отсутствующих в силовом поле параметров для фрагментов полярной головки липида А и центрального олигосахарида (раздел 3). Полученные параметры были использованы для создания моделей ЛПС-молекул (раздел 4), ЛПС-мицелл (раздел 5) и ЛПС-содержащих мембран (раздел 6).

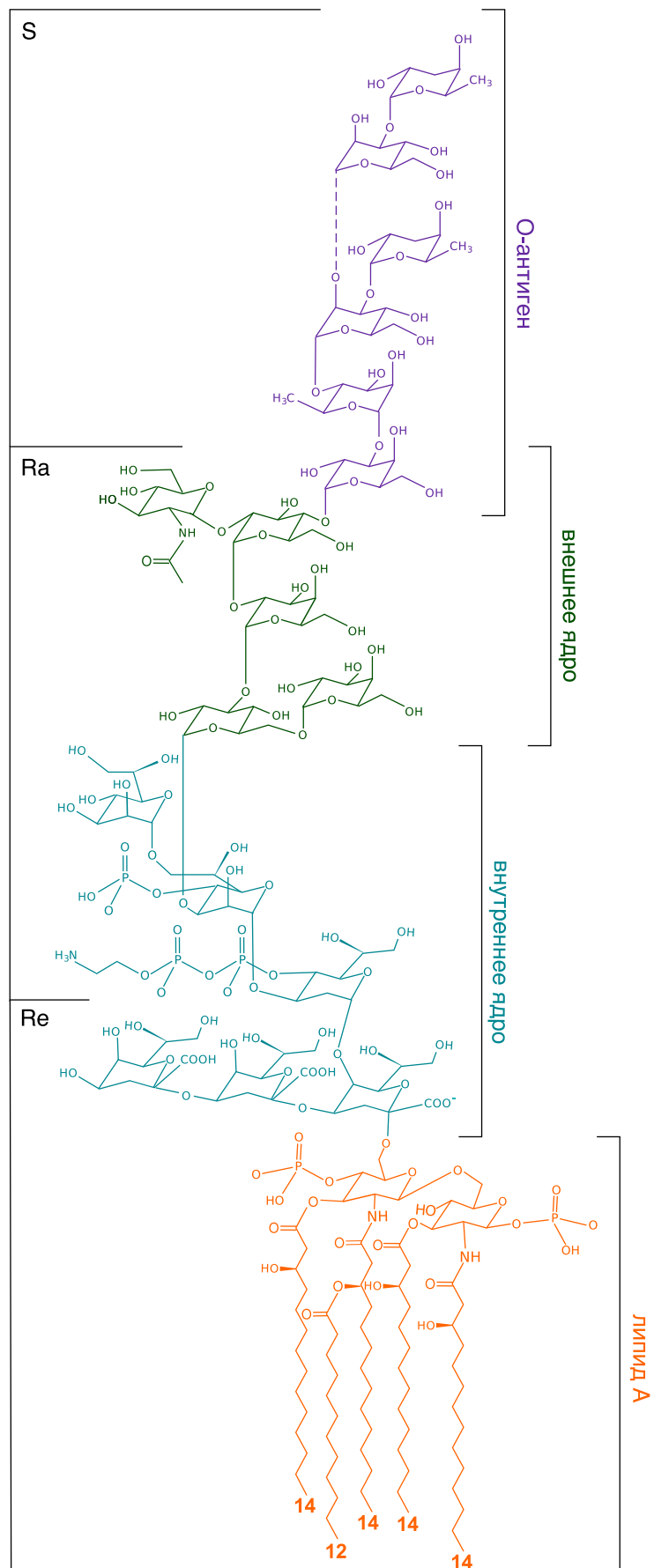


Рис. 4.1: Структура ЛПС *S. typhimurium*, используемая для модельных исследований.

1 Моделирование поведения свободного О-антигена в растворе

Пространственная структура длинной полисахаридной цепи определяется конформациями О-гликозидных связей между остатками, а также конформациями пиранозных колец (см. раздел 1.4.1 главы 2). Для лучшего понимания механизмов, лежащих в основе конформационной динамики длинной О-антигенной цепи, мы провели детальное исследование пар углеводных остатков, образующих основную цепь О-антигена: α -DGal-(1 $\rightarrow$ 2)- α -DMan, α -DMan-(1 $\rightarrow$ 4)- α -LRha и α -LRha-(1 $\rightarrow$ 3)- α -DGal, далее обозначаемых для простоты как Gal-Man, Man-Rha и Rha-Gal.

1.1 Конформационный анализ дисахаридных фрагментов

Каждый дисахаридный фрагмент был рассмотрен нами как отдельная молекула (рис. 4.2, верхний ряд), для которой нами были проведены расчеты распределения свободной энергии в вакууме (рис. 4.2) и в водном растворе (рис. 4.3), используя метод PMF (см. раздел 1.4.2 главы 2). В ходе МД расчетов для дисахаридных молекул наблюдались изменения конформаций пиранозных колец, а также повороты остатков вокруг углов (φ, ψ). В вакуумных расчетах помимо энергетически предпочтительных *син*-конформаций, также заселены *анти*-состояния и набор дополнительных состояний, определяемый индивидуальным строением соответствующих остатков. Добавление воды в рассматриваемую системы влияет на результирующие распределения свободной энергии за счет разрушения внутримолекулярных водородных связей и образования новых водородных связей с молекулами воды. Таким образом, молекулы дисахаридов в водном окружении существуют предпочтительно в конформациях, соответствующих бассейну минимальной энергии для молекул в вакууме. Нами была проведена подробная классификация и анализ энергетически выгодных конформаций дисахаридов на основании значений свободной энергии заселенных состояний. Количественные данные приведены в табл. 4.1.

Таблица 4.1: Относительные значения свободной энергии конформаций дисахаридов, полученные методом PMF в вакууме и водном растворе для силовых полей OPLS-AA и GLYCAM.

		OPLS-AA			GLYCAM		
		координаты	ΔG , кДж/моль		координаты	ΔG , кДж/моль	
			вакуум	вода		вакуум	вода
α -DGal-(1 $\rightarrow$ 2)- α -DMan							
<i>син</i>	<i>LL</i>	(−25, −22)	0.0	9.7 ± 0.4	(−29, −17)	0.0	0.0
	<i>RR</i>	—	—	—	(23, 25)	4.2 ± 0.2	10.7 ± 1.5
	<i>LR</i>	(−33, 40)	1.9 ± 0.1	0.0	(−29, 36)	4.9 ± 0.5	6.6 ± 1.3
<i>анти</i>	<i>A_ψ</i>	(−17, 173)	17.3 ± 0.6	—	(−28, 170)	15.7 ± 0.2	15.6 ± 0.6
	<i>A_φ</i>	(−175, −10)	26.9 ± 0.7	—	(−164, −10)	27.7 ± 0.7	—
доп.	<i>S₁</i>	(62, 72)	18.9 ± 0.3	—	—	19.8 ± 0.3	—
α -DMan-(1 $\rightarrow$ 4)- α -LRha							
<i>син</i>	<i>LR</i>	(−31, 45)	0.0	0.0	(−38, 4)	0.0	0.0
	<i>LL</i>	(−45, −10)	3.9 ± 0.1	2.2 ± 0.6	—	—	—
	<i>RR</i>	(34, 23)	8.0 ± 0.4	5.5 ± 0.3	(36, 25)	11.0 ± 0.2	7.1 ± 0.2
<i>анти</i>	<i>A_ψ</i>	(−12, −177)	18.7 ± 0.3	11.9 ± 0.6	(−29, −176)	7.2 ± 0.1	8.7 ± 0.4
	<i>A_φ</i>	(−177, 2)	15.5 ± 0.2	—	(−173, −3)	21.0 ± 0.4	—
доп.	<i>S₂</i>	(−54, 153)	14.6 ± 0.2	—	(−53, 156)	7.7 ± 0.1	8.7 ± 1.4
	<i>S₃</i>	—	—	—	(50, −150)	24.7 ± 0.6	—
	<i>S₄</i>	(−138, 46)	24.7 ± 0.6	—	—	—	—
	<i>S₅</i>	(55, 60)	11.7 ± 0.3	—	(61, 52)	14.2 ± 0.2	—
α -LRha-(1 $\rightarrow$ 3)- α -DGal							
<i>син</i>	<i>RR</i>	(46, 29)	0.0	0.0	(48, 17)	0.0	0.0
	<i>RL</i>	(38, −40)	6.6 ± 0.4	3.9 ± 0.7	—	—	—
	<i>LL</i>	(−25, −28)	11.9 ± 0.6	9.8 ± 0.6	(−35, −15)	16.8 ± 0.2	12.9 ± 0.5
<i>анти</i>	<i>A_ψ</i>	(32, 161)	16.0 ± 0.2	—	(33, 163)	15.7 ± 0.1	18.1 ± 0.6
	<i>A_φ</i>	(170, 12)	20.4 ± 0.3	—	(172, 11)	25.2 ± 0.4	15.6 ± 0.9
доп.	<i>S₆</i>	(−170, 63)	24.0 ± 0.5	—	(−167, 55)	29.9 ± 0.8	—

1.1.1 Конформации О-гликозидных связей

Для обоих полей OPLS-AA и GLYCAM функции распределения микросостояний в фазовом пространстве (φ, ψ) очень похожи (рис. 4.2). Нами было выявлено несколько типов энергетически выгодных конформаций, обычно наблюдаемых в дисахаридах [28–30, 224].

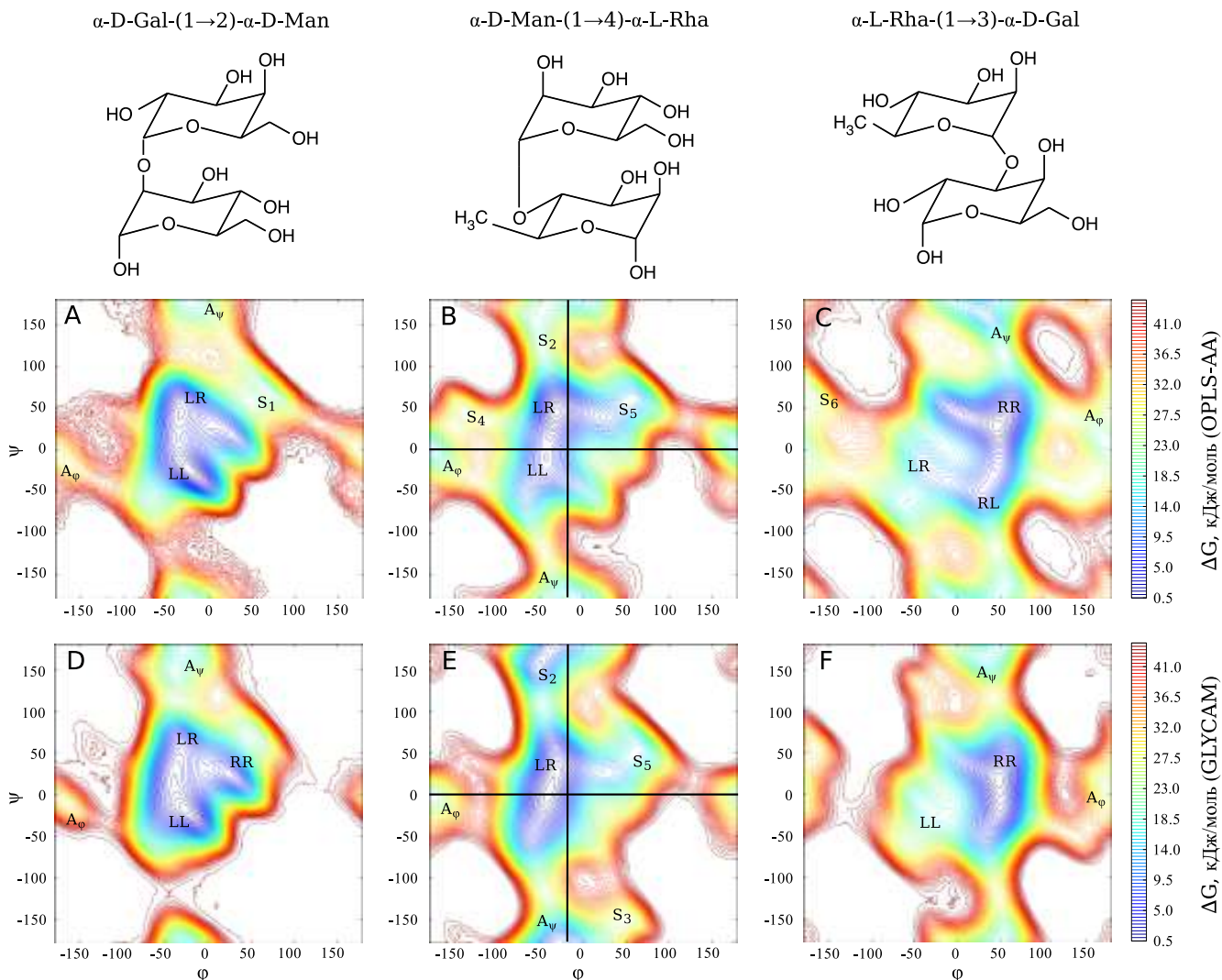


Рис. 4.2: Распределения свободной энергии, рассчитанные методом PMF, в координатах двугранных углов (φ, ψ) для дисахаридов Gal-Man, Man-Rha и Rha-Gal в вакууме при температуре 500 К. Расчеты проводились в силовых полях OPLS-AA (верхний ряд) и GLYCAM (нижний ряд). Буквами отмечены локальные энергетические минимумы (рис. 4.4). На рисунках (B,E) черными линиями отмечены одномерные срезы распределения энергии, для которых проводилось сравнение с *ab initio* расчетами (рис. 4.5).

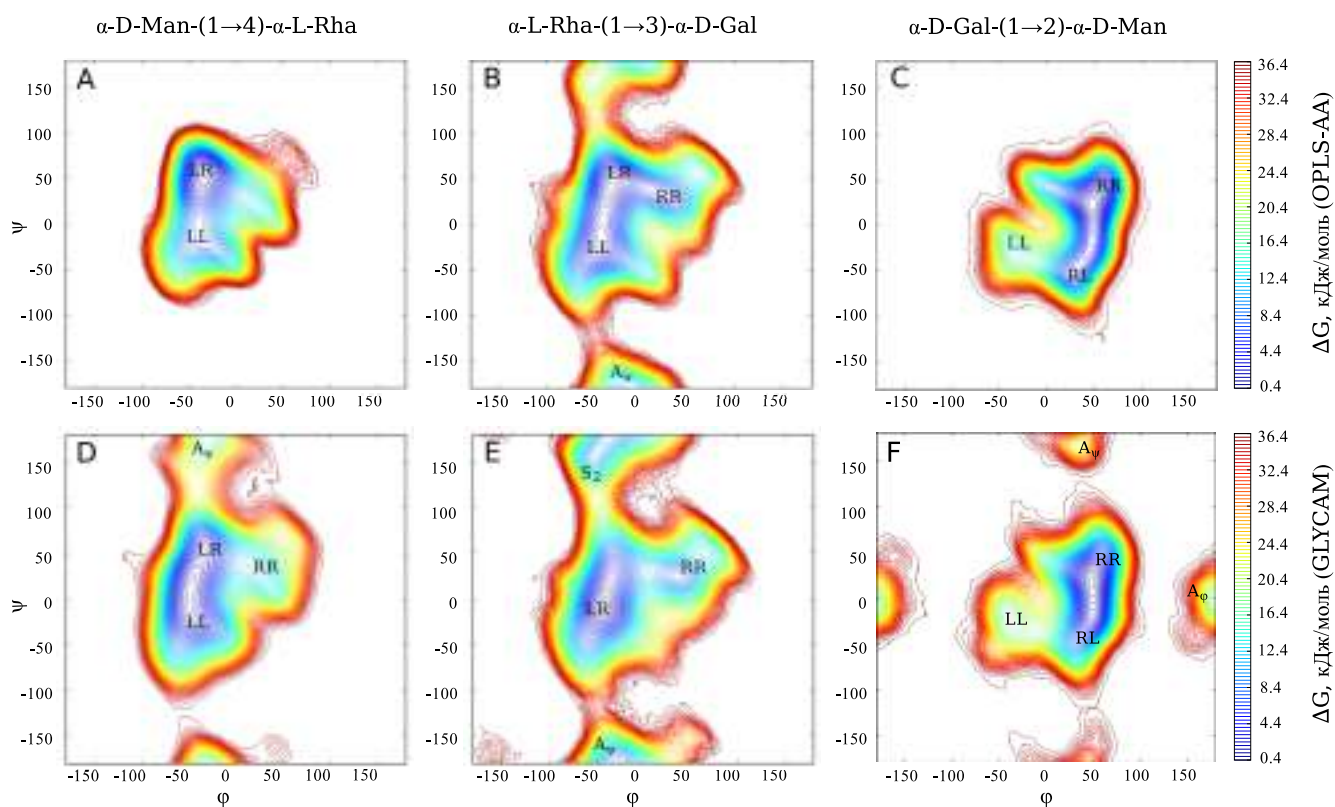


Рис. 4.3: Распределения свободной энергии, рассчитанные методом PMF, в координатах двугранных углов (φ, ψ) для дисахаридов Gal-Man, Man-Rha и Rha-Gal в водном растворе при температуре 300 К. Расчеты проводились в силовых полях OPLS-AA (верхний ряд) и GLYCAM (нижний ряд). Буквами отмечены локальные энергетические минимумы (рис. 4.4).

1.1.1.1 Син-конформации. Как и в предыдущих модельных и экспериментальных исследованиях, глобальные минимумы свободной энергии для всех дисахаридов соответствуют стерически выгодным *син*-конформациям углов (φ, ψ) [28, 29]. В этих состояниях пиранозные кольца максимально удалены друг от друга (рис. 4.4 A). В зависимости от знаков значений двугранных углов мы обозначаем *син*-конформации внутри бассейна глобального минимума энергии как *LL*, *LR*, *RL* и *RR*, в соответствии с типом образуемой спирали (левой L или правой R).

Наиболее заселенной конформацией для Gal-Man является состояние *LL*. Оно окружено двумя другими стерически выгодными конформациями: *RR*, заселенным в поле GLYCAM (рис. 4.2 D), и *LR*, заселенным в поле OPLS-AA, и становящимся предпочтительным в присутствии воды (рис. 4.2 A). Переход между *RR* и *LR* состояниями является часто встречающимся событием, так как абсолютные значения свободной энергии этих состояний очень

близки (табл. 4.1). Глобальный энергетический минимум Man-Rha в моделях в обоих полях можно интерпретировать как конформацию LR (рис. 4.2 C,E). LL состояние также довольно сильно заселено в расчетах, проведенных в водном окружении, и становится предпочтительным для Man-Rha в поле GLYCAM. Состояние RR возникает в качестве отдельного энергетического минимума в водных расчетах в поле GLYCAM, но имеет довольно высокую энергию. Глобальный минимум свободной энергии для Rha-Gal (рис. 4.2 C,F) соответствует конформации RR , в то время как состояние LL заселено слабо.

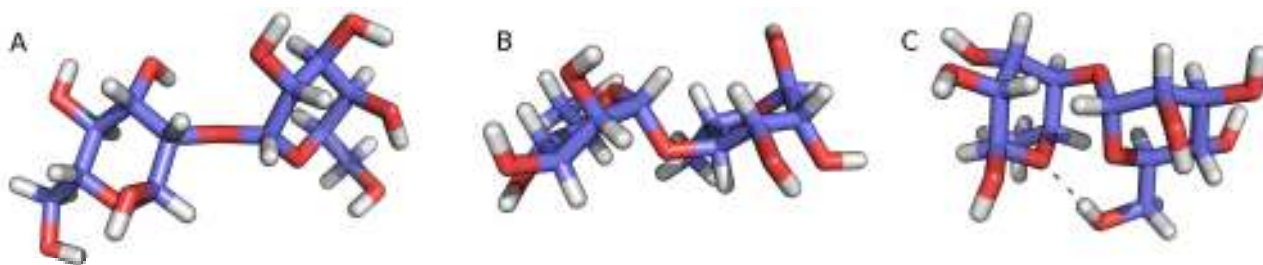


Рис. 4.4: Примеры характерных конформаций дисахаридов для состояний, соответствующих глобальному минимуму энергии (A; Gal-Man, RR), *анти*-конформации (B; Man-Rha, A_ψ) и дополнительной локально выгодной конформации, стабилизируемой образованием водородной связи (C; Man-Rha, S_2).

1.1.1.2 Анти-конформации. Помимо конформаций, находящихся в бассейне глобального энергетического минимума, в расчетах были также наблюдаются несколько других значительно заселенных состояний. В первую очередь, для каждого дисахарида существуют два энергетических минимума для значений углов φ или ψ в *анти*-конформации (т. е. равных около 180°), что соответствует “развернутой” конформации (рис. 4.4 B), в которой пиранозные кольца контактируют друг с другом за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий. *Анти*-конформации часто встречаются в дисахаридах различной природы [28, 223, 224, 256]. Далее мы будем обозначать их как A_φ и A_ψ . A_φ состояние в Gal-Man и A_φ , A_ψ состояния в Rha-Gal (рис. 4.2 A,D,C,F) дополнительно стабилизируются образованием водородной связи между атомами O6 галактозы и O3 маннозы, и атомами O6 рамнозы и O2 галактозы, соответственно (рис. 4.4). Образование водородных связей в *анти*-состояниях ранее наблюдалось для некоторых других дисахаридов [28]. Для всех рассмотренных моделей состояния A_ψ более заселены, чем конформации A_φ . Заметим, что энергетические барьеры между состояниями, как правило, выше в моделях GLYCAM: например, в Rha-Gal барьер перехода

$RR \rightarrow A_\psi$ в модели OPLS-AA равен 20.8 ± 0.3 кДж/моль, тогда как в модели GLYCAM его величина составляет 29.2 ± 0.6 кДж/моль, а барьер $RR \rightarrow A_\varphi$ для Rha-Gal составляет 27.4 ± 0.6 и 34.2 ± 1.2 кДж/моль в OPLS-AA и GLYCAM, соответственно.

Наиболее заметное различие между моделями дисахаридов в поле GLYCAM и OPLS-AA касается заселенности состояния A_ψ в расчетах для Man-Rha, которое намного больше заселено в силовом поле GLYCAM (рис. 4.2В,Е). В самом деле, значение свободной энергии конформации A_ψ в поле GLYCAM примерно на 4 кТ ниже, чем в поле OPLS-AA (табл. 4.1). Кроме того, хотя энергетические барьеры перехода из глобального минимума в состояние A_ψ близки в обеих моделях (20.8 ± 0.1 и 17.7 ± 0.2 кДж/моль в OPLS-AA и GLYCAM, соответственно), барьер обратного перехода намного ниже в поле OPLS-AA (~ 2.1 кДж/моль, в то время как в поле GLYCAM он составляет ~ 10.5 кДж/моль). Как мы покажем в разделе 1.2.2, эта разница существенно влияет на конформационное поведение длинной О-антигенной цепочки, так как связь между остатками маннозы и рамнозы имеет тенденцию необратимо переходить в состояние A_ψ при моделировании длинной цепи.

Для проверки полученных результатов мы провели расчет профиля потенциальной энергии Man-Rha при фиксированном значении $\varphi = -20^\circ$, и затем при фиксированном значении $\psi = 0$ в обоих силовых полях (рис. 4.2В,Е; черные линии) и сравнили их с результатами вычислений *ab initio* (протокол такого расчета подробно описан в разделе 1.2 главы 2). Хотя в обоих силовых полях энергетические профили для фиксированного угла ψ очень похожи на результирующую *ab initio* энергию (рис. 4.5 А), мы наблюдаем существенное различие для профилей энергии, полученных при фиксированном значении угла φ (рис. 4.5 В). В самом деле, локальный минимум энергии, соответствующий состоянию A_ψ , ярко выражен для результатов МД расчетов, в то время как он практически отсутствует в профиле *ab initio* энергии. Более того, уровень энергии состояния A_ψ в модели Man-Rha в поле GLYCAM в два раза ниже, чем в поле OPLS-AA. Заниженное значение энергии A_ψ -состояния в поле GLYCAM (рис. 4.2 Е) приводит к наблюдаемой повышенной заселенности соответствующей конформации, что, скорее всего, является артефактом.

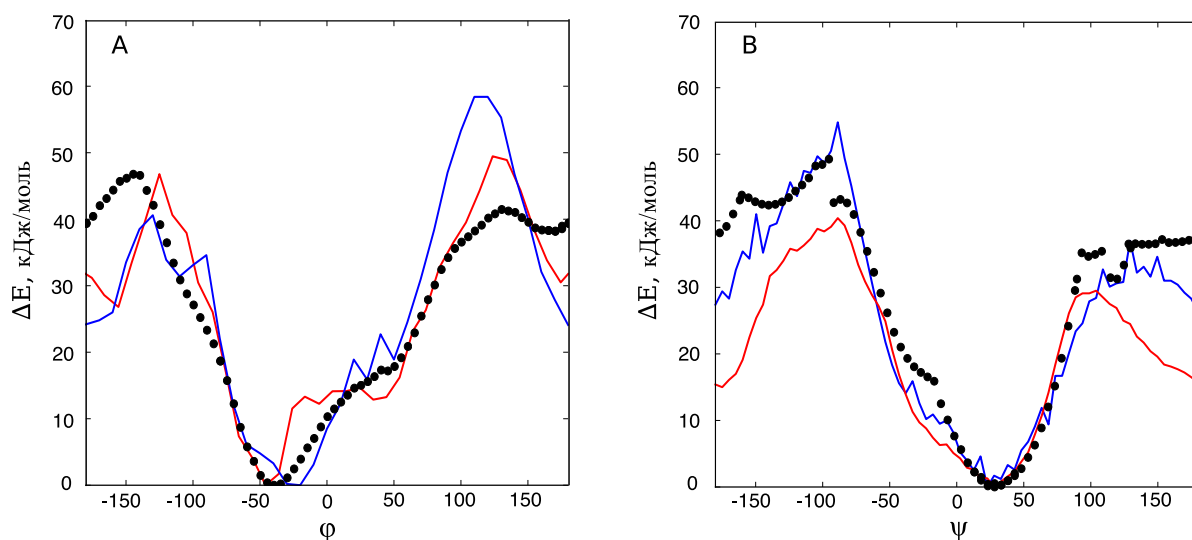


Рис. 4.5: Профили потенциальной энергии для связи Man-Rha, полученные в *ab initio* вычислениях (черные точки) и в расчетах МД в силовых полях OPLS-AA (синяя линия) и GLYCAM (красная линия) (рис. 4.1 В,Е). А. $\psi = 0$ В. $\varphi = -20^\circ$.

1.1.1.3 Дополнительные энергетические минимумы. В зависимости от состава заместителей, дисахариды могут существовать в некоторых стерически выгодных конформациях, которые не могут быть однозначно классифицированы как *син*- или *анти*-состояния. Такие конформации мы обозначили как дополнительные (supplementary, S_n), и значения свободной энергии для этих состояний приведены в табл. 4.1. В Gal-Man конформация S_1 (рис. 4.2 А,Д) стабилизируется электростатическим взаимодействием между атомом О2 галактозы и положительно заряженными атомами маннозы С2 и НС2. В Man-Rha можно выделить два дополнительных минимума энергии вокруг состояния A_ψ , характеризующиеся слабым взаимодействием между атомами кислорода маннозы и рамнозы: О5-О6 в состоянии S_2 (рис. 4.2 В,Е), и О2-О6 в состоянии S_3 , заселенном в поле GLYCAM (рис. 4.2 Е). В поле OPLS-AA в Man-Rha в дополнение к A_φ существует локально выгодное состояние S_4 (рис. 4.2 В), стабилизированное взаимодействием атома маннозы О4 и атома рамнозы О3. Эта конформация соответствует области пониженной энергии в поле GLYCAM (рис. 4.2 Е). Четко выраженная область с низкой свободной энергией, которую мы обозначили как S_5 , соответствует состоянию RR , сдвинутому из-за симметричной ориентации заместителей в Man-Rha (рис. 4.2 В,Е). Состояние S_6 в Rha-Gal стабилизируется взаимодействием атомов рамнозы О6 и галактозы О2 (рис. 4.2 С,Ф). Из всех дополнительных конформаций единственное относительно заселенное состояние — это состояние S_2 в Man-Rha (рис. 4.4 С), в то время как другие дополнительные состояния имеют очень высокие значения свободной

энергии и заселены сравнительно мало (табл. 4.1).

1.1.2 Конформации пиранозных колец

В дисахаридах конформации углеводного кольца существенно влияют на взаимную ориентацию остатков. Тем не менее, согласно анализу распределения свободной энергии, основные состояния углеводных колец в дисахаридах в состояниях *син*- и A_ψ такие же, как в мономерах, тогда как для нескольких состояний A_φ более предпочтительны конформации “твист” (табл. 4.2, например, в остатке маннозы в составе Man-Rha A_φ). Переход от основного состояния к альтернативному креслу или к конформации твист более вероятен в моделях GLYCAM (табл. 4.2). Этот эффект особенно выражен в случае галактозного остатка в состоянии, соответствующем глобальному энергетическому минимуму для О-гликозидной связи Rha-Gal. Разница в значениях энергии между конформациями формами 4C_1 - 1C_4 и 4C_1 -твист составляют ~ 15.5 и 9.5 кДж/моль, соответственно, в поле GLYCAM по сравнению с ~ 39.0 и 25.3 кДж/моль в поле OPLS-AA (табл. 4.2).

Как известно, два альтернативных кресла для рассматриваемых пиранозных колец имеют различную свободную энергию, обусловленную экваториальной или аксиальной ориентацией объемных боковых заместителей [227] (см. раздел 2.3 главы 1). Таким образом, конформация кольца α -L-рамнозы 1C_4 относится к основному состоянию, так как гидроксилы при C1 и C2 углеродах ориентированы в аксиальном направлении, тогда как C3 и C4 гидроксилы и метильная группа имеют экваториальную ориентацию. По той же причине, предпочтительной конформацией α -D-маннозы и α -D-галактозы является 4C_1 . Так как в остатке рамнозы гидроксил C5 восстановлен до метильной группы, разница энергий между конформациями 1C_4 и 4C_1 для рамнозы должна быть меньше, чем для молекул маннозы и галактозы, где экваториальная ориентация C5 является принципиальной в силу большого размера заместителя. Эта гипотеза подтверждается при анализе распределения свободной энергии для рассмотренных дисахаридов (табл. 4.2). В самом деле, разница в значениях свободной энергии между конформациями альтернативных кресел маннозы и галактозы составляет 29.6 ± 6.0 кДж/моль, что существенно больше, чем для разницы энергий для остатка рамнозы (6.8 ± 2.4 кДж/моль).

Таблица 4.2: Относительные свободные PMF-энергии для различных конформаций пиранозных колец в моделях дисахаридов OPLS-AA и GLYCAM согласно результатам вакуумных расчетов (кДж/моль). Для каждого заселенного состояния (GB , A_ψ , A_φ ; рис. 4.2) энергетически выгодная конформация кольца каждого остатка рассматривается как основное состояние с нулевой энергией. Свободные энергии альтернативных конформаций рассчитываются относительно этих основных состояний в каждом заселенном состоянии.

		α -DGal-(1 $\rightarrow$ 2)- α -DMan			α -DMan-(1 $\rightarrow$ 4)- α -LRha			α -LRha-(1 $\rightarrow$ 3)- α -DGal		
		GB	A_ψ	A_φ	GB	A_ψ	A_φ	GB	A_ψ	A_φ
OPLS-AA										
Gal	1C_4	37.6 ± 8.3	26.7 ± 7.3	18.5 ± 5.8	—	—	—	39.0 ± 7.9	46.1 ± 3.5	23.9 ± 7.3
	4C_1	0.0	0.0	0.0	—	—	—	0.0	0.0	0.0
	твист	22.1 ± 2.1	11.5 ± 3.7	5.1 ± 1.7	—	—	—	25.3 ± 0.8	29.3 ± 5.5	13.9 ± 3.7
Man	1C_4	45.7 ± 10.3	32.7 ± 7.0	26.8 ± 5.4	13.6 ± 1.6	9.5 ± 1.7	2.1 ± 3.0	—	—	—
	4C_1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.0 ± 1.5	—	—	—
	твист	24.5 ± 2.6	24.2 ± 6.4	15.1 ± 3.9	12.6 ± 1.5	7.2 ± 0.4	0.0	—	—	—
Rha	1C_4	—	—	—	0.0	0.0	0.5 ± 1.0	0.0	0.0	2.4 ± 1.3
	4C_1	—	—	—	2.6 ± 0.2	5.2 ± 0.6	4.6 ± 1.2	7.5 ± 1.6	45.7 ± 4.9	10.2 ± 3.4
	твист	—	—	—	2.6 ± 0.1	5.0 ± 0.1	0.0	14.5 ± 0.2	11.8 ± 1.2	0.0
GLYCAM										
Gal	1C_4	61.0 ± 7.8	49.8 ± 4.8	34.9 ± 2.5	—	—	—	15.5 ± 0.8	22.3 ± 0.8	7.3 ± 3.2
	4C_1	0.0	0.0	4.5 ± 2.3	—	—	—	0.0	0.0	0.0
	твист	17.2 ± 0.1	7.5 ± 0.6	0.0	—	—	—	9.5 ± 0.3	7.2 ± 0.8	5.2 ± 3.9
Man	1C_4	16.6 ± 0.8	9.6 ± 5.6	22.3 ± 6.9	12.4 ± 0.2	12.3 ± 1.0	4.7 ± 2.0	—	—	—
	4C_1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.5 ± 1.3	—	—	—
	твист	8.8 ± 0.1	10.6 ± 0.9	18.8 ± 3.2	10.6 ± 0.1	10.1 ± 0.3	0.0	—	—	—
Rha	1C_4	—	—	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.2 ± 1.5
	4C_1	—	—	—	8.3 ± 0.3	12.8 ± 0.6	9.2 ± 1.5	8.7 ± 0.2	12.6 ± 2.7	0.0
	твист	—	—	—	9.4 ± 0.1	12.3 ± 0.3	10.8 ± 1.4	10.5 ± 0.3	9.7 ± 1.1	5.3 ± 1.2

1.1.3 Основные выводы о локальной подвижности дисахаридных фрагментов

Наиболее существенная разница в конформационном поведении, наблюдаемая в расчетах дисахаридов с использованием силовых полей OPLS-AA и GLYCAM, проявляется в засе-

ленности состояний A_ψ для Man-Rha. Мы показали, что полученный профиль энергии в поле OPLS-AA ближе к результатам расчетов *ab initio*, чем аналогичный профиль энергии в модели GLYCAM. Следовательно, низкие значения энергии в состоянии A_ψ с высоким энергетическим барьером перехода $A_\psi \rightarrow LR$ в силовом поле GLYCAM, скорее всего, является артефактом параметризации, который, как будет показано в разделе 1.2.2, приводит к нереалистичным результатам при моделировании длинной полисахаридной цепи. Аналогичный эффект наблюдался при сравнении расчетов в силовых полях GLYCAM и CHARMM при моделировании конформационной подвижности дисахаридов, выделенных из *Streptococcus pneumoniae* [28] и богатого рамнозой О-антигена *Sh. flexneri* [30]. По сравнению с моделями в поле CHARMM, модели в поле GLYCAM имеют более широкие бассейны глобального минимума энергии и более глубокие вторичные минимумы.

Еще один интересный результат касается конформационной подвижности остатка рамнозы, выворачивание кольца которого происходит гораздо чаще по сравнению с кольцами маннозы и галактозы. Поскольку альтернативные конформации кресла часто встречаются в состояниях A_ψ , энтропия *анти*-конформаций должна быть больше для фрагментов, содержащих рамнозу. Эта гипотеза далее была проверена при расчетах динамики длинной О-антигенной цепи в разделе 1.2.2.

1.2 Конформационная подвижности длинной цепи О-антигена

Как было показано в предыдущих модельных расчетах [30, 31], данные о конформационной подвижности коротких фрагментов не достаточны для выводов о глобальной подвижности длинной полисахаридной цепи. Взаимодействие дистальных частей О-антигена может приводить к формированию дополнительных стабильных структур, появление которых невозможно предсказать через анализ результатов, полученных для дисахаридов. Данный раздел посвящен описанию результатов моделирования О-антигенной цепи длиной 12 повторяющихся звеньев в растворе и сравнительному анализу поведения моделей О-антигенов в силовых полях GLYCAM и OPLS-AA.

1.2.1 Стартовая конформация О-антигена

Выбор правильной исходной конформации О-антигена имеет решающее значение для результатов МД расчетов. Высокая подвижность и большое количество степеней свободы делают пространство конформаций О-антигенной цепи очень сложным. Поэтому некорректный выбор начальных координат атомов может привести молекулу в область конформационного

объема, отделенную от нативного состояния высоким энтропийным барьером.

В работе [25] авторы использовали площадь проекции О-антигена на плоскость мембраны как единственный критерий выбора исходной конформации для расчетов модельных мембран. Произвольные вытянутые конформации были также выбраны в качестве стартовых структур для молекулярной модели одиночного ЛПС в работе [274] и при моделировании динамики свободного О-антигена в работе [30]. Мы используем альтернативный подход, который ранее продемонстрировал хорошее соответствие экспериментальным данным (ЯМР) для молекул пентасахаридов [29]. В качестве начального состояния мы выбрали энергетически выгодную конформацию цепи, ориентируясь на результаты оценки значений свободной энергии, полученные в расчетах для дисахаридов. Конформации пиранозных колец были выставлены в энергетически выгодные конформации: 4C_1 для маннозы и галактозы и 1C_4 для рамнозы, являющиеся основными состояниями соответствующих мономеров в составе дисахаридов (табл. 4.2). Все углы (φ, ψ) также были выставлены в соответствие со значениями соответствующих минимумов свободной энергии для дисахаридов (рис. 4.2, табл. 4.1). Мы также фиксировали значения двугранных углов, определяющих ориентацию бокового остатка абеквоты.

В первом приближении полученная структура близка к сильно вытянутой спирали 3_1 с диаметром $12.5 \text{ \AA}$, измеренной с учетом боковых углеводных остатков, и шагом $30 \text{ \AA}$ (рис. 4.6). Более точно эта структура может быть описана как спираль типа 18_7 из-за сдвига угла между первым и четвертым звеном О-антигена на 60° за один оборот спирали (рис. 4.6 В). Полученные параметры спиральной структуры близки к тем, которые были ранее измерены для пентасахаридного О-антигена *Sh. flexneri* (спираль с диаметром $15 \text{ \AA}$ и шагом $19.4 \text{ \AA}$ [29]).



Рис. 4.6: Энергически выгодная спиральная структура О-антигена (спираль 18_7): вид сбоку (А) и с начала цепи (В). Повторяющиеся звенья окрашены с начала цепочки, цифры указывают их порядок на обоих рисунках. Стрелки показывают направление поворота от первого до четвертого звена.

Принимая во внимание стереоселективность работы ферментов, мы предполагаем, что отдельные олигосахаридные фрагменты непосредственно после их синтеза имеют спиральную структуру. Действительно, если ферменты добавляют каждую новую единицу стереоспецифичным образом, значения двугранных углов и конформации колец будут одинаковыми вдоль цепи, что приведет к образованию спиральной структуры, позже разрушенной за счет теплового движения. Таким образом, используя спираль в качестве стартовой структуры О-антигена для расчетов МД, мы потенциально имеем возможность правильно воспроизвести пути эволюции его конформации. Основываясь на аналогичных рассуждениях, спиральная структура цепи О-антигена была предложена в более ранней работе [274]. Однако метод Монте-Карло, примененный к жесткой и незаряженной молекулярной модели, не позволил авторам обнаружить спиральные структуры в их исследовании [274]. Кроме того, спиральные мотивы были обнаружены экспериментально для небольшого фрагмента О-антигена (α -DGal-(1 $\rightarrow$ 2)- α -DMan-(3 $\rightarrow$ 1)-Abe) [29].

1.2.2 МД расчет О-антигена в растворе

Используя в качестве стартовой полученную энергетически выгодную спиральную конформацию (рис. 4.6), мы выполнили ряд МД расчетов для О-антигена в растворе с использованием силовых полей OPLS-AA и GLYCAM. Мы провели три независимых расчета в каждой модели при комнатной (300 K) и повышенной температуре (500 K). Разрушение первоначально вытянутой спиральной структуры приводит к появлению новых стабильных или квазистабильных компактных состояний, которые мы классифицируем как:

- конформации типа клубок, в которых цепь изогнута, части ее взаимодействуют мало, а цепочка в целом не имеет сколько-нибудь постоянной укладки (рис. 4.7 C);
- конформации типа глобула, в которых углеводная цепь формирует шпильки за счет взаимодействия удаленных частей цепи с образованием водородных связей и ван-дер-ваальсовых контактов (рис. 4.7 D–F).

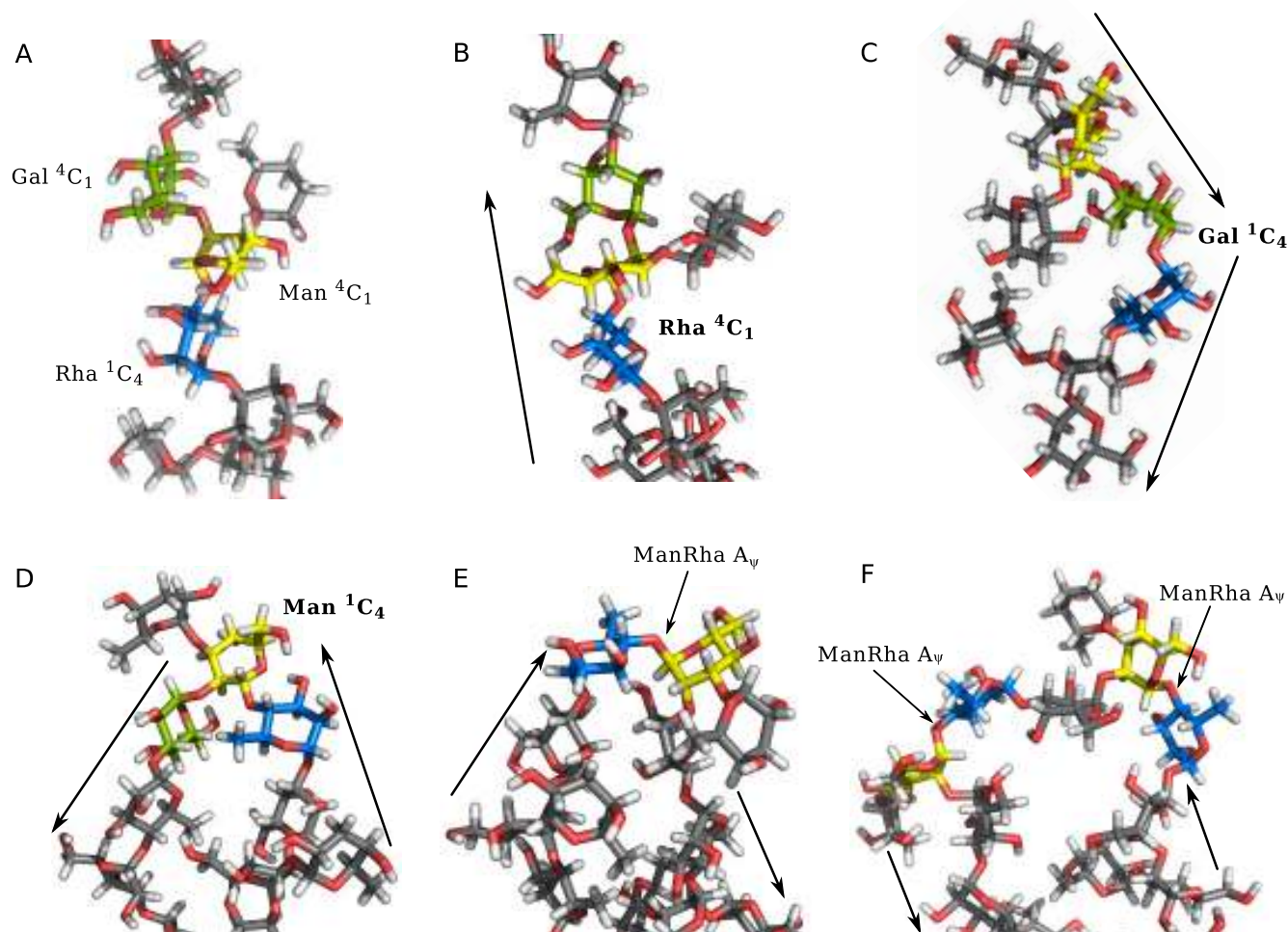


Рис. 4.7: Влияние локальных конформационных переходов на общую структуру цепи О-антигена. А. Начальная невозмущенная спиральная структура с кольцами галактозы и маннозы в конформации 4C_1 и рамнозы в 1C_4 . В. Переход кольца рамнозы в 4C_1 без влияния на конформацию цепи. С. Изгиб спирали из-за перехода галактозного кольца в 1C_4 . D. Шпилька, образованная при переходе маннозного кольца в 1C_4 . E. Шпилька, образованная последовательными переходами *GalMan* — в состояние *LL* и *ManRha* — в состояние A_ψ (шпилька *LL*- A_ψ). F. Шпилька, образованная двумя последовательными переходами связей *ManRha* в состояние A_ψ (шпилька A_ψ - A_ψ). Остатки галактозы, маннозы и рамнозы окрашены в зеленый, желтый и синий цвета, соответственно. Нетронутая часть цепи окрашена в серый цвет. Стрелки показывают направление цепи от первого до последнего повторяющегося звена.

Изменения глобальной конформации О-антигена происходят из-за двух основных типов событий: переходов конформаций колец и/или поворотов углеводных остатков вокруг О-гликозидных связей. Изменение конформации (“выворачивание”) пиранозных колец в расчетах О-антигенной цепи встречаются гораздо реже, чем в молекулах дисахаридов. Наиболее

распространенными событиями этого типа, наблюдаемыми в расчетах, являются переходы ${}^1C_4 \leftrightarrow {}^4C_1$ в остатках рамнозы. Поскольку углы между гликозидными связями рамнозы не зависят от конформации ее пиранозного кольца, эти изменения не влияют на общую структуру О-антигена (рис. 4.7 А,В). Переход в 1C_4 галактозных и маннозных колец, наоборот, приводит к существенной реорганизации всей цепи и, следовательно, происходит значительно реже. Действительно, переход галактозы в 1C_4 приводит к изгибу цепи примерно на 50° (рис. 4.7 С), в то время как переход маннозного кольца приводит к развороту одного из концов цепи в обратную сторону (рис. 4.6 D).

Чтобы упростить описание наблюдаемых вращений остатков вокруг О-гликозидных связей, далее мы будем обозначать соединение между остатками галактозы и маннозы как *GalMan*, соединения между маннозой и рамнозой как *ManRha* и соединения между рамнозой и галактозой как *RhaGal*. Так как гликозидные связи маннозного остатка параллельны друг другу (оба заместителя экваториальны в 4C_1), то вращение вокруг угла φ в *ManRha* и вокруг угла ψ в *GalMan* не вызывают изгиба цепи О-антигена. В то же время, переходы в бассейне глобальных минимумов связей *ManRha* и *RhaGal* приводят изгибанию цепи: $\sim 45^\circ$ при переходе *ManRha* в *LL*, $\sim 30^\circ$ и $\sim 60^\circ$ при переходе *RhaGal* в *RL* и *LL*, соответственно. Наиболее значительная реорганизация цепочки происходит в случае перехода *ManRha* в состояние A_ψ , что приводит к изгибу цепочки приблизительно на 90° , и может привести к образованию шпильки (рис. 4.7 Е, F).

Компактизация цепи вследствие образования шпилек является самым важным кооперативным событием, наблюдаемым в наших расчетах для цепей О-антигена. В обоих силовых полях все обнаруженные шпильки появились при переходе в состояние A_ψ одной или двух последовательных связей *ManRha* (рис. 4.7 Е, F) или выворачивания маннозного кольца ${}^4C_1 \rightarrow {}^1C_4$ (рис. 4.7 D). В случае одного перехода в связи *ManRha* соседняя связь *GalMan* обычно занимает положение *LL* (рис. 4.7 Е). Формирование метастабильных шпилек *LL-A_ψ* было ранее получено в расчетах для О-антигена *Sh. flexneri* [30]. Если две последовательные связи *ManRha* переходят в состояние A_ψ , то каждый из переходов изгибает цепочку на 90° , что приводит к складыванию цепи и формированию шпильки, независимо от конформаций связей *RhaGal* и *GalMan* (рис. 4.6 F).

Помимо распрямленных конформаций и одиночных шпилек, О-антигены могут также принимать более сложные конформации, такие как компактные глобулы (рис. 4.8), образующиеся в результате формирования нескольких шпилек в одной цепочке. Глобула О-антигена намного более стабильна, чем одиночные шпильки, благодаря взаимодействиям между удаленными частями цепи. Сложенная несколько раз, цепочка О-антигена в состоянии глобулы

имеет топологию, похожую на антипараллельный β -лист в белке. Поэтому мы далее будем называть конформации такого типа антипараллельными шпильками.

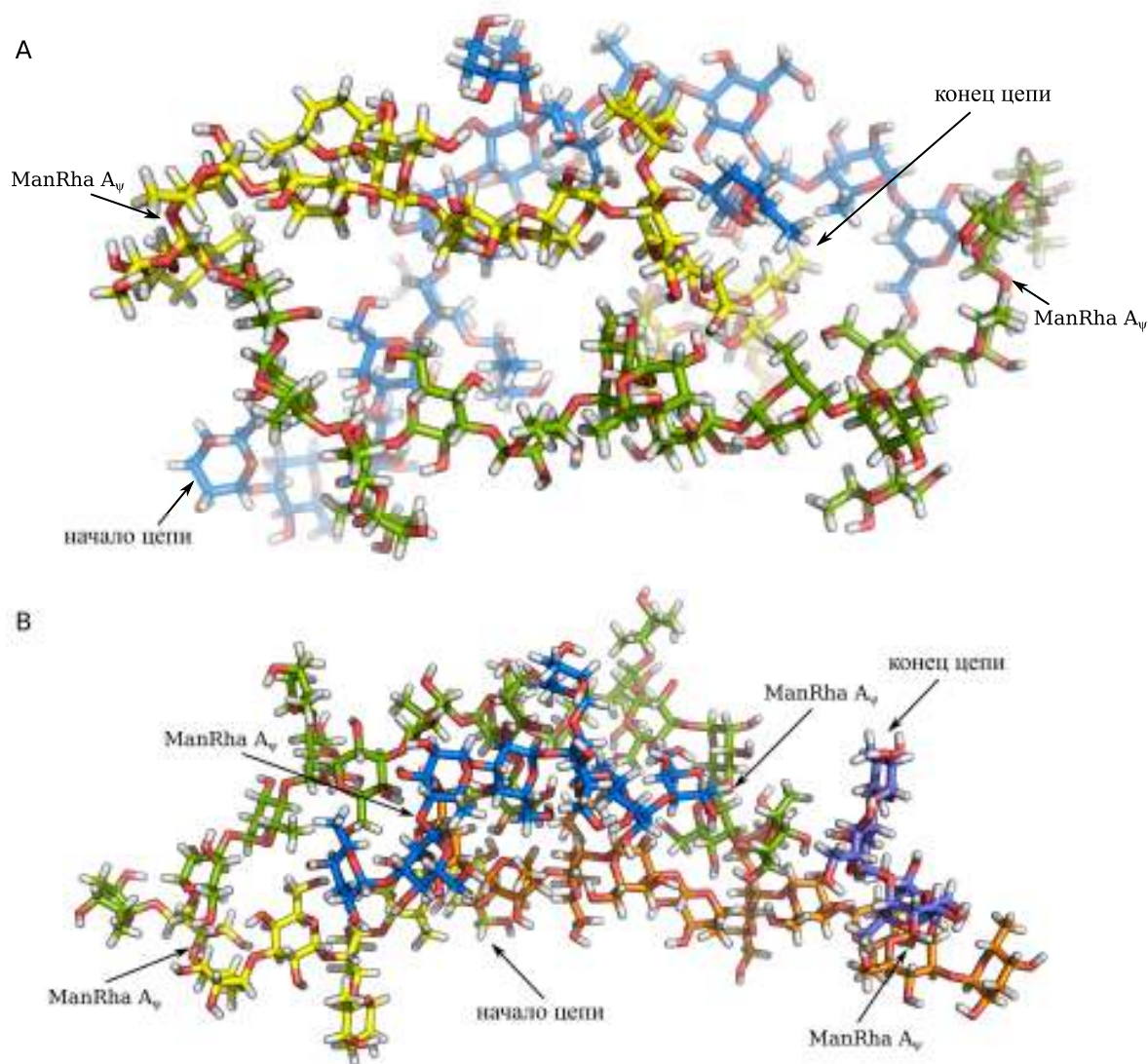


Рис. 4.8: Структура глобул О-антигена в силовых полях OPLS-AA (А, трехкратная антипараллельная шпилька) и GLYCAM (В, пятикратная антипараллельная шпилька). Атомы углерода повторяющихся звеньев внутри фрагментов цепи, образующих шпильки, окрашены в следующем порядке: желтый, зеленый, синий, оранжевый, фиолетовый. Стрелками показаны начало и конец цепи, а также связи *ManRha*, перешедшие в состояние A_ψ .

1.2.3 Расчеты при комнатной температуре

В первую очередь, нами были проведены расчеты для молекул О-антигена в водном растворе при температуре 300 К. Поведение цепочек оказалось существенно различным в разных

силовых полях: в поле OPLS-AA О-антиген претерпевал конформационные изменения, но сохранял структуру клубка на протяжении всех расчетов, тогда как в силовом поле GLYCAM, спустя небольшое время (~ 100 нс), цепь подвергалась структурным деформациям, ведущим к ее существенной компактизации и формированию стабильной глобулы (рис. 4.9).

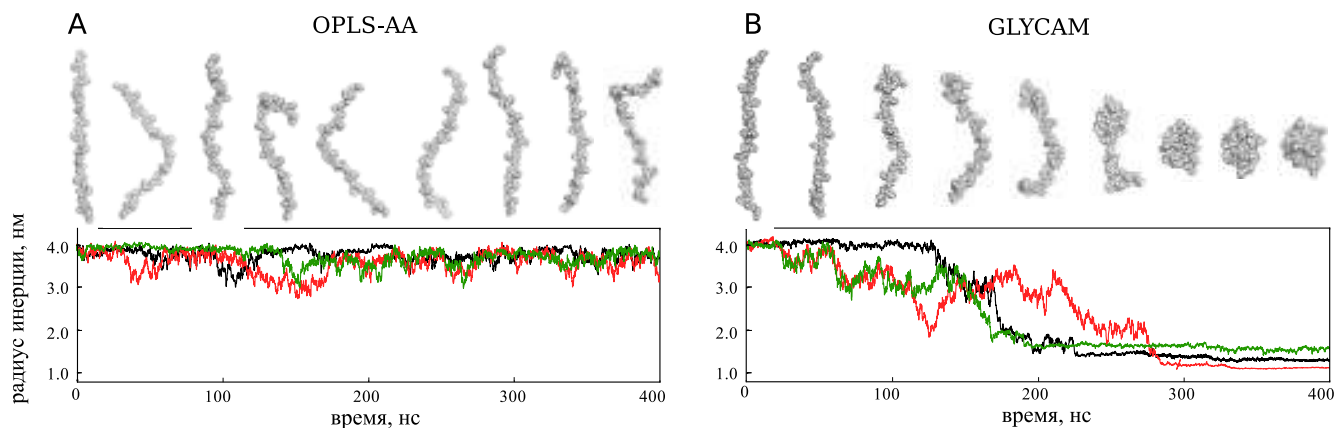


Рис. 4.9: Радиус инерции цепи О-антигена в 400 нс расчетах в силовых полях OPLS-AA (А) и GLYCAM (В) при температуре 300 К. Конформации цепи изображены для расчетов, соответствующим красным графикам с шагом по времени в 50 нс.

1.2.3.1 Поведение цепи О-антигена в силовом поле OPLS-AA. В ходе расчетов МД конформации пиранозных колец почти не менялись. Нами было обнаружено лишь несколько переходов в остатке рамнозы ($< 1\%$ по сравнению с заселенностью 1C_4). Наиболее частыми конформационными изменениями в расчетах в поле OPLS-AA являются переходы гликозидных связей внутри бассейнов глобальных минимумов. Все связи продемонстрировали определенную подвижность: мы наблюдали переходы $LR \leftrightarrow LL$ для *GalMan*, $LR \leftrightarrow LL$ для *ManRha* и $RR \leftrightarrow RL$ и $RR \leftrightarrow LL$ для *RhaGal*, из-за которых первоначально вытянутая структура спирали слегка деформировалась (рис. 4.9 А, верхний ряд). Однако, так как такие переходы стерически не затруднены, мы наблюдали их взаимные трансформации без образования компактных глобул. В то же время, на концах цепи были обнаружены несколько переходов *ManRha* в состояние A_ψ , что привело к образованию коротких шпилек (например, рис. 4.9 А, на 350 нс) с временами жизни до десятков наносекунд. Дальнейшая компактизация цепи не происходила, и все наблюдаемые переходы были обратимыми.

1.2.3.2 Поведение цепи О-антигена в силовом поле GLYCAM. Конформационная подвижность цепи О-антигена в силовом поле GLYCAM значительно отличается от таковой в силовом поле OPLS-AA. В то время как мы не наблюдали никаких конформа-

ционных переходов для остатков маннозы, для галактозы мы обнаружили несколько переходов с довольно большими временами жизни 1C_4 состояния (8–200 нс), а остатки рамнозы показали приблизительно трехкратный избыток в заселенности 1C_4 по сравнению с 4C_1 ($\Delta G \sim 2.9 \pm 0.8$ кДж/моль). Разрушение стартовой спиральной структуры после начального периода длиной примерно 120 ± 80 нс (рис. 4.9 В) происходило за счет необратимого излома цепи, вызванного переходом *ManRha* связи в состояние A_ψ . Затем, в течение 130 ± 40 нс происходят аналогичные переходы в других участках цепи, приводящие к образованию глобулы (рис. 4.8 В) и стремительной компактизации цепи (рис. 4.9 В). Несмотря на различие в деталях внутренней структуры, полученные глобулы имеют примерно одинаковые размеры и, по-видимому, сохраняют компактное состояние в течение времен намного больших, чем могут быть смоделированы в МД расчетах (рис. 4.9 В). Ни для одной связи *ManRha*, перешедшей в состояние A_ψ , мы не наблюдали обратных переходов за время расчетов.

1.2.4 Расчеты при повышенной температуре

Разница в поведении двух моделей, наблюдаемая в расчетах МД при температуре 300 К, связана с существенно различной параметризацией силовых полей OPLS-AA и GLYCAM. Чтобы проверить, является ли эта разница качественной, необходимо удостовериться, что поведение цепи, наблюдаемое в наших 400 нс расчетах, может быть экстраполировано на большие времена. Для этой цели часто используют МД расчеты с обменом репликами, увеличивающие выборку по рассматриваемым конформациям (replica exchange molecular dynamics, REMD) [275]. К сожалению, мы не могли использовать классический метод REMD для нашей системы из-за очень высоких вычислительных затрат. Вместо этого, мы провели серию высокотемпературных расчетов (при температуре 500 К, рис. 4.10) и сравнили поведение О-антигенных цепей с результатами моделирования при комнатной температуре как на молекулярном уровне, так и на уровне локальных структурных переходов.

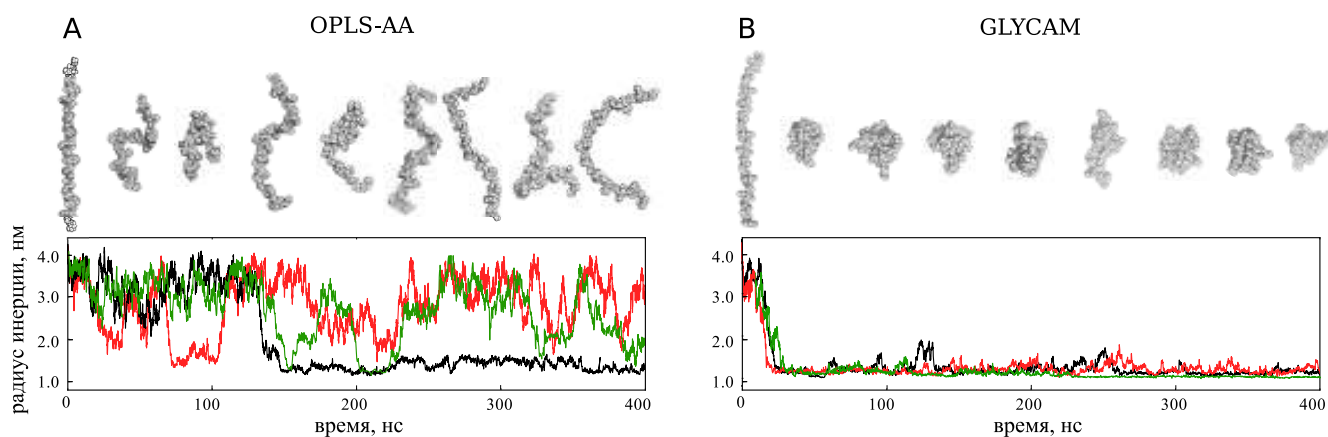


Рис. 4.10: Радиус инерции цепи О-антигена в 400 нс расчетах в силовых полях OPLS-AA (А) и GLYCAM (В) при температуре 500 К. Конформации цепи изображены для расчетов, соответствующих красным графикам с шагом по времени в 50 нс.

1.2.4.1 Поведение цепи в силовом поле OPLS-AA. При температуре в 500 К цепь О-антигена продемонстрировала высокую конформационную подвижность во всех расчетах в силовом поле OPLS-AA (рис. 4.10 А). Мы обнаружили множественные переходы между вытянутым состоянием, состоянием клубка и компактными глобулярными состояниями, что позволило нам оценить относительную заселенность различных областей конформационного объема. Структурная реорганизация О-антигена происходила в результате случайных локальных переходов как в О-гликозидных связях, так и в конформациях пиранозных колец.

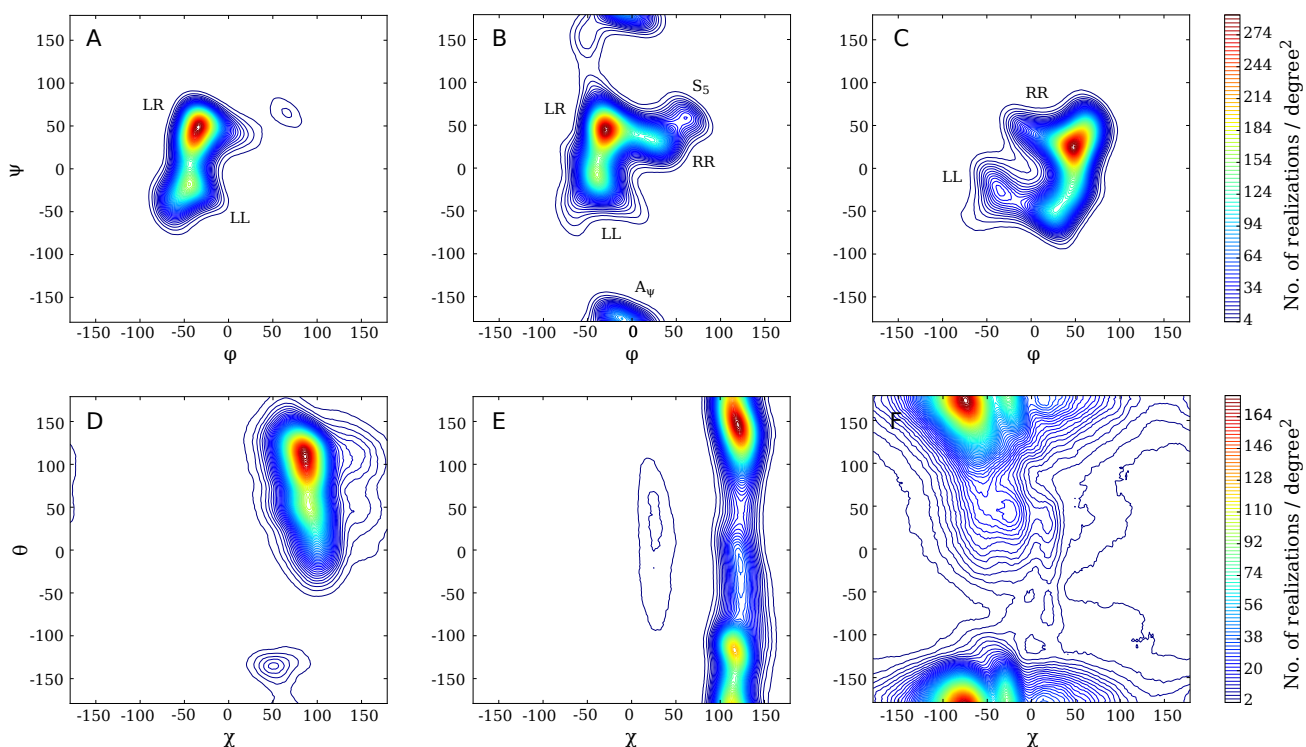


Рис. 4.11: Заселенность различных конформаций цепи О-антигена в координатах (φ, ψ) (верхний ряд) и (χ, θ) (нижний рядом), рассчитанная на основании трех 400 нс МД расчетов при температуре 500 К в силовом поле OPLS-AA ($\sim 8 \cdot 10^5$ точек). Карты заселенностей в координатах (φ, ψ) построены для связей *GalMan* (A,D), *ManRha* (B,E) и *RhaGal* (C,F), соответственно. Углы χ в нижнем ряду отражают конформационную подвижность пиранозных колец галактозы (D), маннозы (E) и рамнозы (F), соответственно. Цветовая градация отражает степень заселенности различных состояний, рассчитанную как количество реализаций конформации на квадратный градус.

Переходы между конформациями пиранозных колец. Карты заселенности в координатах нативных углов (рис. 2.2В в разделе 1.4.1 главы 2; рис. 4.11, нижний ряд) предоставляют важную информацию о конформационном поведении углеводных колец, которая была проверена прямым анализом МД траекторий. Как и при комнатной температуре, кольца рамнозы демонстрируют значительно более высокую подвижность, чем остатки галактозы и маннозы, что отражается в широком диапазоне наблюдаемых значений углов χ для рамнозы (рис. 4.11F). Действительно, стерически незатрудненные изменения конформации пиранозного кольца рамнозы происходят довольно часто без каких-либо критических последствий для общей структуры цепи ($\Delta G \sim 10$ кДж/моль, рис. 4.7В). Напротив, связь

GalMan имеет очень узкий диапазон доступных значений углов (χ, θ) . Слабо заселенные состояния галактозы с углом $\chi \sim 140^\circ$ (рис. 4.11 D) соответствуют конформациям типа твист галактозного кольца. Переход галактозы в состояние твист не оказывает существенного влияния на конформацию цепи, что объясняет более частое появление таких состояний как в компактных, так и в вытянутых конформациях О-антигена. В расчетах мы также наблюдали несколько переходов галактозы в 1C_4 (время жизни 390 ± 130 пс). Эти редкие события обычно происходят на краю цепи и, таким образом, не влияют на ее глобальную структуру. Маннозное кольцо не демонстрирует заметной конформационной подвижности (рис. 4.11 E). Действительно, мы обнаружили очень мало переходов в конформациях маннозных колец; времена жизни этих переходов составляли порядка 2.6 ± 1.1 нс. Большинство из таких событий приводили к излому цепи и запускали формирование шпильки. Долгоживущее состояние 1C_4 маннозы (время жизни более 50 нс) было стабилизировано за счет образования двойной шпильки.

Поворот вокруг связей между остатками. Поскольку очень немногие переходы в конформациях колец приводят к реорганизации структуры О-антигена (рис. 4.7), глобальная структура О-антигенной цепи обычно определяется поворотами вокруг гликозидных связей. Количество переходов гликозидных связей из глобально энергетически выгодного состояния в локально выгодные конформации, ведущих к структурной деформации цепочки, составляет всего 20 % от общего числа переходов, причем половина из них представляет собой переход $RR \leftrightarrow RL$ связи *RhaGal* (рис. 4.2 C). В то же время, для формирования компактных структур требуется кооперативное конформационное изменение, по крайней мере, в двух соседних связях или выворачивание маннозного кольца (рис. 4.7 D–F). Поскольку вероятность таких событий еще ниже, основная часть цепи О-антигена сохраняет вытянутую структуру даже в случае локального изгиба или образования шпилек. Этот эффект подтверждается при анализе карт заселенности в координатах (φ, ψ) (рис. 4.11, верхний ряд), полученной по результатам трех 400 нс МД расчетов в силовом поле OPLS-AA. Действительно, наиболее заселенные состояния связей между остатками совпадают с энергетически выгодными состояниями в соответствующих дисахаридах (рис. 4.2, верхний ряд).

Конформация цепи. При температуре 500 К процесс формирования шпилек идет существенно более интенсивно, чем при комнатной температуре: в наших расчетах мы обнаружили десятки локальных шпилек, образующихся в разных частях цепи. При этом шпильки типа $LL-A_\psi$ (рис. 4.7 E) встречаются в четыре раза чаще, чем шпильки типа $A_\psi-A_\psi$ (рис. 4.7 F). Среднее время жизни одной шпильки в модели OPLS-AA варьируется от сотен пикосекунд до наносекунд. Интересно, что распределение времени жизни шпилек

имеет два выраженных максимума при 160 ± 50 пс и 2800 ± 600 пс, соответственно. Для долгоживущих шпилек мы наблюдали миграцию их вершин вдоль цепочки из-за переходов A_ψ - $A_\psi \leftrightarrow LL$ - A_ψ или LL - A_ψ к другому LL - A_ψ . В первом случае, структура A_ψ - A_ψ переходит в LL - A_ψ , а затем обратно в A_ψ - A_ψ . В зависимости от того, какая из связей *ManRha* претерпевает переход, новая вершина шпильки может либо совпадать с предыдущим состоянием, либо сдвинуться вдоль цепи на одно повторяющееся звено. Во втором типе перехода диссоциация вершины шпилек типа LL - A_ψ (в среднем 940 ± 100 пс) может привести к формированию изгиба LL - A_ψ в соседнем остатке. В результате, происходит классическая одномерная диффузия вершины шпильки вдоль цепи.

Вероятность образования антипараллельной шпильки в поле OPLS-AA довольно низкая, и цепь обычно складывается не более трех раз (рис. 4.8 А). Времена жизни таких структур варьируются, и в одном из расчетов мы получили очень стабильную глобулу, не разрушенную на протяжении сотен наносекунд (рис. 4.10 А, черная линия). Несколько других антипараллельных шпилек выживали в течение ~ 40 нс, а затем переходили обратно в распрямленные состояния (рис. 4.10 А, красная и зеленая линии).

1.2.4.2 Поведение цепи в силовом поле GLYCAM. При высокой температуре в силовом поле GLYCAM необратимые переходы О-антигенной цепи из состояния клубок в состояние глобулы происходят почти в три раза быстрее, чем при температуре 300 К. Механизм формирования О-антигенной глобулы, а также полученный размер глобулы, схожи для расчетов при разных температурах (рис. 4.9, 4.10). В то же время, повышенная температура значительно увеличивает вероятность локальных переходов. Так, по сравнению с расчетами при 300 К, в глобулах, полученных при 500 К, наблюдается повышенная внутренняя подвижность и обнаружены многочисленные переходы $LR \leftrightarrow A_\psi$ в связях *ManRha*. Тем не менее, эта локальная мобильность не влияет на глобальную структуру цепи и, будучи компактно сложенной, цепочка сохраняет свою глобулярную конформацию.

1.2.5 Сравнение результатов расчетов для О-антигенной цепи

Подводя итог нашим наблюдениям, конформационное поведение О-антигена, наблюдаемое в силовых полях OPLS-AA и GLYCAM, качественно отличается на всех временных масштабах. В модели GLYCAM сворачивание О-антигенной цепи при переходе клубок-глобула происходит неизбежно и необратимо, в то время как глобулы О-антигена, образующиеся в поле OPLS-AA, разворачиваются за конечное время. Мы обнаружили только одну долгоживущую глобулу в расчетах в поле OPLS-AA (рис. 4.10 А, черная кривая). Однако глобулы

такого же размера, образовавшиеся в других расчетах, были разрушены в течение десятков наносекунд (рис. 4.10 А; зеленая кривая 200–220 нс и красная кривая 80–110 нс). Таким образом, можно сделать вывод, что переходы клубок-глобула для нашей цепи в поле OPLS-AA обратимы.

Характеристикой полимера, отражающей его склонность к самопроизвольному формированию более или менее компактного клубка, является его персистентная длина. Так, для полимеров с большой персистентной длиной (жесткоцепные полимеры, например, ДНК) характерно образование клубка только при очень большой длине полимерной цепочки. Напротив, гибкоцепные полимеры, например, полиэтиленгликоль (с маленькой персистентной длиной), образуют клубки даже при небольшой длине цепи. Данные моделирования в двух силовых полях дают различные предсказания относительно персистентной длины цепочки О-антигена. К сожалению, верификация наших результатов МД моделирования значительно затруднена именно отсутствием прямых экспериментальных данных о персистентной длине О-антигенов *Salmonella* в растворе. Тем не менее, можно ожидать что цепи О-антигена обладают сложной конформационной динамикой. В самом деле, подвижность на временных масштабах от пико- до микросекунд была обнаружена в ЯМР исследованиях для длинной (10 RU) цепи О-антигена *E. coli* O91 [228]. Более того, существующие данные о синтезе О-антигена и его роли в жизнедеятельности бактериальных клеток также противоречат гипотезе перехода О-антигенной цепи в стабильное глобулярное состояние.

Синтезированные в цитоплазме, О-антигены переносятся через внутреннюю мембрану на ее периплазматическую сторону для дальнейшей полимеризации и присоединения к олигосахаридному ядру ЛПС через наиболее распространенный Wzy-зависимый путь [276]. Таким образом, предварительный фолдинг О-антигена предшествует переносу ЛПС во внешнюю мембрану и определяет дальнейшую конформационную эволюцию цепочки О-антигена на поверхности клетки. Семь белков, образующих периплазматический мостик, перемещают ЛПС из внутренней в наружную мембрану [277, 278]. Во время переноса ЛПС через периплазму цепи О-антигена не покидают гидрофильную среду и складываются без взаимодействия с другими цепями. Следовательно, если предположить, что состояние глобулы предпочтительно для О-антигенного полисахарида, то все цепочки О-антигенов появлялись бы на поверхности клетки в виде таких глобул.

Гипотеза о глобулярной конформации цепочек О-антигена в мембранном окружении плохо соответствует существующим данным о проницаемости внешней мембраны. Согласно экспериментальным данным, слой О-антигенов проницаем для молекул с массой ниже 600 Да [23], тогда как очень плотные глобулы О-антигена создавали бы плотный барьер,

предотвращающий диффузию куда меньших органических молекул к бислою наружной мембраны. Кроме того, существенное несоответствие вытекает из количественных оценок размеров глобул. В наших расчетах площадь проекции глобулы О-антигена составляет около 8 нм^2 (рис. 4.9, 4.10). В то же время, как будет показано в расчетах в разделе 6, и было получено в более ранних работах, липидная часть молекулы ЛПС с пятью ацильными цепями имеет равновесную площадь около $1.0\text{--}1.5 \text{ нм}^2$ [218]. Поскольку нелипидные компоненты составляют не более 50% поверхности наружной мембраны бактерий [168], то максимальная площадь, занимаемая одним О-антигеном, не может превышать удвоенную равновесную площадь липидной части ЛПС, то есть примерно 3 нм^2 . Это значение намного меньше расчетной площади проекции глобулы, образованной О-антигеном из 12 повторяющихся звеньев ($\sim 8 \text{ нм}^2$). Так как цепочки О-антигена в реальных мембранах могут быть значительно длиннее, эта разница может быть еще больше. Кроме того, транспорт О-антигена на наружную мембрану, выполняемый белковым комплексом LptD-LptE, был бы существенно затруднен в случае глобулярной структуры О-антигена. Все компоненты ЛПС проходят во внешний слой наружной мембраны через гидрофильную пору в белке LptD, размер которой составляет примерно $25 \text{ на } 15 \text{ \AA}$ [279]. В то время как поры LptD могут вместить вытянутую цепочку О-антигена диаметром $12.5 \text{ \AA}$, прохождение через них глобул О-антигена невозможно. Таким образом, вероятность образования О-антигенами устойчивых глобул в растворе или на поверхности мембраны крайне мала.

Возможные причины наблюдаемой разницы в поведении О-антигена в моделях OPLS-AA и GLYCAM следуют из анализа распределения свободной энергии для дисахаридных остатков (рис. 4.2). В Man-Rha состояние A_ψ выглядит существенно более устойчивым в поле GLYCAM по сравнению с полем OPLS-AA, что приводит к различиям в конформационном поведении связей *ManRha* в моделях длинной О-антигенной цепи. Действительно, относительная свободная энергия Man-Rha в состоянии A_ψ на $\sim 12 \text{ кДж}$ ниже в поле GLYCAM, чем в поле OPLS-AA (табл. 4.1). Кроме того, в модели в поле GLYCAM активационный барьер перехода Man-Rha $A_\psi \rightarrow LR$ на $\sim 8 \text{ кДж/моль}$ выше, чем в поле OPLS-AA. В результате, однажды перейдя в низкоэнергетическое состояние A_ψ , *ManRha* связи в поле GLYCAM не могут совершить обратный переход в *син*-состояние, и последующая компактизация цепи продолжается за счет дальнейших необратимых переходов других связей *ManRha*.

1.3 Роль остатка рамнозы в подвижности цепи О-антигена

Согласно результатам МД моделирования, фолдинг первоначально вытянутой структуры О-антигена происходит через обратимое (в OPLS-AA) или необратимое (в GLYCAM) образование шпильки, которое вызывает излом цепи и критическое снижение радиуса инерции (рис. 4.9, 4.10). Шпилька может быть сформирована либо в результате редкого перехода в пиранозном кольце маннозы ${}^4C_1 \rightarrow {}^1C_4$, либо через переход $LL/LR \rightarrow A_\psi$ в связи *ManRha*. Последнее представляется довольно распространенным событием в обеих рассмотренных моделях, что, должно быть, связано с конкретными структурными особенностями восстановленного остатка α -L-рамнозы.

Роль рамнозы в повышении подвижности полисахаридной цепи хорошо известна и ранее была описана для фруктовых пектинов [280, 281]. Вставка связи 2- α -Rha-1 в цепочке поли- α -D-глюкуроновой кислоты приводит к ее изгибу $\sim 90^\circ$ (эту конформацию авторы называли полисахаридным кинком [280]). Однако мы не наблюдали такого эффекта для О-антигена *Salmonella*, по-видимому, из-за отличного окружения рамнозного остатка (4- α -L-Rha-1). Увеличение подвижности отрицательно заряженных цепей пектина при высоком содержании незаряженной рамнозы [280, 281] можно объяснить уменьшением самоотталкивания внутри цепи [282]. Для нейтральных цепей О-антигена *Salmonella* увеличение гибкости цепи в местах наличия рамнозы должно иметь совершенно иную природу.

Анализ состояний A_ψ рассматриваемых дисахаридов не показывает каких-либо структурных преимуществ состояния *Man-Rha* A_ψ по сравнению с аналогичными состояниями в *Gal-Man* или *Rha-Gal*. Тем не менее, конформация *Man-Rha* A_ψ имеет более низкую свободную энергию, чем другие *анти*-состояния в вакууме и особенно в воде (табл. 4.1), и цепь О-антигена изгибается преимущественно за счет перехода *ManRha* в состояние A_ψ . Таким образом, заселение этого состояния является энтропийным процессом и играет решающую роль в разрушении высокоупорядоченной исходной спиральной конформации. Возможной причиной такого энтропийного усиления образования A_ψ состояний в связи *ManRha* является высокая подвижность кольца рамнозы. Действительно, в то время как маннозные и галактозные кольца сохраняют свои конформации, мы наблюдаем множественные переходы кольца рамнозы, выворачивающегося в расчетах как в поле OPLS-AA, так и в поле GLYCAM (табл. 4.2). В то же время, состояние A_ψ связи *RhaGal* стабилизируется образованием водородной связи, которая ограничивает подвижность кольца рамнозы и, следовательно, уменьшает энтропию этого состояния. Этот эффект подтверждается в расчетах для дисахаридов в поле OPLS-AA. В *Rha-Gal* в состоянии A_ψ разница энергий конформа-

ций $^1\text{C}_4$ и $^4\text{C}_1$ кольца рамнозы равна ~ 45 кДж/моль по сравнению с ~ 5.2 кДж/моль в Man-Rha (табл. 4.2).

1.4 Заключение о конформационной динамике цепи О-антигена в растворе

Мы разработали две МД модели цепочки О-антигена *S. typhimurium* серотипа В с использованием силовых полей OPLS-AA и GLYCAM и проанализировали их конформационное поведение в растворе. Для каждого полимера разнообразие возможных конформаций цепи зависит от его длины. Этот эффект выражен даже для довольно коротких фрагментов О-антигена (1–4 тетрасахаридных звена) [30], тогда как в реальной системе молекулы могут содержать до сотни повторяющихся звеньев [182]. В силу ограниченного вычислительного времени МД расчетов, мы рассматривали цепь О-антигена, содержащую 12 повторяющихся звеньев. Наша цепь была в два раза длиннее О-антигенов, рассмотренных в предыдущих модельных исследованиях [29, 30]. В результате, наши модели продемонстрировали качественно новое конформационное поведение, которое не может быть выведено из анализа динамики более коротких олигосахаридов.

В моделях в обоих полях OPLS-AA и GLYCAM мы наблюдали образование нескольких шпилек и компактных глобул. Устойчивость этих состояний определяется не только углами поворота вокруг О-гликозидных связей (φ, ψ) и конформациями пиранозных колец, но и взаимодействием удаленных частей цепи. Для детального изучения конформационного поведения длинной цепочки О-антигена мы провели анализ каждого из этих факторов по отдельности. Сначала, чтобы не учитывать вклад дальних взаимодействий, мы рассмотрели дисахаридные фрагменты основной цепи О-антигена как отдельные молекулы и проанализировали ландшафт свободной энергии в координатах (φ, ψ) методом PMF по результатам продолжительный МД расчетов (1 мкс в вакууме и 100 нс в воде). Глобальный минимум для всех дисахаридов в обоих силовых полях соответствует *син*-конформации О-гликозидных связей. Также заселены *анти*-конформации с более высокой энергией, что хорошо соответствует полученным ранее результатам [28–30]. При моделировании дисахаридов мы наблюдали только количественные различия между моделями в полях OPLS-AA и GLYCAM. Наиболее выраженная разница между используемыми силовыми полями связана со степенью заселенности состояния A_ψ связи *ManRha*, которая значительно выше в модели GLYCAM.

Глобальные минимумы свободной энергии, полученные для моделей дисахаридов в полях OPLS-AA и GLYCAM, были использованы для построения начального состояния для моде-

лирования динамики длинной цепочки О-антигена. Выбор стартовой конформации имеет решающее значение для результатов моделирования, поскольку длинная полисахаридная цепь имеет много степеней свободы и очень сложный конформационный ландшафт свободной энергии. Мы построили энергетически выгодную структуру цепи, выставив конформации каждой связи между остатками в глобальный минимум энергии, рассчитанный для дисахаридов, и каждую конформацию гексапиранозного кольца — в энергетически выгодное состояние. Полученная структура была близка к узкой спирали 3_1 и использовалась в качестве начального состояния в 400 нс МД расчетах О-антигена в водном растворе.

Конформационное поведение длинной цепи О-антигена значительно осложняется взаимодействием удаленных частей молекулы. В результате, локальные вращения вокруг О-гликозидных связей могут привести к образованию шпилек. В обеих моделях в полях OPLS-AA и GLYCAM вершины шпилек всегда формируются через переход связи *ManRha* в состояние A_ψ . В обеих моделях дисахарида Man-Rha разница в заселенности состояний A_ψ существенно не влияет на общее конформационное поведение молекулы. Тем не менее, различия в значениях свободной энергии этого состояния приобретает решающее значение в случае длинной О-антигенной цепочки и приводят к качественно различным сценариям конформационного поведения О-антигена. В обоих силовых полях мы наблюдаем образование шпилек, ведущее к компактизации цепей. Однако в поле OPLS-AA переход клубок-глобула для цепочки О-антигена обратим и происходит в течение сотен наносекунд, тогда как модель в поле GLYCAM, напротив, предсказывает необратимый переход О-антигена от клубка к глобуле. Несмотря на то, что не существует прямых экспериментальных данных, описывающих конформационную динамику О-антигена в растворе, имеющиеся данные по синтезу и биологической функции О-антигенов противоречат гипотезе формирования стабильной глобулы. Так как одной из основных задач наших дальнейших исследований являлось реалистичное воспроизведение укладки О-антигена на поверхности наружной мембраны, мы остановили свой выбор на силовом поле OPLS-AA, которое было использовано для создания моделей ЛПС-агрегатов (раздел 5) и ЛПС-мембран (раздел 6).

2 Валидация параметров липидного слоя

Основным валидирующим параметром для моделей липидных бислоев является площадь поверхности, приходящаяся на одну молекулу в монослое при фиксированном поверхностном натяжении. В равновесном бислое в отсутствие латеральной составляющей давления поверхностное натяжение равно нулю [283]. Считается, что площадь на липид при нулевом

Таблица 4.3: Экспериментальные данные для площади на липид (ApL) для монослоев липидов диолеилфостфатидилхолин (DOPC), пальмитоилолеилфостфатидилхолин (POPC), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), дипальмитоилфостфатидилхолин (DPPC), пальмитоилолеилфостфатидилглицерол (POPG).

липид	температура, К	конц. ионов, моль/л	ApL, Å ²	источник
DOPC	303	—	67.4 ± 1.0	[284]
POPC	303	0.1	64.3 ± 1.3	[285]
DPPE	298	0.1	46.0 (гель)	[286]
DPPC	323	—	63.0 ± 1.0	[284]
POPG	303	0.1	64.7 ± 1.3	[287]

поверхностном натяжении липидного бислоя соответствует площади на липид в монослое при поверхностном натяжении около 35 дин/см и называется равновесной площадью на липид (Area per Lipid, ApL). Классическим экспериментом по измерению ApL является снятие изотермы латерального давления в зависимости от площади монослоя Ленгмюра. Также данные о равновесной площади могут быть получены из экспериментов по рассеянию рентгеновских лучей или нейтронов на липидных мультиламеллярных фазах. Различные части молекулы липида могут вносить различный вклад в равновесную площадь. Межмолекулярные водородные связи обеспечивают притяжение и уменьшают ApL. В случае заряженных липидов, существенный вклад вносит электростатическое отталкивание полярных головок, которое увеличивает равновесную площадь. Увеличение параметра упорядоченности ацильных цепей при плотной упаковке липидов уменьшает энтропию системы, что препятствует снижению ApL. Таким образом, равновесная площадь является параметром, чувствительным к самым различным характеристикам механической модели молекулы липида.

Прежде, чем приступить к моделированию целых молекул ЛПС и ЛПС-содержащих систем, мы провели предварительную серию расчетов для бислоев, состоящих из более простых липидов, для валидации параметров используемого силового поля OPLS-AA. В качестве опорных данных мы рассматривали экспериментальные результаты, приведенные в табл. 4.3.

В первую очередь, мы провели уравнивающие расчеты для насыщенных и ненасыщенных фосфатидилхолинов в силовом поле OPLS-AA, используя протокол, описанный в разделе 1.3.3 главы 2. Масштабируемость рассматриваемых систем была оценена сравнением результатов расчетов для бислоя, состоящего из 50 и 128 молекул липидов. Ампли-

туда колебаний значения ArL в таких системах сохранялась примерно одинаковой. ArL в расчетах с использованием базовых параметров силового поля OPLS-AA оказалась существенно занижена, по сравнению с экспериментальными данными для обеих рассматриваемых систем (рис. 4.12 А,В). Причина наблюдаемого несоответствия, видимо, заключается в особенности параметризации силового поля OPLS-AA. Поле OPLS-AA было разработано таким образом, чтобы воспроизводить термодинамические свойства жидкостей, и при соответствующих расчетах силовые параметры подбирались для растворов коротких алканов в различных растворителях [232, 288]. В то же время, наиболее распространенным объектом, рассматриваемым при моделировании моно- и бислоев являются липиды с длиной цепей более 12 атомов углерода, что больше, чем было проанализировано при создании силового поля OPLS-AA.

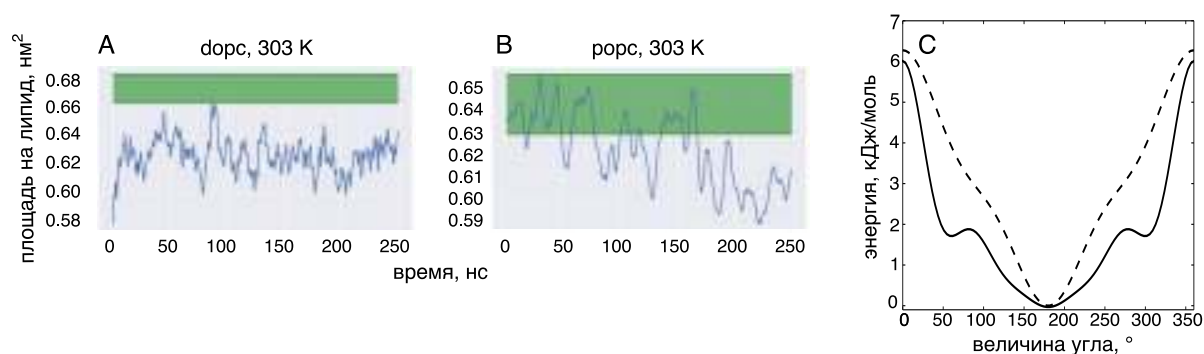


Рис. 4.12: Значения площади на липид (ArL) в расчетах для модельных бислоев, зеленым отмечена область, соответствующая экспериментальным данным (А,В). Профиль потенциальной энергии вращения вокруг С–С связи в поле OPLS-AA (пунктир) и в его модификации [289] (сплошная линия, С).

Заниженные значения ArL , полученные в модельных расчетах, связаны с низкой вероятностью образования кинков в ацильных цепях. С точки зрения молекулярной модели, эта вероятность определяется разностью потенциальных энергий между *транс*- и *гош*-конформерами. В поле OPLS-AA потенциал вращения вокруг С–С связи в углеводородной цепи имеет вид, показанный на рис. 4.12 С (пунктир), и обладает достаточно высокой энергией в области, соответствующей скошенной *гош*-конформации. Этот артефакт параметризации был исправлен в недавней статье [289], в которой были проведен перерасчет параметров потенциалов торсионных углов в насыщенных и ненасыщенных ацильных цепях, а также параметров Леннарда-Джонса для sp^3 -гибридизированных атомов в цепях жирных кислот, с целью воспроизведения реалистичных характеристик фосфатидилхолиновых

бислоев. Потенциал двугранного угла, использованный в работе [289] имеет существенно отличную форму с меньшей энергией *gauche*-конформаций (рис. 4.12 С, сплошная линия) и тем самым позволил нам увеличить ArL в рассматриваемых системах и приблизить расчетные значения к экспериментальным. Результаты уравнивающих расчетов с новыми параметрами представлены на рис. 4.13. Результаты расчетов хорошо согласуются с экспериментально полученными значениями. Более того, для дипальмитаилфосфатидилэтаноламина (DPPE) нам удалось воспроизвести фазовый переход в гель-фазу, наблюдаемый в эксперименте [286] (рис. 4.13 D). Полученные параметры были в дальнейшем использованы нами для моделирования ацильных цепей молекул ЛПС.

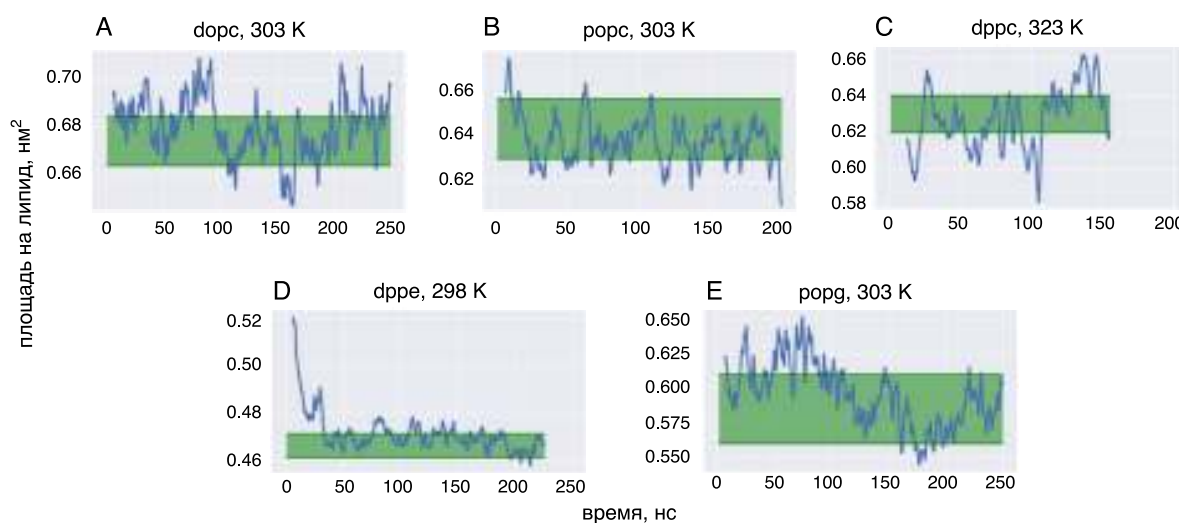


Рис. 4.13: Значения площади на липид в расчетах для модельных бислоев. Зеленым отмечена область, соответствующая экспериментальным данным.

3 Параметры полярных головок и центрального олигосахарида

Липид А и центральный олигосахарид ЛПС содержат в своем составе фрагменты, силовые параметры которых не описаны в поле OPLS-AA. Для расчета недостающих параметров мы выделили каждый из нестандартных фрагментов в виде отдельной молекулы (рис. 4.14, верхний ряд), для которой были проведены расчеты *ab initio*. Прежде всего, мы скорректировали значения параметров электростатического взаимодействия, которые играют ключевую роль в межмолекулярных взаимодействиях. Мы оставили без изменений параметры Ван-дер-Ваальса, выбрав их по аналогии с присутствующими в поле типами атомов, как это

было сделано в расширении поля OPLS-AA для углеводов [290]. В частности, первичные, вторичные и третичные атомы углерода в алканах, а также гидроксильрованные атомы углерода первичных, вторичных и третичных спиртов имеют одинаковые параметры взаимодействия. Поэтому для всех новых типов атомов мы устанавливаем параметры Ван-дер-Ваальса такими же, как для типов атомов с аналогичным химическим окружением в исходном поле. Атомный заряд, напротив, сильно зависит от соседних атомов, поэтому нам пришлось скорректировать его для всех новых типов атомов. При внесении изменений мы старались максимально сохранить самосогласованность существующего силового поля, т.е. мы изменяли парциальные заряды только для атомов, расположенных на стыке стандартных атомных групп с учетом значений парциальных зарядов для аналогичных типов атомов, описанных в силовом поле.

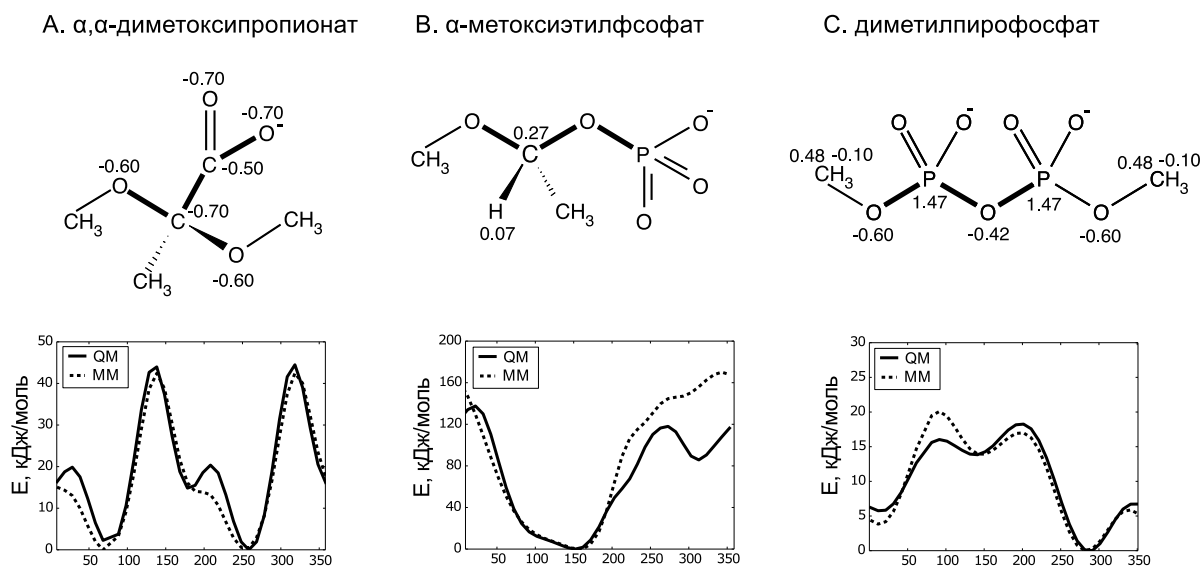


Рис. 4.14: Химические фрагменты структуры ЛПС, описание которых отсутствует в силовом поле OPLS-AA (верхний ряд). Числами обозначены скорректированные значения парциальных зарядов (q_e). Жирными линиями в структурных формулах показаны двугранные углы, для которых мы рассчитали профили энергии вращения (нижний ряд). Профили *ab initio* (жирная линия) и молекулярно-механической (пунктирная линия) энергии (кДж/моль) построены как функции значения двугранного угла (градусы) для каждой молекулы.

3.1 Корректировка парциальных зарядов

Значения зарядов выбирались путем сравнения результатов фитирования *ab initio* зарядов методом RESP (см. раздел 1.2 главы 2) с парциальными зарядами атомов схожих типов

силового поля OPLS-AA. В то же время, мы учитывали значения заряда RESP для соседних атомов из стандартных атомных групп. В случае их противоречия соответствующим параметрам типов атомов в поле OPLS-AA, мы вносили изменения, дополнительно учитывая особенности распределения электростатического потенциала для конкретной молекулы. Ниже приведено описание этой процедуры для каждого химического фрагмента, отсутствующего в силовом поле OPLS-AA (рис. 4.14).

Первый рассмотренный фрагмент структуры ЛПС, описание которого отсутствует в силовом поле OPLS-AA, — это карбоксилированный по центральному атому ацеталь из олигосахарида внутреннего ядра (рис. 4.14 А). Хотя силовое поле содержит параметры и для атомов карбоксигруппы, и для атомов ацеталя, комбинация этих фрагментов не описана. Мы рассмотрели этот замещенный фрагмент как отдельную молекулу α, α -диметоксипропионата (рис. 4.14 А), для которой мы выполнили расчет парциальных зарядов (табл. 4.4). Заряды, полученные путем подгонки электростатического *ab initio* потенциала методом RESP, значительно отличались от значений зарядов для обычных типов карбонильных и ацетальных атомов в поле OPLS-AA. Поэтому для каждого атома мы сместили значение заряда силового поля для аналогичного типа атома в сторону значения заряда, полученного методом RESP (табл. 4.4 А).

Следующий неописанный фрагмент молекулярной структуры ЛПС представлял собой α -фосфорилированный эфир фосфористой кислоты из липида А (рис. 4.14 В). Для этого фрагмента полученные заряды RESP оказались сильно отличными от зарядов силового поля для аналогичных типов атомов, для некоторых атомов — с точностью до знака. Чтобы получить более корректный набор параметров, мы провели расчет зарядов по методу Малликена (табл. 4.4 В). Увеличение положительного заряда на атоме эфирного углерода и атоме водорода по сравнению с параметрами силового поля OPLS-AA объясняется наличием дополнительного электроотрицательного заместителя. Следовательно, мы произвели сдвиг значений зарядов поля OPLS-AA в сторону приближения к значениям зарядов, полученных по методу Малликена. Величина сдвига выбиралась из соображений сохранения значений заряда для других атомов и суммарного заряда рассматриваемого фрагмента (табл. 4.4 В).

Еще один неописанный фрагмент олигосахарида внутреннего ядра представляет собой пирофосфат, замещенный холином (рис. 4.14 С). Силовое поле OPLS-AA содержит только значения заряда для диметилфосфата с частичными зарядами атомов водорода, равными $-0.03 q_e$. Такие отрицательные значения заряда могут быть артефактом процедуры фитирования методом RESP, так как отрицательные заряды нетипичны для атомов водорода, связанных с окисленными атомами углерода. По-видимому, причиной артефакта метода

RESP является компенсация дипольного момента, возникающего из-за смещения электронной плотности между атомом фосфора и атомами кислорода из метоксигруппы. Если эта гипотеза верна, то подобная неточность приведет к появлению дополнительного отрицательного заряда на метильных группах в случае других замещенных пирофосфатов. Чтобы оценить влияние смещения электронной плотности на результаты процедуры RESP и единообразно выбрать парциальные заряды для атомов различных пирофосфатов, мы выполнили расчеты для ряда различных замещенных пирофосфатов (рис. 4.15). Из-за небольшой разницы между значениями зарядами RESP и зарядами из силового поля мы вносили изменения только в значения зарядов для атомов фосфора, центрального атома кислорода, атома α -углерода и связанных с ним эфирных атомов кислорода (табл. 4.4 C). Для всех рассмотренных молекул RESP-заряды атомов водорода, связанных с атомами α -углерода, равны приблизительно $-0.10 q_e$, что коррелирует с отрицательными значениями заряда для атомов водорода диметилпирофосфата из силового поля OPLS-AA. Таким образом, мы установили значение заряда атома водорода равным $-0.10 q_e$. Заряды RESP для центральных атомов кислорода почти одинаковы для всех молекул, поэтому мы установили их равными $-0.42 q_e$. Заряды RESP для атомов фосфора несколько меньше по величине, чем заряды из силового поля, поэтому их значения были выбраны равными $1.47 q_e$.

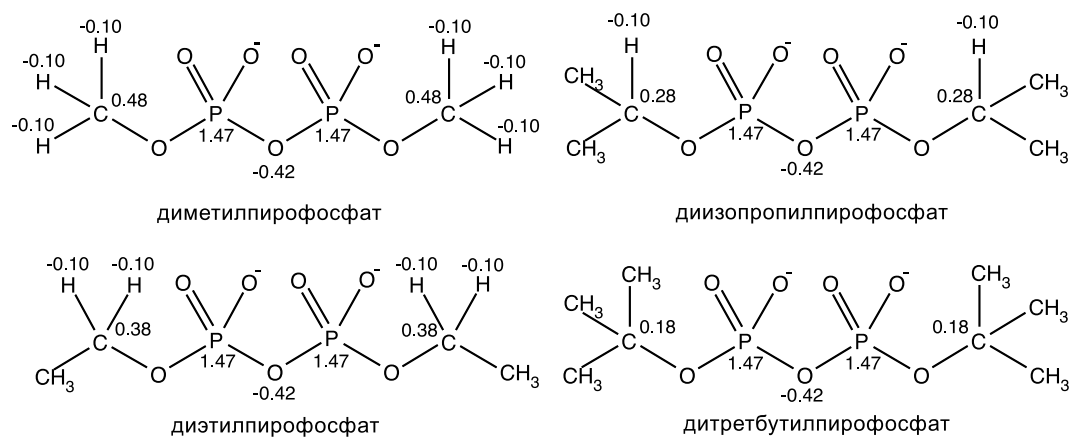


Рис. 4.15: Замещенные пирофосфаты. Числа указывают скорректированные значения атомных зарядов (q_e).

Из табл. 4.4 видно, что парциальные заряды RESP дают общий существенно отрицательный заряд на метильных группах. В то же время, как правило, в поле OPLS-AA алифатическая метильная группа CH_3 является нейтральной. Как было предположено ранее, причиной этого несоответствия является особенность функционирования процедуры RESP. В процессе фитирования *ab initio* потенциала дипольный момент компенсируется концентрацией отри-

цательного заряда на атомах боковой метильной группы, что приводит к отрицательным зарядам на атомах водорода.

Чтобы нейтрализовать этот эффект и оставить парциальные заряды как можно ближе к параметрам силового поля, мы изменили парциальные заряды на атомах α -углерода. Мы установили величины этих зарядов в соответствии с количеством связанных с ними атомов водорода таким образом, чтобы общий заряд углеводородного радикала был одинаковым для всех рассмотренных замещенных пирофосфатов (табл. 4.4 D). Аналогичный подход был применен авторами силового поля OPLS-AA для других типов атомов. Например, в насыщенных углеводородах значения заряда для первичных, вторичных, третичных и четвертичных атомах углерода составляют -0.18 , -0.12 , -0.06 и $0.0 q_e$, соответственно, т. е. различаются на величину, равную суммарному значению заряда связанных с ними атомов водорода.

Наконец, выбранные значения зарядов дают единообразное распределение заряда для всех четырех замещенных молекулах пирофосфатов.

Таблица 4.4: Парциальные заряды для атомов из нестандартных фрагментов молекулы ЛПС (q_e). Для атомов α , α -диметоксипропионата (ADMP): заряды RESP, заряды OPLS-AA для аналогичных типов атомов и скорректированные значения конечного заряда для эфирных и карбоксильных атомов кислорода, и для атомов углерода ацеталей и карбоновой кислоты (A). Парциальные заряды для атомов α -метоксиэтилового эфира фосфорной кислоты (MEP): заряды, рассчитанные методом Малликена, исходные заряды поля OPLS-AA и окончательные скорректированные значения заряда для α -атома углерода и связанного с ним атома водорода (B). Парциальные заряды для атома α -углерода и связанного с ним атома водорода, боковых метильных групп, атомов фосфора и центрального атома кислорода из замещенных пиррофосфатов: заряды, рассчитанные методом RESP, заряды в поле OPLS-AA и конечные значения зарядов для диметил- (DMP), диэтил- (DEP), диизопропил- (DIPP) и дитретбутилпиррофосфата (DTBP). α -атомы углерода для всех молекул пиррофосфата представлены в (D).

A.	RESP	OPLS-AA	B.	Малликен	OPLS-AA	скоррект.
эфирный кислород	-0.606	-0.400	углерод	+0.304	+0.110	+0.270
углерод ацеталей	+0.884	+0.400	водород	+0.120	+0.030	+0.070
кислород карбоксила	+0.528	+0.700				
углерод карбоксила	-0.715	-0.800				
C.	RESP				OPLS-AA	скоррект.
	DMP	DEP	DIPP	DTBP		
α -углерод	+0.460	+0.520	+0.730	+0.860	+0.300	D.
α -водород	-0.100	-0.100	-0.120		-0.030	-0.100
метильная группа		-0.160	-0.200	-0.220	-0.000	-0.000
фосфор	+1.500	+1.080	+1.070	+1.160	+1.620	+1.470
центральный кислород	-0.600	-0.430	-0.390	-0.450	-0.600	-0.420
D.	DMP	DEP	DIPP	DTBP		
α -углерод	+0.480	+0.380	+0.280	+0.180		

3.2 Корректировка параметров потенциалов двугранных углов

В поле OPLS-AA энергия торсионных углов вращения описывается потенциалом Рихарта-Беллемана, параметрами которого являются первые шесть коэффициентов разложения потенциала по степеням косинуса. Для каждого фрагмента, выделенного из структуры молекулы ЛПС (рис. 4.14) мы рассчитали полную *ab initio* (QM) энергию как функцию соответствующего значения угла вращения (рис. 4.14). Затем мы провели фитирование полученных энергетических профилей соответствующим профилем полной молекулярно-механической (ММ)

энергии, используя в качестве переменных параметров только параметры потенциальной энергии угла вращения и фиксируя все остальные силовые параметры модели (табл. 4.5). Из-за формы потенциала Рикарта-Беллемана и структурных особенностей конкретных молекул мы не достигли полного соответствия энергетических профилей. Несоответствие профилей объясняется различием между значениями QM и MM энергий в случае перекрытия электронных оболочек атомов.

Для молекулы α, α -диметоксипропионата мы скорректировали параметры потенциальной энергии угла вращения, рассматривая вращение карбоксильной группы относительно атомов эфирного кислорода (рис. 4.14 А). Мы достигли почти точного соответствия профилей, за исключением локальных максимумов кривых, соответствующих перекрытию атомов кислорода карбоксила и водорода метила (рис. 4.14 А).

Для молекулы α -метоксиэтилфосфата мы скорректировали значения параметров потенциальной энергии угла вращения фосфатной группы относительно атомов кислорода эфира (рис. 4.14 В). Мы проводили фитирование только для значений двугранного угла, соответствующих значениям энергии ниже 50 кДж/моль (~ 20 kT), так как для более высоких энергий вероятность реализации соответствующей молекулярной конформации пренебрежимо мала. Результирующие кривые с высокой точностью совпали с профилями QM энергии для рассматриваемых значений угла (рис. 4.14 В).

Для молекулы диметилпирофосфата мы рассчитали параметры энергии торсионного угла между фосфористым и центральным атомами кислорода относительно атома кислорода эфира и соседнего атома фосфора, соответственно (рис. 4.14 С). Несоответствие кривых в окрестности локального максимума связано с перекрытием электронных оболочек эфирного кислорода и одного из неэфирных атомов кислорода при вращении вокруг соответствующей связи. Это перекрытие имеет место из-за того, что в равновесной конформации валентный угол при центральном атоме кислорода существенно нететраэдричен из-за отталкивания соответствующих крупных заместителей. Другие части кривых при подобранных параметрах совпали с высокой точностью (рис. 4.14 С).

Таблица 4.5: Параметры Рикарта-Беллемана потенциала вращения двугранного угла для α , α -диметоксипропионата (ADMP), α -метоксиэтилфосфата (MEP) и диметилпирофосфата (DMP) ($\text{кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$).

	C_0	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5
ADMP	5.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
MEP	34.3	-68.0	10.4	-33.1	0.0	0.1
DMP	-1.3	0.7	-12.0	3.5	0.0	0.0

4 Модель молекулы ЛПС

Расчеты молекулярной динамики, описанные в разделах 2 и 3, позволили нам завершить параметризацию молекулярной модели Re- и Ra-LPS. Используя модель цепи О-антигена, рассмотренной в разделе 1.2.2 и полученную модель Ra-LPS, мы сконструировали модели молекул S-LPS, содержащие 3 и 12 повторяющихся звеньев О-антигена (далее мы называем такие структуры O3-LPS и O12-LPS, соответственно).

Топологии молекул ЛПС различной структуры были собраны при помощи разработанной в нашей лаборатории утилиты **TrpMkTop**. В основе ее работы лежат принципы химической информатики, позволяющие однозначно описывать химическую структуру при помощи строк символов (SMARTS), что подробно описано в разделе 1.1 главы 2. Для каждого нового типа атома, отсутствующего в силовом поле OPLS-AA, база данных химических фрагментов была дополнена шаблоном SMARTS, описывающим его химическое окружение. Таким образом, в текущей версии **TrpMkTop** позволяет создавать молекулярные модели ЛПС *S. typhimurium* с различной длиной О-антигена. Эти модели были далее использованы нами для создания моделей надмолекулярных ЛПС-структур.

5 Модели агрегатов ЛПС

Являясь амфифильными молекулами, ЛПС в растворе склонны образовывать надмолекулярные агрегаты. Структура агрегатов в большой степени определяет степень их биологической активности. В частности, как показано в разделе 2.2 главы 1, структура агрегатов ЛПС может быть определяющим фактором при активации контактной системы свертывания крови. В данном разделе мы рассматриваем молекулярные модели агрегатов, полученные для

модели ЛПС-молекулы в разделах 1–4.

Как было показано в экспериментальных исследованиях по воздействию антимикробных пептидов на агрегаты различной структуры, устойчивость ЛПС к воздействию препарата сильно зависит от наличия в их составе углеводной цепи О-антигена [20]. Более того, архитектура агрегатов во многом определяет их устойчивость к воздействию детергентов [20]. Поэтому в нашей работе мы рассмотрели модели мицелл, состоящих из ЛПС с разной величиной гидрофильной части и оценили вероятность формирования и потенциальную устойчивость мицеллярных структур в растворе для ЛПС разного состава. Подробное описание создание молекулярных моделей приведено в разделе 1.3.4 главы 2.

Мы рассмотрели модели мицелл, состоящих из N молекул Re-, Ra- и S-LPS, где $N = 4, 6, 8, 14$ молекул на мицеллу. Результирующие структуры после уравнивающего МД расчета представлены на рис. 4.16. Основным параметром, использованным нами для оценки устойчивости полученных структур, является площадь гидрофобной поверхности липида А, экспонированная в раствор. Эта величина, с одной стороны, отражает вероятность существования подобных структур в водном растворе, а с другой — потенциально определяет степень активности рассматриваемых агрегатов, так как именно липидная часть ответственна за активацию как иммунного ответа, так и контактной системы свертывания крови (см. раздел 2.2 главы 1). Для каждой структуры была рассчитана площадь экспонированной в раствор гидрофобной поверхности, приходящейся на одну молекулу агрегата:

$$S_1 = \frac{S_{hydrophobic}}{N},$$

где $S_{hydrophobic}$ была рассчитана для последних 50 нс траектории с использованием процедуры, описанной в разделе 1.3.4 главы 2 (рис. 4.17).

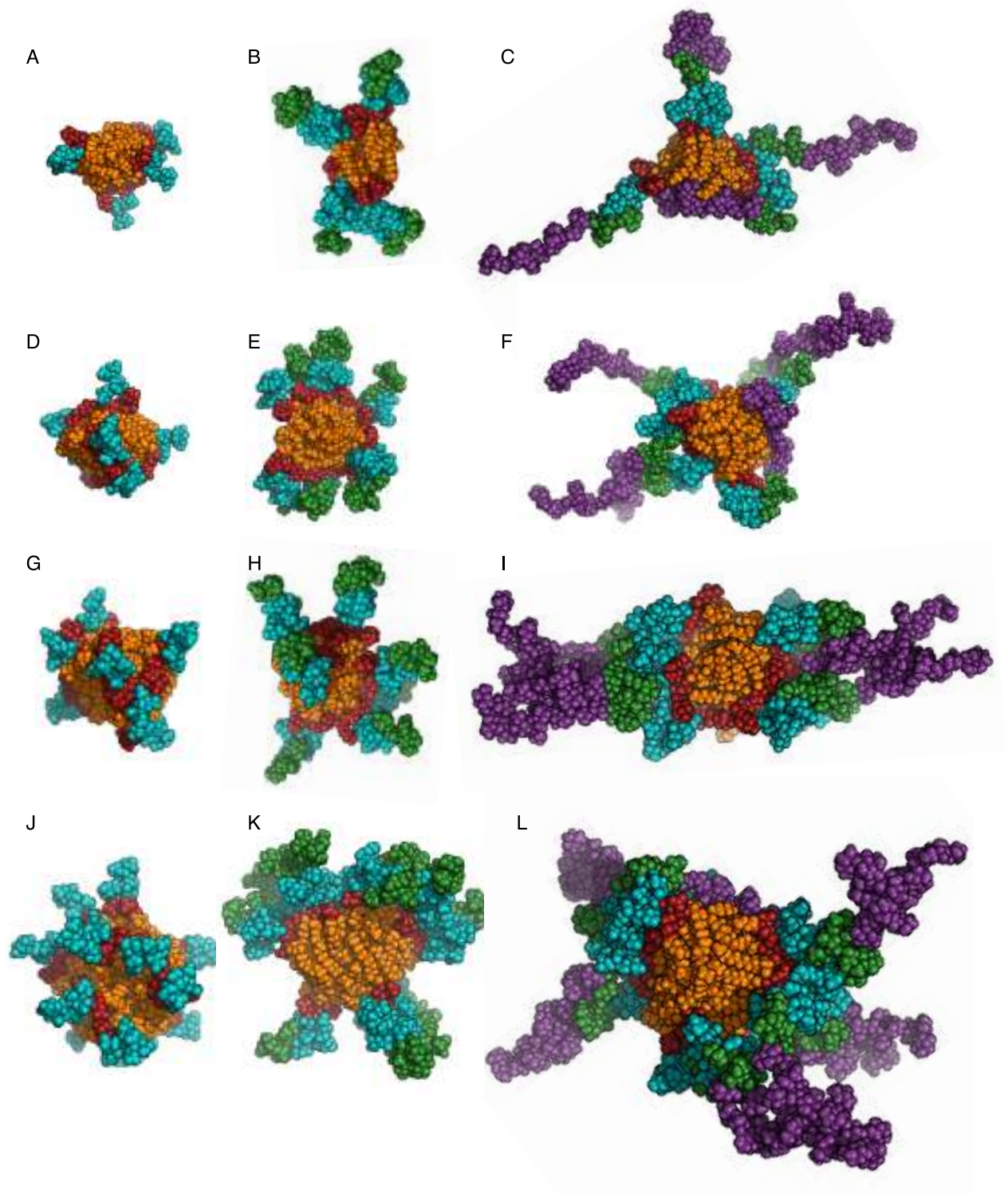


Рис. 4.16: Финальная структура моделей ЛПС-мицелл, состоящих из четырех (А–С), шести (D–F), восьми (G–I) и четырнадцати (J–L) молекул. Рассмотрены структуры агрегатов, формируемые Re- (A,D,G,J), Ra- (B,E,H,K) и O3-LPS (C,F,I,L). Оранжевым цветом отмечена гидрофобная часть молекул, красным — полярные головки липидов, бирюзовым — внутреннее ядро, зеленым — внешнее ядро, фиолетовым — цепи О-антигена.

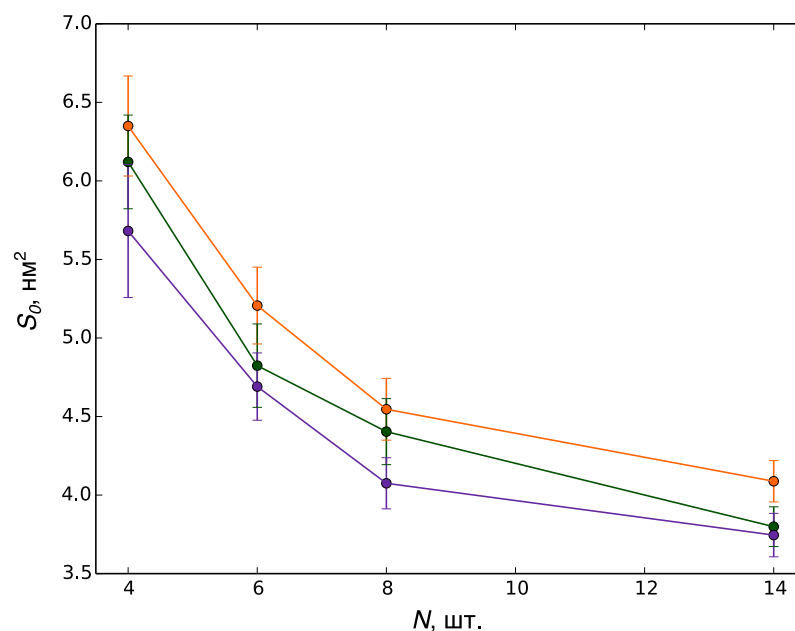


Рис. 4.17: Площадь экспонированной в раствор гидрофобной части ЛПС, приходящейся на одну молекулу агрегата (S_1) как функция количества молекул в структуре агрегата (N). Оранжевая линия — Re-LPS, зеленая линия — Ra-LPS, фиолетовая линия — O3-LPS.

Хорошо видно, что площадь S_1 убывает с увеличением числа молекул, входящих в состав мицеллы. Более того, площадь контактирующей с раствором гидрофобной части ожидаемо снижается с увеличением углеводной составляющей молекул ЛПС. Тем не менее, для всех полученных агрегатов ее величина достаточно велика, что, видимо, свидетельствует о том, что рассматриваемые молекулы склонны формировать агрегаты, содержащие большее количество молекул, чем может быть исследовано в рамках МД моделирования.

Наблюдения за поведением модельных систем также позволяет нам сделать предположение, что рассмотренные ЛПС склонны формировать ламеллярные фазы, причем устойчивость их структуры должна зависеть от состава молекул. В самом деле, добавление центрального олигосахарида в состав ЛПС ведет к возникновению дополнительных межмолекулярных взаимодействий, вытягивающих структуру отдельных молекул и повышающих степень упорядоченности ацильных цепей. В то время как этот эффект замечен уже для систем минимального размера (рис. 4.16 В,Е), при увеличении числа молекул в мицелле он становится еще более выраженным (рис. 4.16 К).

Добавление О-антигенов в состав молекул может, в свою очередь, еще больше стабилизировать структуру агрегата. Для мицелл маленького размера большая площадь липидной части по отношению к общей площади мицеллы ведет к тому, что в МД расчетах часть О-антигенных цепей приходит в контакт с липидом А и фиксируется в этом положении

за счет водородных связей и ван-дер-ваальсовых контактов (рис. 4.16 C,F). В то же время, для систем большего размера О-антигенные цепи взаимодействуют друг с другом, слипаясь попарно (рис. 4.16 I,L). Для одного из агрегатов мы также наблюдали слипание четырех О-антигенных цепей и формирование квази-стабильной бислоеподобной структуры (рис. 4.16 I).

6 Модели фрагмента внешней мембраны

Следующим этапом наших исследований было создание молекулярных моделей фрагмента наружной мембраны грамотрицательной бактерии. В силу сложности и гетерогенности ее структуры, атомистический подход МД не позволяет учесть все разнообразие молекул, представленных в реальной мембране. В нашем исследовании мы сосредоточились на реалистичном воспроизведении укладки О-антигенных цепей на поверхности мембраны.

6.1 Модели R-LPS бислоев

Предварительным этапом при создании моделей ЛПС-мембран, включающих полноразмерные молекулы S-LPS, была разработка моделей R-LPS бислоев. Мы использовали силовое поле OPLS-AA, дополненное рассчитанными *ab initio* параметрами (раздел 3), для полярных головок. Для ацильных цепей липида А использовались параметры, валидированные в расчетах фосфолипидных бислоев (раздел 2). Протоколы расчетов приведены в разделе 1.3.3 главы 2.

В первую очередь, нами была проведена серия уравнивающих расчетов для симметричного Re-LPS/Re-LPS бислоя, состоящего из наиболее коротких фрагментов ЛПС (рис. 4.1). Результирующая структура бислоя представлена на рис. 4.18 А. Равновесная площадь на липид составила $\sim 150 \text{ \AA}^2$, что соответствует ранее полученным данным по МД расчетам ЛПС бислоев [218].

Далее, в структуру каждого ЛПС был добавлен центральный олигосахарид (зеленый цвет на рис. 4.18 В), и полученный Ra-LPS/Ra-LPS бислой был вновь уравновешен при температуре 300 К. Результирующая площадь осталась почти такой же, как и для бислоя из Re-LPS ($\sim 152 \text{ \AA}^2$). Полученная уравновешенная структура была использована нами для создания моделей мембран из полноразмерного S-LPS.

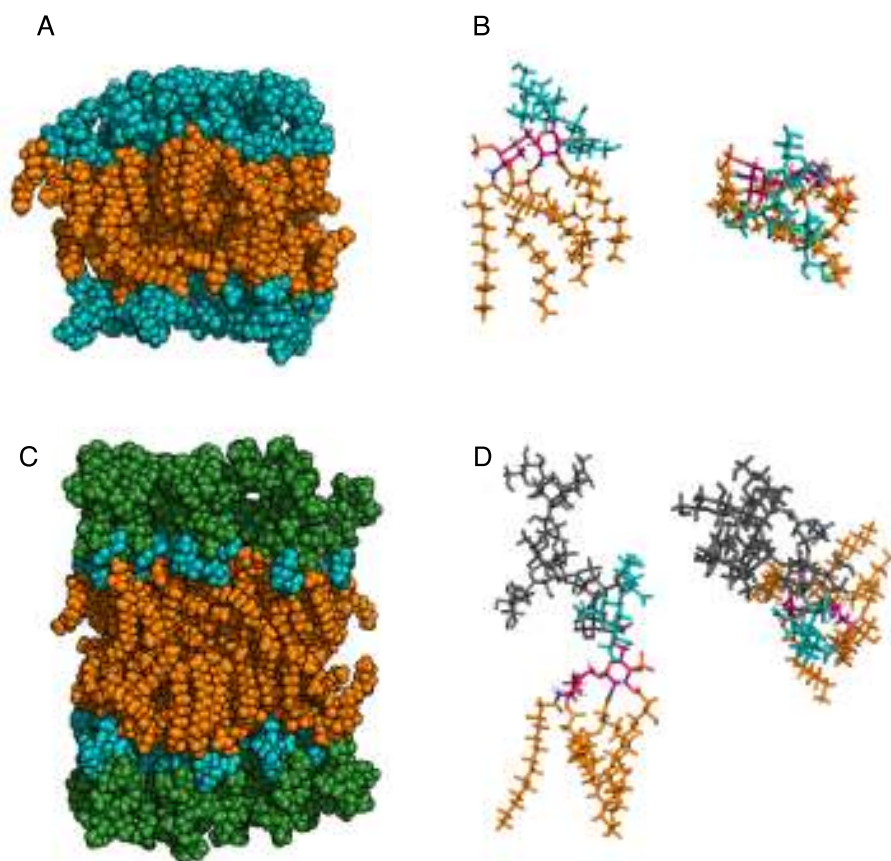


Рис. 4.18: Финальная структура модели симметричных бислоев Re- (A) и Ra-LPS (C) после 500 нс уравнивающих расчетов. Оранжевым цветом покрашена гидрофобная часть бислоя, голубой цвет соответствует внутреннему ядру, зеленый цвет — внешнему ядру (см. рис. 4.1). B, D — вид сбоку и сверху на произвольно выбранные молекулы из уравновешенных бислоев. Оранжевым покрашены ацильные цепи, розовым — полярные головки липидов, голубой — остатки Kdo, серый — остальная часть центрального олигосахарида.

Как было впервые отмечено в работе [25], увеличение углеводной части ЛПС ведет к вытягиванию структуры молекулы. Мы наблюдаем этот эффект для Ra- и Re-LPS мембран. Остатки Kdo связываются друг с другом и полярными головками липида A, и их положение оказывается ближе к параллели с плоскостью мембраны в Re-LPS бислое (рис. 4.18 B), по сравнению с Ra-LPS бислоем (рис. 4.18 D). Добавление полноразмерного центрального олигосахарида создает дополнительную силу, которая вытягивает остатки Kdo в направлении от поверхности мембраны (рис. 4.18 D). Отметим, что процесс вытягивания структуры Kdo носит энтропийный характер: крупный олигосахарид оказывается подвержен броуновским флуктуациям преимущественно в нормальном направлении по отношению к мембране, поскольку в тангенциальном направлении его движения ограничены соседними цепями.

6.2 Модели S-LPS мембран

Как было показано ранее [25], плотность упаковки О-антигенных цепей может существенно влиять на их подвижность. В нашей работе мы создали две модели наружной мембраны, в каждой из которых полноразмерные ЛПС занимали половину площади в проекции на плоскость мембраны, что близко к экспериментальным оценкам [168]. Первая модель представляла собой чистый ЛПС бислоем, один из монослоев которого состоял из Ra-LPS, в то время как половина молекул второго монослоя несла на себе О-антиген (рис. 4.19 А). Вторая модель представляла собой бислой Ra-LPS/S-LPS, пронизанный молекулами белка OmpA (рис. 4.19 В). В качестве стартовой конформации О-антигенных цепей в каждой модели нами была взята структура, полученная в разделе 1.2.1. Мы рассматривали О-антигены длиной 12 звеньев, S-LPS такого типа мы далее называем O12-LPS. Для обеих моделей были проведены МД расчеты, детали которых подробно описаны в разделе 1.3.5 главы 2.

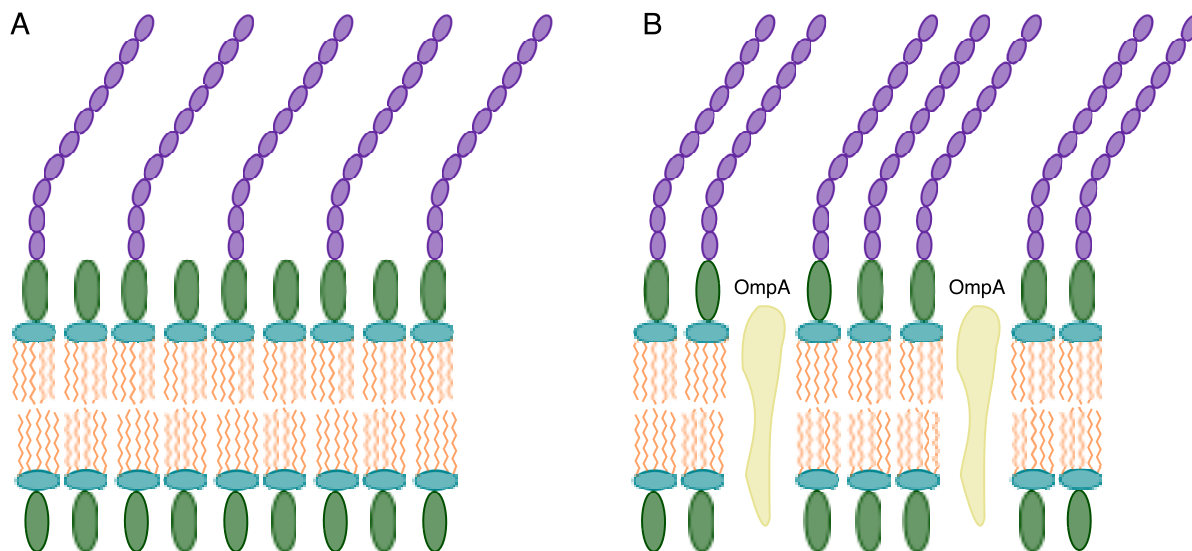


Рис. 4.19: Схематическое изображение двух моделей фрагмента наружной мембраны, рассмотренных в работе.

6.3 Общая структура мембран

Финальные структуры ЛПС-содержащих бислоев, полученные после более 500 нс МД расчета представлены на рис. 4.20. Толщина гидрофобной области бислоя, рассчитанная как среднее расстояние между вторыми атомами ацильных цепей в разных монослоях за последние 50 нс траектории, для обеих моделей очень стабильна и равна 35.3 ± 0.1 Å. Толщина зоны полярных головок липида А составляет 4.90 ± 0.05 Å для Ra-LPS и 5.70 ± 0.03 Å для O12-LPS. Толщина слоя центрального олигосахарида также больше для O12-LPS, чем для Ra-LPS (16.2 ± 0.2 Å).

вместо $14.0 \pm 0.2 \text{ \AA}$) за счет вытягивания молекулярной структуры под влиянием длинных цепей О-антигена [25]. Толщина слоя О-антигенов в среднем составляет $44.3 \pm 0.6 \text{ \AA}$ для белок-содержащей мембраны и $40.2 \pm 0.5 \text{ \AA}$ для чистой ЛПС-мембраны.

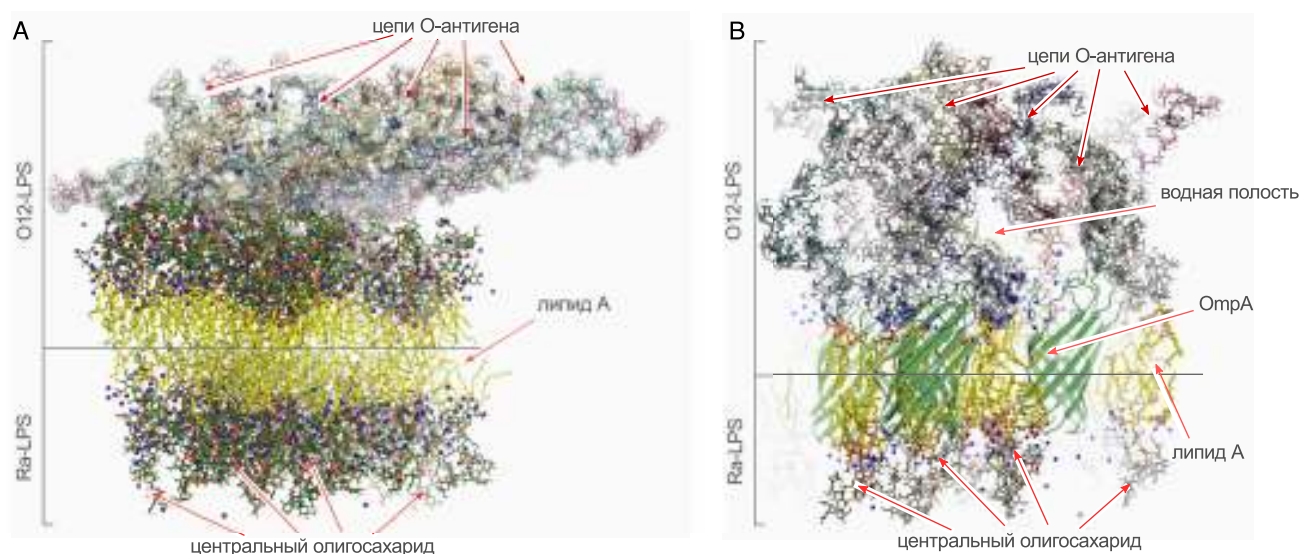


Рис. 4.20: Финальная структура модели бактериальной мембраны Ra-LPS/Ra-LPS & O12-LPS (A) и мембраны Ra-LPS/O12-LPS/OmpA после 500 нс уравнивающих МД расчетов. В чистой мембране О-антигенные цепи образуют плотный равномерный слой над поверхностью мембраны (A), в белок-содержащей модели О-антигенные цепи запутаны, образуя заполненные водой полости над белковыми глобулами (B).

Структура молекулы OmpA оказывается достаточно стабильна в мембранном окружении, но отличается от кристаллической структуры. RMSD, рассчитанный для C_α -атомов всех молекул OmpA по последним 50 нс траектории по отношению к кристаллической структуре, составляет $4.0 \pm 0.9 \text{ \AA}$. Такое большое значение RMSD неудивительно, поскольку условия кристаллизации белка значительно отличаются от моделируемого окружения. Кроме того, очень высока подвижность неструктурированных петель, где суммарное смещение (RMSD) атомов может достигать 1 нм, тогда как смещение атомов β -бечонка составляет около $1.5 \text{ \AA}$. В то же время, RMSD, рассчитанный по отношению к новому, адаптированному к мембранному окружению состоянию, равен $0.77 \pm 0.09 \text{ \AA}$, что означает, что структура белка стабильна в новом состоянии. Для оценки подвижности белка мы рассматривали динамику каждой из восьми молекул OmpA в модельном бислое. Центральная полость β -бечонков белков OmpA в среднем содержит около 100 молекул воды, которые преимущественно распределены вблизи наружной поверхности мембраны (рис. 4.20 B).

Отметим, что наличие молекул белка в модельной мембране существенно влияет на подвижность липидов. В то время как симметричный ЛПС-бислоем *E. coli*, “расплавился” в ходе расчетов в предыдущей модельной работе [25], мы не наблюдали этого эффекта в наших расчетах. Коэффициент латеральной диффузии (D) для Ra-LPS в наших расчетах составлял около 10^{-9} см²/с, и $D < 2 \cdot 10^{-10}$ см²/с для O12-LPS и не может быть точно вычислен для 1 мкс траектории. Полученные оценки коэффициентов диффузии заметно ниже экспериментально измеренных коэффициентов диффузии простых фосфолипидов [291], что связано как с относительно большой массой ЛПС, так и с латеральным взаимодействием длинных цепочек О-антигена. Кроме того, на коэффициент диффузии липидов оказывает влияние присутствие относительно большого количества белка в нашей модели. Молекулы OmpA, в свою очередь, демонстрируют еще более низкую подвижность ($D < 3 \cdot 10^{-11}$ см²/с), которая в целом согласуется с обычными значениями для коэффициента диффузии интегральных белков [291]. Ранее было показано, что низкая подвижность ЛПС также связана с сильным взаимодействием отрицательно заряженных фосфатных и карбоксильных групп в основной части ЛПС с двухвалентными катионами, в первую очередь, с Ca^{2+} [25, 26]. В настоящем исследовании мы не включали ионы кальция в модельные системы для того, чтобы повысить мобильность молекул ЛПС для эффективного сканирования конформационного пространства.

Влияние белковых глобул на структуру липидного бислоя было ранее исследовано в ходе моделирования наружной мембраны *E. coli* [26]. В то время как толщина гидрофобного бислоя для симметричной ЛПС-мембраны довольно однородна (21–22 Å [25]), то толщина гидрофобного слоя в мембране, содержащей белок, снижается в непосредственной близости от белковой глобулы [26]. Толщина чистого асимметричного бислоя (PE:PG)/Ra-LPS, на удалении от интегральных белков, составляет около 25 Å, тогда как толщина гидрофобного бислоя вблизи белка составляет около 20 Å [26]. Мы не наблюдали такого эффекта в наших расчетах, что можно объяснить другим соотношением белок/ЛПС в нашей модели. Вместо одного β -бочонка крупного белка OmpLA в довольно большом фрагменте очень стабильного липидного бислоя (PE:PG)/Ra-LPS ($\sim 9 \times 9$ нм) [26], мы использовали восемь копий немного меньших по размеру белков, встроенных в фрагмент мембраны с общими размерами 8.8×9.4 нм, что отражает соотношение площади ЛПС/белок в реальных бактериальных мембранах [168].

6.3.1 Конформация О-антигенов в мембранном окружении

За время расчетов структура цепей О-антигенов существенно изменяется. Прежде всего, общая длина цепи уменьшается из-за процесса запутывания и разрушения начальной спиральной структуры, которая оказывается энтропийно неустойчивой в мембранном окружении так же, как это было в растворе с одиночной цепочкой (раздел 1.2.2). Из анализа конформаций цепочек О-антигенов в представлении (φ, ψ) (рис. 4.21) хорошо видно, что основным процессом, способствующим изломам цепи в обеих моделях, как и в случае одиночной молекулы (рис. 4.11), является переход в *анти- ψ* состояние связей *ManRha*. Карты заселенности (φ, ψ) состояний в случае чистой S-LPS-мембраны (рис. 4.21 А–С) схожи с картами для свободной цепи О-антигена в растворе, однако мы дополнительно наблюдаем несколько переходов в *анти- ψ* состояние связей *RhaGal* (рис. 4.21 С), не покидающей бассейна глобального минимума в случае одиночной цепи, и имеющей достаточно низкую энергию в вакуумных расчетах для дисахаридов (рис. 4.3 С). Отличия поведения О-антигенов в мембране, содержащей белок, от поведения свободного О-антигена еще более существенны. Большинство связей *GalMan* в мембранном окружении занимают положение, соответствующее локальному минимуму *LL* (рис. 4.21 D), вместо глобально энергетически выгодной конформации *LR* (рис. 4.2 А). Достаточно высокая степень заселенности *анти- ψ* состояния связи *ManRha* (рис. 4.21 E) свидетельствует о наличии множественных изломов цепи. Пиранозные кольца в чистой ЛПС-мембране, в свою очередь, демонстрируют уровень подвижности, схожий с подвижностью колец в расчетах свободного О-антигена в растворе (рис. 4.22 А–С, 4.11 D–F). В то же время, переход *GalMan* связи в альтернативное энергетически выгодное состояние ведет к тому, что кольцо маннозы в расчетах для мембраны, содержащей белок, преимущественно находится в конформации твист (рис. 4.22 E), что отличается от поведения цепи в растворе.

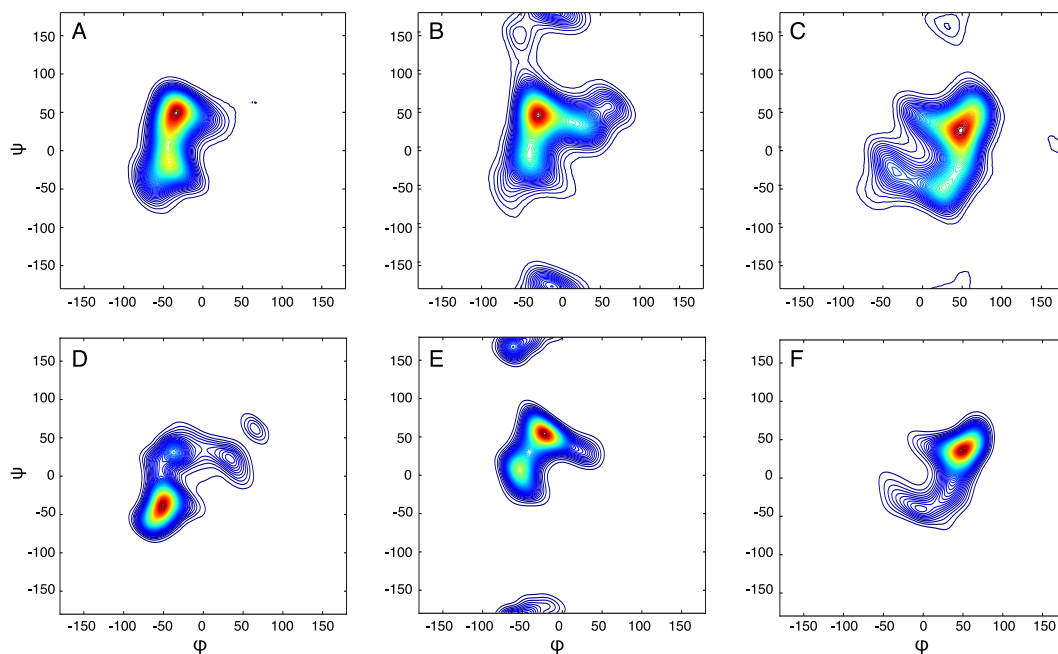


Рис. 4.21: Карты заселенности конформаций О-гликозидных связей О-антигена в МД расчетах для модели чистой ЛПС-мембраны (верхний ряд), и модели мембраны, содержащей белок (нижний ряд).

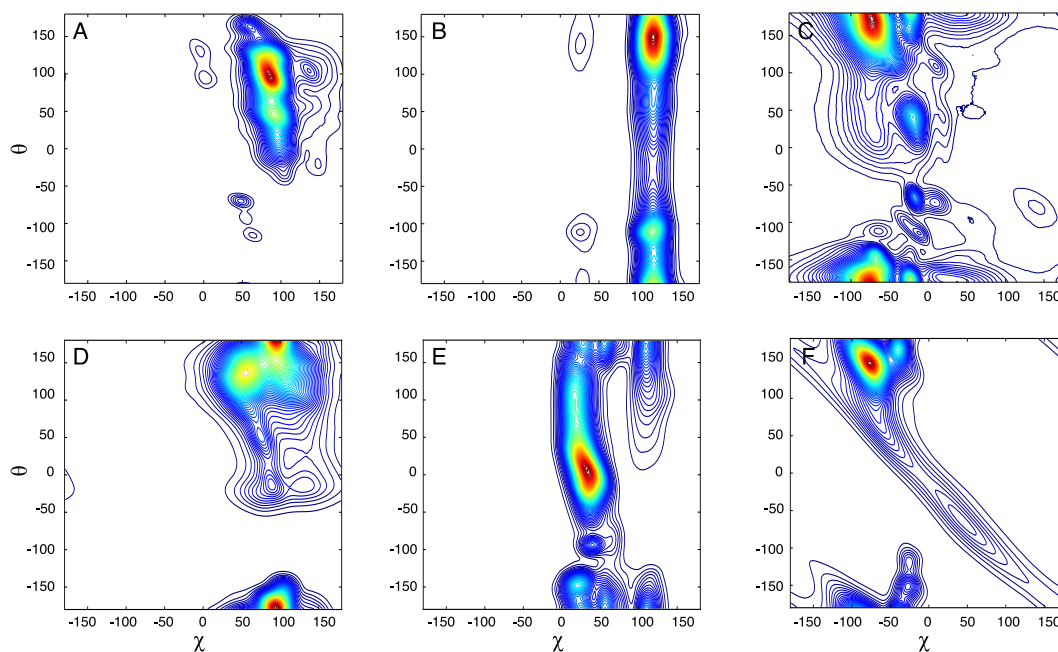


Рис. 4.22: Карты заселенности конформаций О-гликозидных связей О-антигена в МД расчетах для модели чистой ЛПС-мембраны (верхний ряд), и модели мембраны, содержащий белок (нижний ряд).

Различия в конформационной подвижности О-антигенных цепей в двух моделях мем-

браны обусловлены различиями в их окружении. Равномерно распределенные цепи в чистой ЛПС-мембране взаимодействуют попарно и слипаются друг с другом, сохраняя относительно вытянутую конформацию. Результирующий слой О-антигенов на поверхности мембраны имеет относительно однородную структуру (рис. 4.20 А) и высокую плотность. Наличие молекул белков в ЛПС-бислое, в свою очередь, ведет к образованию неравномерно распределенных полостей между О-антиген-несущими молекулами ЛПС. Таким образом, в белок-содержащей модели О-антигены демонстрируют существенно более сложное поведение, чем в чистой мембране. О-антигены активно взаимодействуют друг с другом, образуют множественные шпильки за счет переходов в О-гликозидных связях и изменениях в конформациях колец, запутываясь друг с другом. В результате таких сложных взаимодействий, О-антигены укладываются на поверхности мембраны, образуя крайне гетерогенную структуру. В частности, над молекулами белков образуются водные полости размером порядка 1 нм^3 , разделенные областями пространства, занятыми плотно переплетенными цепочками О-антигена.

Разница в поведении О-антигенных цепей в зависимости от окружения также хорошо видна при оценке подвижности различных фрагментов цепи (рис. 4.23). В обеих моделях мы наблюдаем относительно высокую подвижность углеводных остатков со средними отклонениями 2–3 нм за одну наносекунду. В предыдущих модельных исследованиях чистых ЛПС-бислоев [25] авторы наблюдали увеличение подвижности для наиболее удаленных от мембраны повторяющихся звеньев (4–5 нм вместо 2–3 нм для остальной цепи [25]). Однако, мы не наблюдаем такого эффекта для нашей модели чистой ЛПС мембраны (рис. 4.23 А). Увеличение подвижности терминальных звеньев цепи О-антигена также наблюдалось при расчетах динамики мембраны, содержащей белок, для более коротких О-антигенов (5 RU) [27]. В нашей модели мы наблюдаем другой интересный эффект: наименьшую подвижность во всей цепи демонстрирует ее медиальная часть, что указывает на запутывание цепей за счет взаимодействия в районе 4–7-го повторяющихся звеньев. Такое переплетение можно наблюдать только для достаточно длинных О-антигенных цепей и только тогда, когда белки включены в ЛПС-бислой и, таким образом, не были обнаружены ни при моделировании чистых ЛПС-бислоев [26], ни при расчетах для белок-содержащих мембран с малой длиной О-антигенов [27].

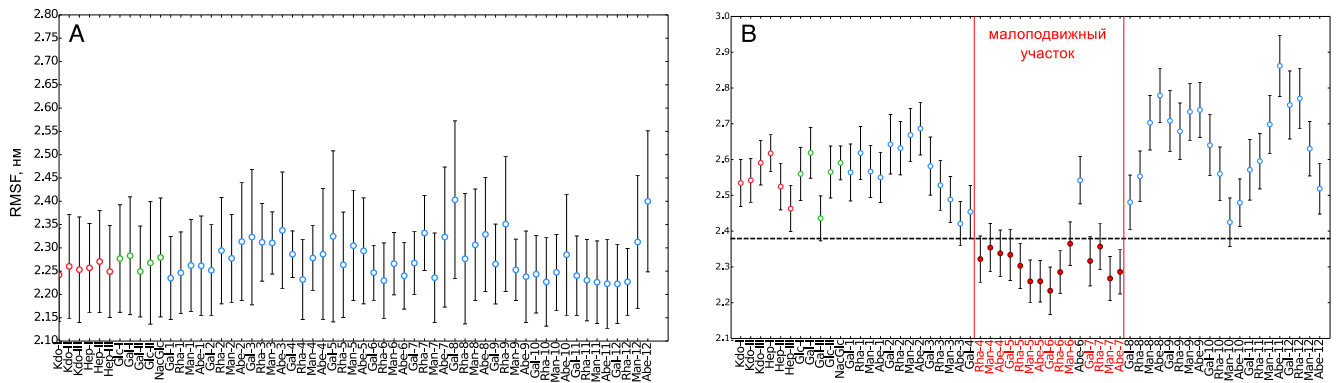


Рис. 4.23: Среднеквадратическое отклонение, рассчитанное для разных фрагментов О-антигенной цепи (RMSF), в чистой (А) и белок-содержащей (В) моделях мембраны. RMSF рассчитаны для фрагментов траекторий длиной в 1 нс. Красным цветом отмечена область низкой подвижности.

Многочисленные локальные конформационные изменения, ведущие к полному разупорядочиванию структуры цепей О-антигенов, означают, что начальная спиральная конформация является энтропийно невыгодной. Действительно, эксперименты ЯМР показывают, что в растворе короткие пентасахариды спонтанно образуют спиральные структуры [29], в то время как такие структуры никогда не наблюдались в модельных мембранах [25] и не обнаружены для длинных цепочек.

6.4 Влияние арабинозы на структуру мембраны

В предыдущем разделе мы рассмотрели различные сценарии укладки полисахаридных цепочек ЛПС в мембранном окружении в зависимости от распределения О-антигенных цепочек на поверхности мембраны. При равных значениях среднего значения доступного объема на одну цепь О-антигена, равномерно распределенные цепи в модели чистого ЛПС-бислоя и неоднородно распределенные цепи в белок-содержащей модели демонстрируют качественно разное конформационное поведение. В то же время, величина доступного объема для отдельных цепей О-антигена может меняться при изменении химического строения молекул ЛПС. В данном разделе будет рассмотрено влияние модификаций структуры липидной части ЛПС на структуру бислоя.

Известно [167], что в состав липида А бактерий родов *Salmonella* и *Escherichia* может входить 4-амино-L-арабиноза (Ara4N), либо фосфоэтаноламин, присоединенные к одному из боковых фосфатов. Наличие таких модификаций клинически значимо, так как положитель-

но заряженный остаток Ara4N, частично нейтрализует отрицательный заряд липида А и центрального олигосахарида, тем самым снижая восприимчивость бактерии к катионным антимикробным пептидам и полимиксину [292]. В частности, мутанты *S. typhimurium*, мембраны которых содержат ЛПС, несущие Ara4N в достаточном количестве, устойчивы к воздействию полимиксина [293]. В нашей лаборатории проводилась экспериментальная работа с коммерчески доступным Re-LPS бактерии *S. typhimurium* штамма R595, которая позволила определить, насколько распространены липиды, содержащих Ara4N в суммарной фракции бактериального липида А. Коллегами Е.Г. Холиной, А.М. Нестеренко и М.В. Серебряковой были получены и проанализированы данные масс-спектрометрии соответствующих образцов (рис. 4.24). Используя молекулярный редактор Rummol, на основании литературных данных о существующей структуре молекул ЛПС Re-мутантов были построены различные варианты структур с различной длиной ацильных цепей.

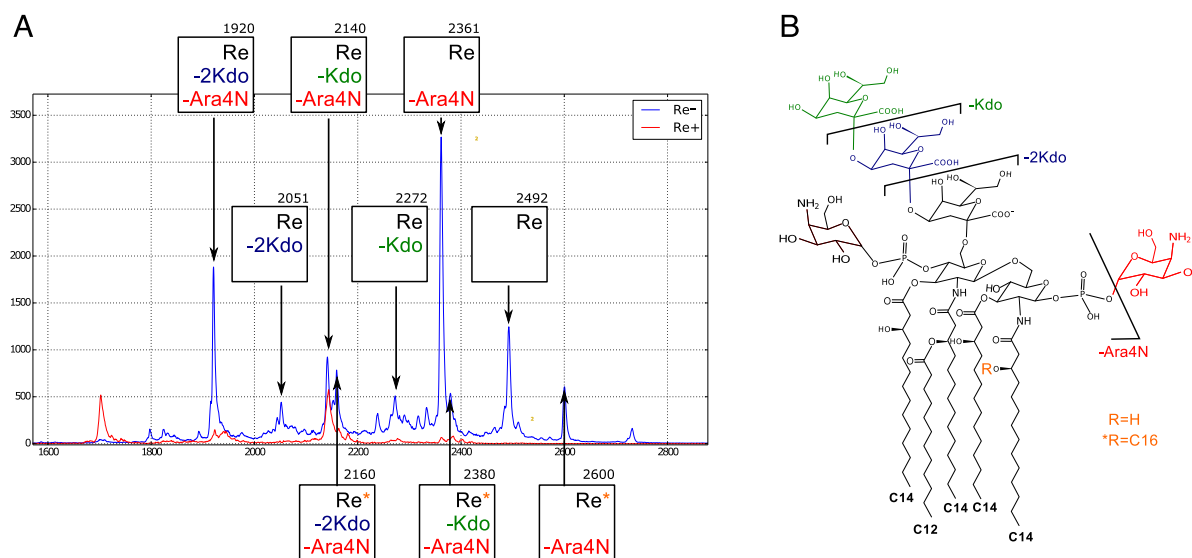


Рис. 4.24: Данные масс-спектрометрии в режиме регистрации катионов (красный спектр) и анионов (синий спектр) для липополисахарида *S. typhimurium* R595 (А). Структуры, соответствующие подписям на пиках, изображены справа (В). Масс спектры были получены с помощью метода матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации в линейном режиме с точностью около 1 Да на приборе ЦКП МГУ (MALDI TOF/TOF, Bruker Daltonics), расположенного в НИИФХБ МГУ.

Как следствие частичной деградации молекулы во время ионизации, в спектре присутствует множество “осколков” целой молекулы, содержащие разное количество остатков Kdo и Ara4N, и пять остатков жирных кислот. Однако, в спектре присутствуют и фрагменты с двумя остатками Ara4N, что указывает на то, что молекулы с двумя остатками Ara4N

присутствовали в исходном пуле в достаточном количестве. С другой стороны, в спектре не обнаружено пиков, соответствующих молекулам, вовсе не несущим Ara4N. Таким образом, мы ожидаем, что в реальной мембране могут встретиться липиды с одним или двумя остатками Ara4N на молекулу ЛПС.

Присоединение остатков Ara4N происходит по остаткам фосфорной кислоты, замещающим свободные 1'- и 4'-гидроксилы остатков глюкозы липида А (рис. 4.24). Таким образом, эти остатки располагаются в непосредственной близости от гидрофобной области бислоя и в одной плоскости с остатками глюкозы липида А. Благодаря такому расположению, Ara4N потенциально способны увеличивать проекционную площадь липида А и, как следствие, среднюю площадь полноразмерных ЛПС в проекции на плоскость мембраны. Для проверки этих предположений мы построили две модели симметричных Re-LPS бислоев, состоящих из молекул, несущих один и два остатка Ara4N в составе липида А (размер систем составлял 16 молекул на монослой), и сравнили их ArL с таковой для безарабинозного Re-LPS бислоя, рассмотренного в разделе 6.1 (рис. 4.25). Для каждой модели Re-LPS бислоя были проведены 500 нс релаксационные расчеты МД, в ходе которых площадь рассматриваемых фрагментов достигла стабильных значений. При этом, для Ara4N-содержащих мембран ArL оказалась существенно выше, чем для мембран, состоящих из ЛПС без арабинозы (рис. 4.25 D). Так, площадь Re-LPS мембраны, не содержащей Ara4N, составила $150.6 \pm 2.4 \text{ \AA}^2$, в то время как добавление одного остатка Ara4N увеличило этот показатель до $172.5 \pm 1.6 \text{ \AA}^2$, а второго — до $180.4 \pm 1.6 \text{ \AA}^2$.

Отметим, что наблюдаемый эффект не был зарегистрирован при моделировании аналогичных по составу мембран в более ранней работе Kim et al. [218]. Это, по-видимому, связано с тем, что авторы работы полагали, что липид А штаммов *Salmonella* по умолчанию несет 7 ацильных цепей, в то время как для рассмотренного нами штамма данные масс-спектрометрии указывают на присутствие 5 или 6 ацильных цепей в составе липида А (рис. 4.24). ArL модельных бислоев из работы [218] оказалась нечувствительной к присутствию остатков арабинозы (176.2 ± 1.2 и $178.0 \pm 0.9 \text{ \AA}^2$ для безарабинозной и несущей два остатка Ara4N на липид, соответственно). Таким образом, влияние структуры полярной головки, вероятно, наиболее выражено для липидов с меньшим объемом гидрофобной части молекулы липида А.

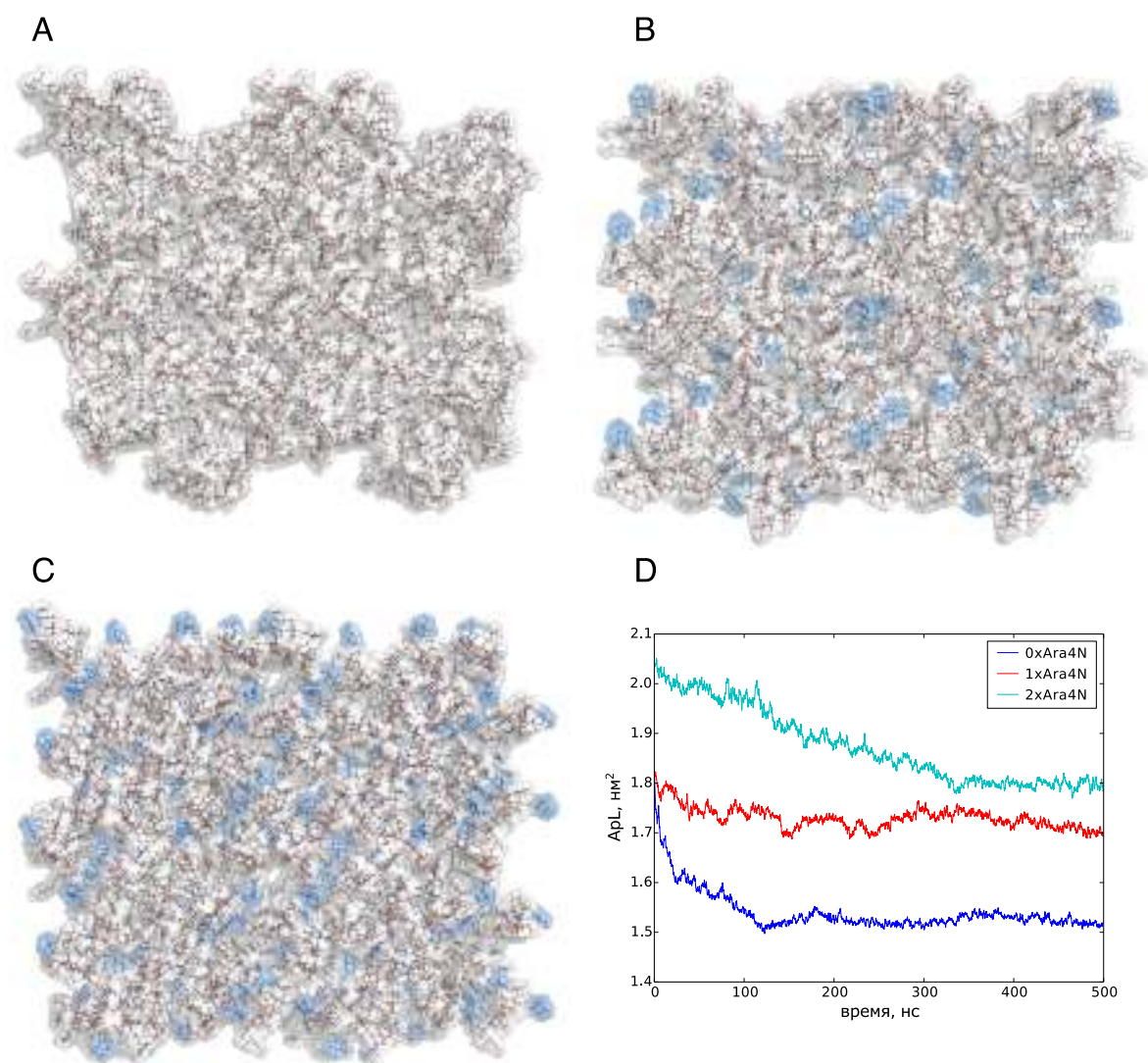


Рис. 4.25: Структура поверхности мембраны Re-LPS/Re-LPS, рассмотренной в разделе 6.1 (A), а также Re-LPS/Re-LPS бислоев, содержащих в составе липида A один (B) и два (C) остатка Ara4N, и также значения ArL для трех структур (D). Остатки Ara4N выделены голубым цветом.

Из результатов моделирования следует, что цепи O-антигена в Ara4N-содержащих мембранах должны быть распределены более разреженно, а их упаковка должна быть менее плотной. Открытым остается вопрос о том, при какой степени равномерного разрежения в расположении O-антигенов на поверхности мембраны происходит качественный переход между двумя типами упаковки цепочек: плотным слоем единообразно сложенных наклоненных и вытянутых O-антигенов, наблюдаемый в модели чистой ЛПС-мембраны (рис. 4.20 A), и гетерогенного слоя переплетенных цепей, полученного в модели белок-содержащей мембраны (рис. 4.20 B). Исследованию этого вопроса будут посвящены наши будущие модельные работы по моделированию гладких ЛПС-мембран с разным содержанием остатков Ara4N.

Заключение

В ходе выполнения диссертационной работы были получены следующие **основные результаты** и сделаны следующие **выводы**:

1. В реакционно-диффузионной модели основных реакций каскада свертывания были получены аналитические условия существования автоволновых решений, а также решений стационарной системы типа пульс, определяющих достаточное условие начала распространения автоволны концентрации тромбина в ответ на возмущение системы. Таким образом, критическая для начала роста тромба концентрация тромбина, образованная в ответ на активацию внешнего или внутреннего пути, может быть оценена как решение типа пульс для модели основных реакций каскада свертывания.
2. Получены аналитические оценки скорости распространения автоволновых решений реакционно-диффузионной модели основных реакций каскада свертывания. Таким образом, скорость роста тромба в рассматриваемой модели может быть приближенно вычислена через значения параметров системы до проведения модельных расчетов.
3. В численном эксперименте для упрощенной модели образования тромба в венуле диаметром 50 мкм оценен критический размер зоны повреждения на стенке сосуда (~ 50 – 90 мкм), ведущий к закупорке сосуда при запуске внешнего пути каскада свертывания крови. Повреждения такого размера при сепсисе может соответствовать откреплению одного эндотелиоцита в результате взаимодействия с ЛПС.
4. Разработана кинетическая модель активации контактного пути ЛПС-агрегатами, воспроизводящая доступные экспериментальные данные *in vitro*. Показано, что немонотонная зависимость степени активации контактной системы от концентрации ЛПС (максимальная активность при концентрации ЛПС ~ 20 мкМ) обусловлена агрегатным состоянием ЛПС в растворе. Таким образом, надмолекулярная структура ЛПС должна оказывать существенное влияние на активацию внутреннего пути каскада свертывания крови.

5. Созданы полноатомные модели молекул Re-, Ra и S-LPS на базе силового поля OPLS-AA с использованием разработанной в нашей группе программы **TrpMkTop**. Недостающие силовые параметры были рассчитаны с использованием методов *ab initio*. Силовые параметры ацильных цепей валидированы в уравнивающих расчетах бислоев из простых липидов с известной равновесий площадью на липид.
6. Проведена серия МД расчетов для длинной цепи О-антигена (12 RU) в растворе. В ходе расчетов показано, что переходы клубок-глобула для длинной цепи обратимы в поле OPLS-AA (время жизни 10–40 нс) и необратимы в поле GLYCAM, что делает OPLS-AA предпочтительным силовым полем для моделирования S-LPS.
7. В МД расчетах показано, что основным событием, ведущим к компактизации О-антигена *S. typhimurium* как в растворе, так и в мембранном кружении, является переход в *анти-ψ* состояние О-гликозидной связи между остатками маннозы и рамнозы. Для компактизации цепи в растворе достаточно перехода $\sim 3\%$ связей). Повышенная заселенность этой конформации, по-видимому, носит энтропийную природу и обусловлена структурой восстановленного остатка рамнозы.
8. Созданы МД модели мицелл, состоящих из 4, 6, 8 и 14 молекул Re-, Ra- и O3-LPS, и показано, что увеличение длины углеводной части ЛПС в их составе ведет к стабилизации структуры за счет взаимодействия О-антигенных цепочек друг с другом. Показано, что увеличение количества молекул в составе мицеллы ведет к снижению площади гидрофобной поверхности, экспонированной в раствор. Структура полученных агрегатов позволяет сделать предположение, что рассматриваемые ЛПС *S. typhimurium* склонны формировать ламеллярные структуры в растворе.
9. Построено две МД модели S-LPS мембран и показано, что структура О-антигенного слоя на их поверхности существенно зависит не только от среднего значения доступного объема, приходящегося на одну цепь, но и от равномерности распределения О-антигенных цепей в начальный момент времени. Длинные цепи О-антигена в чистой ЛПС мембране образуют плотный слой, взаимодействуя друг с другом преимущественно в вытянутом состоянии. В то же время, в белок-содержащей мембране происходит переплетение цепей О-антигена и формируется сложная гетерогенная структура с заполненными водой полостями с характерным размером $\sim 1\text{ нм}^3$, причем запутывание О-антигенов на поверхности мембраны происходит за счет взаимодействия их центральных частей.

10. Сконструированы три МД модели симметричных Re-LPS бислоев, состоящих из молекул, несущих два, один и ни одного остатка Aga4N в составе липида А. Показано, что добавление Aga4N в состав ЛПС с небольшим размером гидрофобной части, ведет к увеличению равновесной площади, приходящейся на один липид (до 1.2 раза). Таким образом, модификации липида А влияют на плотность упаковки О-антигенных цепей на поверхности мембраны.

Полученные теоретические результаты для математической модели каскада свертывания крови могут быть далее использованы для оценки величины критического возмущения системы при численном моделировании более сложных систем, в частности, при активации системы свертывания липополисахаридами. Построенная нами модель образования тромба в ответ на повреждение стенки сосуда может также быть использована для разработки более детальных моделей тромбообразования, учитывающих роль активированных тромбоцитов в процессе формирования сгустка. Модели такого типа могут быть также использованы для моделирования образования сгустка в ответ на попадание в кровь ЛПС или иных веществ, повреждающих эндотелиальный слой сосуда, при условии, что модель будет учитывать различные типы и величины повреждений. Модель активации контактного пути может быть, в свою очередь, в дальнейшем использована для оценки влияния различных концентраций и различного агрегатного состояния ЛПС на скорость свертывания плазмы.

Рассчитанные дополнительные параметры межатомных взаимодействий и разработанная программа по созданию молекулярных топологий **TrpMkTop** могут быть использованы для создания широкого спектра моделей молекул ЛПС различной химической структуры. Структура агрегатов, образуемых ЛПС, а также конформационная подвижность ЛПС в составе систем с различной геометрией, может быть смоделирована при помощи построенных МД моделей. Полученные в работе модели ЛПС-мембран и ЛПС-агрегатов могут быть использованы для моделирования их взаимодействия с различными антимикробными агентами, а также для анализа роли различных составляющих частей молекулы ЛПС как в формировании структуры агрегатов, так и в устойчивости соответствующих бактериальных штаммов.

Благодарности. Автор выражает благодарность своему научному руководителю, А.Б. Рубину, за постановку задач и внимание к работе. Автор горячо благодарит Дмитрия Зленко и Алексея Нестеренко за поддержку и помощь в работе и в подготовке диссертации, а также коллектив кафедры биофизики за создание благоприятной атмосферы для научных исследований.

Литература

- [1] Angus, D. C. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care / D. C. Angus, W. T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, et al. // Crit. Care Med. — 2001. — Vol. 29. — P. 1303–1310.
- [2] Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis / J. Cohen // Nature. — 2002. — Vol. 420, no. 6917. — P. 885–891.
- [3] Corinne, A. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study / A. Corinne, C. Brun-Buisson, H. Burchardi, et al. // Intensive Care Med. — 2002. — Vol. 28, no. 2. — P. 108–121.
- [4] Morganti, R. P. Mechanisms underlying the inhibitory effects of lipopolysaccharide on human platelet adhesion / R. P. Morganti, M. H. M. Cardoso, F. G. Pereira, et al. // Platelets. — 2010. — Vol. 21. — P. 260–269.
- [5] Zhang, G. Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway / G. Zhang, J. Han, E. J. Welch, et al. // J. Immunol. — 2009. — Vol. 182, no. 12. — P. 7997–8004.
- [6] Esmon, C. T. The interactions between inflammation and coagulation / C. T. Esmon // Br. J. Haematol. — 2005. — Vol. 131, no. 4. — P. 417–430.
- [7] Mooberry, M. J. Procoagulant microparticles promote coagulation in a factor XI-dependent manner in human endotoxemia / M. J. Mooberry, R. Bradford, E. L. Hobl, et al. // J. Thromb. Haemost. — 2016. — Vol. 14, no. 5. — P. 1031–1042.
- [8] Атауллаханов, Ф. И. Пространственные аспекты динамики свертывания крови. I. Гипотеза / Ф. И. Атауллаханов, Г. Т. Гурия // Биофизика. — 1994. — Т. 39, № 1. — С. 89–95.

- [9] Guria, K. Spatial aspects of blood coagulation: Two decades of research on the self-sustained traveling wave of thrombin / K. Guria, G. Guria // *Thromb. Res.* — 2015. — Vol. 135, no. 3. — P. 423–433.
- [10] Panteleev, M. A. Hemostasis and thrombosis beyond biochemistry: Roles of geometry, flow and diffusion / M. A. Panteleev, N. M. Dashkevich, F. I. Ataullakhanov // *Thromb. Res.* — 2015. — Vol. 136, no. 4. — P. 699–711.
- [11] Mann, K. G. Is there value in kinetic modeling of thrombin generation? Yes / K. G. Mann // *J. Thromb. Haemost.* — 2012. — Vol. 10, no. 8. — P. 1463–1469.
- [12] Hemker, H. C. Is there value in kinetic modeling of thrombin generation? No (unless...) / H. C. Hemker, S. Kerdelo, R. M. W. Kremers // *J. Thromb. Haemost.* — 2012. — Vol. 10, no. 8. — P. 1470–1477.
- [13] Ataullakhanov, F. I. Mathematical modeling and computer simulation in blood coagulation / F. I. Ataullakhanov, M. A. Panteleev // *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* — 2005. — Vol. 34. — P. 60–70.
- [14] Maas, C. Regulatory mechanisms of the plasma contact system / C. Maas, T. Renné // *Thromb. Res.* — 2012. — Vol. 129, no. SUPPL. 2. — P. S73–S76.
- [15] Frick, I.-M. The dual role of the contact system in bacterial disease / I.-M. Frick, L. Bjork, H. Herwald // *Thromb. Haemost.* — 2007. — Vol. 98, no. 2. — P. 497–502.
- [16] Nickel, K. F. Crosstalk of the plasma contact system with bacteria / K. F. Nickel, T. Renné // *Thromb. Res.* — 2012. — Vol. 130, no. SUPPL.1. — P. S78–S83.
- [17] Morrison, D. Direct evidence for Hageman factor (factor XII) activation by bacterial lipopolysaccharides (endotoxins) / D. Morrison, C. Cochrane // *J. Exp. Med.* — 1974. — Vol. 140. — P. 797–811.
- [18] Kalter, E. S. Activation of purified human plasma prekallikrein triggered by cell wall fractions of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* / E. S. Kalter, W. C. van Dijk, A. Timmerman, et al. // *J. Infect. Dis.* — 1983. — Vol. 148, no. 4. — P. 682–691.
- [19] Mueller, M. Aggregates are the biologically active units of endotoxin / M. Mueller, B. Lindner, S. Kusumoto, et al. // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Vol. 279, no. 25. — P. 26307–26313.

- [20] Bello, G. Characterization of the aggregates formed by various bacterial lipopolysaccharides in solution and upon interaction with antimicrobial peptides / G. Bello, J. Eriksson, A. Terry, et al. // *Langmuir*. — 2015. — Vol. 31, no. 2. — P. 741–751.
- [21] Sasaki, H. Aggregation behavior of an ultra-pure lipopolysaccharide that stimulates TLR-4 receptors / H. Sasaki, S. H. White // *Biophys. J.* — 2008. — Vol. 95, no. July. — P. 986–993.
- [22] Rietschel, E. T. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function / E. T. Rietschel, T. Kirikae, F. U. Schade, et al. // *FASEB J.* — 1994. — Vol. 8. — P. 217–225.
- [23] Zgurskaya, H. I. Permeability barrier of Gram-negative cell envelopes and approaches to bypass it / H. I. Zgurskaya, C. A. Lopez, S. Gnanakaran // *ACS Infect. Dis.* — 2015. — Vol. 1, no. 11. — P. 512–522.
- [24] Murray, G. L. Altering the length of the lipopolysaccharide O antigen has an impact on the interaction of *Salmonella enterica* serovar typhimurium with macrophages and complement / G. L. Murray, S. R. Attridge, R. Morona // *J. Bacteriol.* — 2006. — Vol. 188, no. 7. — P. 2735–2739.
- [25] Wu, E. L. Molecular dynamics and NMR spectroscopy studies of *E. coli* lipopolysaccharide structure and dynamics / E. L. Wu, O. Engström, S. Jo, et al. // *Biophys. J.* — 2013. — Vol. 105, no. 6. — P. 1444–1455.
- [26] Wu, E. L. *E. coli* outer membrane and interactions with OmpLA / E. L. Wu, P. J. Fleming, M. S. Yeom, et al. // *Biophys. J.* — 2014. — Vol. 106, no. 11. — P. 2493–2502.
- [27] Patel, D. S. Dynamics and interactions of OmpF and LPS: Influence on pore accessibility and ion permeability / D. S. Patel, S. Re, E. L. Wu, et al. // *Biophys. J.* — 2016. — Vol. 110, no. 4. — P. 930–938.
- [28] Kuttel, M. Comparative simulation of pneumococcal serogroup 19 polysaccharide repeating units with two carbohydrate force fields / M. Kuttel, M. Gordon, N. Ravenscroft // *Carbohydr. Res.* — 2014. — Vol. 390. — P. 20–27.
- [29] Clement, M.-J. Conformational studies of the O-specific polysaccharide of *Shigella flexneri* 5a and of four related synthetic pentasaccharide fragments using NMR and molecular mod-

- elling / M.-J. Clement, A. Imberty, A. Phalipon, et al. // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278, no. 48. — P. 47928–47936.
- [30] Kang, Y. Conformational diversity of O-antigen polysaccharides of the Gram-negative bacterium *Shigella flexneri* serotype Y / Y. Kang, S. Barbirz, R. Lipowsky, M. Santer // J. Phys. Chem. B. — 2014. — Vol. 118. — P. 2523–2534.
- [31] Blasco, P. Conformational dynamics of the lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O91 revealed by NMR spectroscopy and molecular simulations / P. Blasco, D. S. Patel, O. Engstrom, et al. // Biochemistry. — 2017. — Vol. 56, no. 29. — P. 3826–3839.
- [32] Galochkina, T. Conformational dynamics of the single lipopolysaccharide O-antigen in solution / T. Galochkina, D. Zlenko, A. Nesterenko, et al. // ChemPhysChem. — 2016. — Vol. 17, no. 18. — P. 2839–53.
- [33] Davie, E. W. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting / E. W. Davie, O. D. Ratnoff // Science. — 1964. — Vol. 145. — P. 1310–1312.
- [34] McFarlane, R. G. The basis of the cascade hypothesis of blood clotting / R. G. McFarlane // Thrombos. Diathes. Haemorrh. — 1966. — Vol. 15. — P. 591–602.
- [35] McFarlane, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier / R. G. McFarlane // Nature. — 1964. — Vol. 202, no. 498-499.
- [36] Sperling, C. Blood coagulation on biomaterials requires the combination of distinct activation processes / C. Sperling, M. Fischer, M. F. Maitz, C. Werner // Biomaterials. — 2009. — Vol. 30. — P. 4447–4456.
- [37] Атауллаханов, Ф. И. Пространственные аспекты динамики свертывания крови. II. Феноменологическая модель / Ф. И. Атауллаханов, Г. Т. Гурия, А. Ю. Сафрошкина // Биофизика. — 1994. — Т. 39, № 1. — С. 97–106.
- [38] Атауллаханов, Ф. И. Пространственные аспекты динамики свертывания крови. III. Рост тромба *in vitro* / Ф. И. Атауллаханов, Р. И. Волкова, Г. Т. Гурия, В. И. Сарбаш // Биофизика. — 1995. — Т. 40, № 6. — С. 1320–1328.
- [39] Ataulakhanov, F. I. Spatiotemporal dynamics of clotting and pattern formation in human blood / F. I. Ataulakhanov, G. T. Guria, V. I. Sarbash, R. I. Volkova // Biochim. Biophys. Acta. — 1998. — Vol. 1425, no. 3. — P. 453–468.

- [40] Ovanesov, M. V. Initiation and propagation of coagulation from tissue factor-bearing cell monolayers to plasma: initiator cells do not regulate spatial growth rate / M. V. Ovanesov, N. M. Ananyeva, M. A. Panteleev, et al. // J. Thromb. Haemost. — 2005. — Vol. 3. — P. 321–331.
- [41] Ovanesov, M. V. Hemophilia A and B are associated with abnormal spatial dynamics of clot growth / M. V. Ovanesov, J. V. Krasotkina, L. I. Ul'yanova, et al. // Biochim. Biophys. Acta — General Subjects / *Biophysica Acta - General Subjects*. — 2002. — Vol. 1572, no. 1. — P. 45–57.
- [42] Ovanesov, M. V. Effect of factor VIII on tissue factor-initiated spatial clot growth / M. V. Ovanesov, E. G. Lopatina, E. L. Saenko, et al. // Thromb. Haemost. — 2003. — Vol. 2. — P. 235–242.
- [43] Tokarev, A. Spatial dynamics of contact-activated fibrin clot formation in vitro and in silico in haemophilia B: effects of severity and ahemphil B treatment / A. Tokarev, Yu. Krasotkina, M. Ovanesov, et al. // Math. Model. Nat. Phenom. — 2006. — Vol. 1, no. 2. — P. 124–137.
- [44] Dashkevich, N. M. Thrombin activity propagates in space during blood coagulation as an excitation wave / N. M. Dashkevich, M. V. Ovanesov, A. N. Balandina, et al. // Biophys. J. — 2012. — Vol. 103, no. 10. — P. 2233–2240.
- [45] Kastrup, Ch. J. Characterization of the threshold response of initiation of blood clotting to stimulus patch size / Ch. J. Kastrup, F. Shen, M. K. Runyon, R. F. Ismagilov // Biophys. J. — 2007. — Vol. 93, no. 8. — P. 2969–2977.
- [46] Runyon, M. K. Propagation of blood clotting in the complex biochemical network of hemostasis is described by a simple mechanism / M. K. Runyon, B. L. Johnson-Kerner, Ch. J. Kastrup, et al. // J. Am. Chem. Soc. — 2007. — Vol. 129, no. 22. — P. 7014–7015.
- [47] Runyon, M. K. Effects of shear rate on propagation of blood clotting determined using microfluidics and numerical simulations / M. K. Runyon, Ch. J. Kastrup, B. L. Johnson-Kerner, et al. // J. Am. Chem. Soc. — 2008. — Vol. 130, no. 11. — P. 3458–3464.
- [48] Panteleev, M. A. Spatial propagation and localization of blood coagulation are regulated by intrinsic and protein C pathways, respectively / M. A. Panteleev, M. V. Ovanesov, D. A. Kireev, et al. // Biophys. J. — 2006. — Vol. 90, no. 5. — P. 1489–1500.

- [49] Hemker, H. C. Platelet membrane involvement in blood coagulation / H. C. Hemker, J. L. van Rijn, J. Rosing, et al. // *Blood cells*. — 1983. — Vol. 9, no. 2. — P. 303–317.
- [50] Monroe, D. M. Platelets and thrombin generation / D. M. Monroe, M. Hoffman, H. R. Roberts // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2002. — Vol. 22, no. 9. — P. 1381–1389.
- [51] Sinauridze, E. I. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific pro-coagulant activity than activated platelets / E. I. Sinauridze, D. A. Kireev, N. Y. Popenko, et al. // *Thromb. Haemost.* — 2007. — Vol. 97. — P. 425–434.
- [52] Bolton-Maggs, P. H. Inheritance and bleeding in factor XI deficiency / P. H. Bolton-Maggs, B. Young Wan-Yin, A. H. McCraw, et al. // *Br. J. Haematol.* — 1988. — Vol. 69. — P. 521–528.
- [53] Ragni, M. Comparison factor of bleeding tendency, factor XI coagulant activity, and factor XI antigen in 25 factor XI-deficient kindreds / M. Ragni, F. Sinha, F. Seaman, et al. // *Blood*. — 1985. — Vol. 65, no. 3. — P. 719–724.
- [54] Meijers, J. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis / J. Meijers, W. Tekelenburg, B. Bouma, et al. // *N. Engl. J. Med.* — 2000. — Vol. 342, no. 10. — P. 696–701.
- [55] Berliner, J. I. Elevated levels of Factor XI are associated with cardiovascular disease in women / J. I. Berliner, A. C. Rybicki, R. C. Kaplan, et al. // *Thromb. Res.* — 2002. — Vol. 107, no. 1-2. — P. 55–60.
- [56] Panteleev, M. A. Task-oriented modular decomposition of biological networks: trigger mechanism in blood coagulation / M. A. Panteleev, A. N. Balandina, E. N. Lipets, et al. // *Biophys. J.* — 2010. — Vol. 98, no. 9. — P. 1751–1761.
- [57] Dreyfus, M. Treatment of homozygous protein C deficiency and neonatal purpura fulminans with a purified protein C concentrate / M. Dreyfus, J. F. Magny, F. Bridey, et al. // *N. Engl. J. Med.* — 1991. — Vol. 325. — P. 1565–1568.
- [58] Lane, D. A. Inherited thrombophilia: part 1 / D. A. Lane, P. M. Mannucci, K. A. Bauer, et al. // *Thromb. Haemost.* — 1996. — Vol. 76. — P. 651–662.
- [59] Lane, D. A. Inherited thrombophilia: part 2 / D. A. Lane, P. M. Mannucci, K. A. Bauer, et al. // *Thromb. Haemost.* — 1996. — Vol. 76. — P. 824–834.

- [60] Rosenberg, R. D. Regulation of the hemostatic mechanism / R. D. Rosenberg // Mol. Basis Blood Dis. / Ed. by G. Stamatoyannopoulos, A. W. Nienhuis, P. Leder, P. W. Majerus. — Philadelphia, PA : 1987. — P. 534–574.
- [61] Pabinger, I. Hereditary deficiency of antithrombin III, protein C and protein S: prevalence in patients with a history of venous thrombosis and criteria for rational patient screening / I. Pabinger, S. Brucker, P. A. Kyrle, et al. // Blood Coagul. Fibrinolysis. — 1992. — Vol. 3. — P. 547–553.
- [62] Rezaie, A. R. Calcium enhances heparin catalysis of the antithrombin-factor Xa reaction by a template mechanism. Evidence that calcium alleviates Gla domain antagonism of heparin binding to factor Xa / A. R. Rezaie // J. Biol. — 1998. — Vol. 273. — P. 16824–16827.
- [63] Esmon, C. T. The Protein C Pathway / C. T. Esmon // Chest. — 2003. — Vol. 124. — P. 26–32.
- [64] Чуличков, А. Л. Пороговая активация свертывания крови и рост тромба в условиях кровотока / А. Л. Чуличков, А. В. Николаев, А. И. Лобанов, Г. Т. Гурия // Матем. моделирование. — 2000. — Т. 12, № 3. — С. 75–96.
- [65] Kastrup, C. J. Modular chemical mechanism predicts spatiotemporal dynamics of initiation in the complex network of hemostasis / C. J. Kastrup, M. K. Runyon, F. Shen, R. F. Ismagilov // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2006. — Vol. 103, no. 43. — P. 15747–15752.
- [66] Kastrup, Ch. J. Spatial localization of bacteria controls coagulation of human blood by 'quorum acting' / Ch. J. Kastrup, J. Q. Boedicker, A. P. Pomerantsev, et al. // Nature Chem. Biol. — 2008. — Vol. 4, no. 12. — P. 742–750.
- [67] Zwaal, R. F. A. Blood coagulation / R. F. A. Zwaal, H. C. Hemker. — Elsevier edition. — 1986.
- [68] Davie, E W. A brief historical review of the waterfall cascade of blood coagulation. / E W Davie // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278, no. 51. — P. 50819–50832.
- [69] Broze, G. J. Jr. The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: insight into its possible mechanism of action / G. J. Jr. Broze, L. A. Warren, W. F. Novotny, et al. // Blood. — 1988. — Vol. 71. — P. 335–343.

- [70] Miller, G. Autoactivation of Human Hageman Factor (Factor XII) / G. Miller, M. Silverberg, A. Kaplan // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1980. — Vol. 92, no. 3. — P. 803–810.
- [71] Samuel, M. Human Factor XII (Hageman Factor) Autoactivation by Dextran Sulfate / M. Samuel, R. Pixleys, M. Villanuevas, et al. // *J. Biol. Chem.* — 1992. — Vol. 267, no. 27. — P. 19691–19697.
- [72] Терентьева, В. А. Биофизические механизмы контактной активации свертывания плазмы крови / В. А. Терентьева, А. Н. Свешникова, М. А. Пантелеев // *Биофизика* (принято в печать).
- [73] Asmis, L. M. Prekallikrein deficiency: the characteristic normalization of the severely prolonged aPTT following increased preincubation time is due to autoactivation of factor XII / L. M. Asmis, I. Sulzer, M. Furlan, B. Lämmle // *Thromb. Res.* — 2002. — Vol. 105, no. 6. — P. 463–470.
- [74] Wiggins, R. C. Role of high-molecular-weight kininogen in surface-binding and activation of coagulation Factor XI and prekallikrein / R. C. Wiggins, B. N. Bouma, C. G. Cochrane, J. H. Griffin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1977. — Vol. 74, no. 10. — P. 4636–4640.
- [75] Vogler, E. Contact activation of blood plasma coagulation: A contribution from the hematology at biomaterial interferences / E. Vogler, C. Siedlecki // *Biomaterials.* — 2010. — Vol. 30, no. 10. — P. 1857–1869.
- [76] McMillin, C. R. The secondary structure of human Hageman factor (factor XII) and its alteration by activating agents / C. R. McMillin, H. Saito, O. D. Ratnoff, A. G. Walton // *J. Clin. Invest.* — 1974. — Vol. 54. — P. 1312–1322.
- [77] Renne, T. Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII / T. Renne, M. Pozgajova, S. Gruner, et al. // *J. Exp. Med.* — 2005. — Vol. 202, no. 2. — P. 271–281.
- [78] Pham, M. Blood coagulation factor XII-a neglected player in stroke pathophysiology / M. Pham, G. Stoll, B. Nieswandt, et al. // *J. Mol. Med.* — 2012. — Vol. 90. — P. 119–126.
- [79] Dunster, J. L. Mathematical modelling of thrombin generation: asymptotic analysis and pathway characterization / J. L. Dunster, J. R. King // *IMA J. Appl. Math.* — 2017. — Vol. 82, no. 1. — P. 60–96.

- [80] Orfeo, T. The tissue factor requirement in blood coagulation / T. Orfeo, S. Butenas, K. E. Brummel-Ziedins, K. G. Mann // J. Biol. Chem. — 2005. — Vol. 280, no. 52. — P. 42887–42896.
- [81] Orfeo, T. The nature of the stable blood clot procoagulant activities / T. Orfeo, K. E. Brummel-Ziedins, M. Gissel, et al. // J. Biol. Chem. — 2008. — Vol. 283, no. 15. — P. 9776–9786.
- [82] Levine, S. N. Enzyme amplifier kinetics / S. N. Levine // Science. — 1966. — Vol. 152. — P. 651–653.
- [83] Khanin, M. A. A mathematical model of the kinetics of blood coagulation / M. A. Khanin, V. V. Semenov // J. Theor. Biol. — 1989. — Vol. 136. — P. 127–134.
- [84] Khanin, M. A. Mathematical model of the kinetics of platelets and plasma hemostasis system interaction / M. A. Khanin, V. L. Leytin, A. P. A. Pop // Thromb. Res. — 1991. — Vol. 64. — P. 659–666.
- [85] Семенов, В. В. Нелинейные эффекты в кинетике гемокоагуляции / В. В. Семенов, М. А. Ханин // Биофизика. — 1990. — Т. 35. — С. 139–141.
- [86] Jesty, J. Mathematical analysis of a proteolytic positive-feedback loop: dependence of lag time and enzyme yields on the initial conditions and kinetic parameters / J. Jesty, E. Beltrami, G. Willems // Biochemistry. — 1993. — Vol. 32. — P. 6266–6274.
- [87] Beltrami, E. Mathematical analysis of activation thresholds in enzyme-catalyzed positive feedbacks: application to the feedbacks of blood coagulation / E. Beltrami, J. Jesty // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1995. — Vol. 92. — P. 8744–8748.
- [88] Jesty, J. Positive feedbacks of coagulation: their role in threshold regulation / J. Jesty, E. Beltrami // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2005. — Vol. 25, no. 12. — P. 2463–2469.
- [89] Willems, G. M. Simulation model for thrombin generation in plasma / G. M. Willems, T. Lindhout, W. T. Hermens, H. C. Hemker // Haemostasis. — 1991. — Vol. 21. — P. 197–207.
- [90] Lawson, J. H. A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study / J. H. Lawson, M. Kalafatis, S. Stram, K. G. Mann // J. Biol. Chem. — 1994. — Vol. 269. — P. 23357–23366.

- [91] Jones, K. C. A model for the tissue factor pathway to thrombin. II. A mathematical simulation / K. C. Jones, K. G. Mann // J. Biol. Chem. — 1994. — Vol. 269, no. 37. — P. 23367–23373.
- [92] Hockin, M. F. A model for the stoichiometric regulation of blood coagulation / M. F. Hockin, K. C. Jones, S. J. Everse, K. G. Mann // J. Biol. Chem. — 2002. — Vol. 277, no. 21. — P. 18322–18333.
- [93] van't Veer, C. Regulation of tissue factor initiated thrombin generation by the stoichiometric inhibitors tissue factor pathway inhibitor, antithrombin-III, and heparin cofactor-II / C. van't Veer, K. G. Mann // J. Biol. Chem. — 1997. — Vol. 272. — P. 4367–4377.
- [94] van't Veer, C. Inhibitory mechanism of the protein C pathway on tissue factor-induced thrombin generation. Synergistic effect in combination with tissue factor pathway inhibitor / C. van't Veer, N. J. Golden, M. Kalafatis, K. G. Mann // J. Biol. Chem. — 1997. — Vol. 272. — P. 7983–7994.
- [95] Ataullakhanov, F. I. Calcium threshold in human plasma clotting kinetics / F. I. Ataullakhanov, A. V. Pohilko, E. I. Sinauridze, R. I. Volkova // Thromb. Res. — 1994. — Vol. 75, no. 4. — P. 383–394.
- [96] Атауллаханов, Ф. И. Имитационная математическая модель внутреннего пути свертывающей системы крови / Ф. И. Атауллаханов, Д. А. Молчанова, А. В. Похилко // Биофизика. — 1995. — Т. 40, № 2. — С. 434–442.
- [97] Bungay, S. D. A mathematical model of lipid-mediated thrombin generation / S. D. Bungay, P. A. Gentry, R. D. Gentry // Math. Med. Biol. — 2003. — Vol. 20. — P. 105–129.
- [98] Kuharsky, A. L. Surface-mediated control of blood coagulation: the role of binding site densities and platelet deposition / A. L. Kuharsky, A. L. Fogelson // Biophys. J. — 2001. — Vol. 80. — P. 1050–1074.
- [99] Xu, C. Q. Dynamic model of the role of platelets in the blood coagulation system / C. Q. Xu, Y. J. Zeng, H. Gregersen // Med. Eng. Phys. — 2002. — Vol. 24. — P. 587–593.
- [100] Baldwin, S. A. A mathematical model of thrombin production in blood coagulation. I. The sparsely covered membrane case / S. A. Baldwin, D. Basmadjian // Ann. Biomed. Eng. — 1994. — Vol. 22. — P. 357–370.

- [101] Chung, T. W. A model for analyzing the formation of thrombin in vessels / T. W. Chung, E. A. O'Rear // *Comput. Biol. Med.* — 1994. — Vol. 24. — P. 31–41.
- [102] Beltrami, E. The role of membrane patch size and flow in regulating a proteolytic feedback threshold on a membrane: possible application in blood coagulation / E. Beltrami, J. Jesty // *Math. Biosci.* — 2001. — Vol. 172. — P. 1–13.
- [103] Jesty, J. Demonstration of a threshold response in a proteolytic feedback system: control of the autoactivation of factor XII / J. Jesty, J. Rodriguez, E. Beltrami // *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* — 2005. — Vol. 34. — P. 71–79.
- [104] Гузеватых, А. П. Активация внутрисосудистого тромбообразования вследствие развития стеноза / А. П. Гузеватых, А. И. Лобанов, Г. Т. Гурия // *Матем. моделирование.* — 2000. — Т. 12, № 4. — С. 39–60.
- [105] Lobanov, A. I. The effect of convective flows on blood coagulation processes / A. I. Lobanov, T. K. Starozhilova // *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* — 2005. — Vol. 34, no. 2-3. — P. 121–134.
- [106] Zarnitsina, V. I. A mathematical model for the spatio-temporal dynamics of intrinsic pathway of blood coagulation. II. Results / V. I. Zarnitsina, A. V. Pokhilko, F. I. Ataullakhanov // *Thromb. Res.* — 1996. — Vol. 84, no. 5. — P. 333–344.
- [107] Zarnitsina, V. I. A mathematical model for the spatio-temporal dynamics of intrinsic pathway of blood coagulation. I. The model description / V. I. Zarnitsina, A. V. Pokhilko, F. I. Ataullakhanov // *Thromb. Res.* — 1996. — Vol. 84, no. 4. — P. 225–236.
- [108] Zarnitsina, V. I. Dynamics of spatially nonuniform patterning in the model of blood coagulation / V. I. Zarnitsina, F. I. Ataullakhanov, A. I. Lobanov, O. L. Morozova // *Chaos.* — 2001. — Vol. 11, no. 1. — P. 57–70.
- [109] Lobanova, E. S. Unstable trigger waves induce various intricate dynamic regimes in a reaction-diffusion system of blood clotting / E. S. Lobanova, F. I. Ataullakhanov // *Phys. Rev. Lett.* — 2003. — Vol. 91. — P. 138301.
- [110] Lobanova, E. S. Complex dynamics of the formation of spatially localized standing structures in the vicinity of saddle-node bifurcations of waves in the reaction-diffusion model of blood clotting / E. S. Lobanova, E. E. Shnol, F. I. Ataullakhanov // *Phys. Rev. E.* — 2004. — Vol. 70. — P. 032903.

- [111] Lobanova, E. S. Running pulses of complex shape in a reaction-diffusion model / E. S. Lobanova, F. I. Ataullakhanov // *Phys. Rev. Lett.* — 2004. — Vol. 93. — P. 098303.
- [112] Ermakova, E. A. Blood coagulation and propagation of autowaves in flow / E. A. Ermakova, M. A. Panteleev, E. E. Shnol // *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* — 2005. — Vol. 34, no. 2-3. — P. 135–142.
- [113] Fogelson, A. L. Coagulation under flow: the influence of flow-mediated transport on the initiation and inhibition of coagulation / A. L. Fogelson, N. Tania // *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* — 2005. — Vol. 34. — P. 91–108.
- [114] Anand, M. A model incorporating some of the mechanical and biochemical factors underlying clot formation and dissolution in flowing blood / M. Anand, K. Rajagopal, K. R. Rajagopal // *J. Theor. Med.* — 2004. — Vol. 6. — P. 183–218.
- [115] Anand, M. A model for the formation and lysis of blood clots / M. Anand, K. Rajagopal, K. R. Rajagopal // *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* — 2005. — Vol. 34, no. 2-3. — P. 109–120.
- [116] Okorie, U. M. Determination of surface tissue factor thresholds that trigger coagulation at venous and arterial shear rates: amplification of 100 f. circulating tissue factor requires flow / U. M. Okorie, W. S. Denney, M. S. Chatterjee, et al. // *Blood.* — 2008. — Vol. 111. — P. 3507–3513.
- [117] Balandina, A. N. Positive feedback loops for factor V and factor VII activation supply sensitivity to local surface tissue factor density during blood coagulation / A. N. Balandina, A. M. Shibeko, D. A. Kireev, et al. // *Biophys. J.* — 2011. — Vol. 101. — P. 1816–1824.
- [118] Shibeko, A. M. Blood flow controls coagulation onset via the positive feedback of factor VII activation by factor Xa / A. M. Shibeko, E. S. Lobanova, M. A. Panteleev, F. I. Ataullakhanov // *BMC Syst. Biol.* — 2010. — Vol. 4. — P. 5.
- [119] Shen, F. Threshold response of initiation of blood coagulation by tissue factor in patterned microfluidic capillaries is controlled by shear rate / F. Shen, Ch. J. Kastrop, Y. Liu, R. F. Ismagilov // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2008. — Vol. 28, no. 11. — P. 2035–2041.

- [120] Rukhlenko, O. Mathematical modeling of intravascular blood coagulation under wall shear stress / O. Rukhlenko, O. Dudchenko, K. Zlobina, G. Guria // PLoS ONE. — 2015. — Vol. 10, no. 7. — P. 1–16.
- [121] Буравцев, В. Н. Математическая модель роста тромбоцитарного тромба / В. Н. Буравцев, А. И. Лобанов, А. В. Украинец // Матем. моделирование. — 2009. — Т. 21, № 3. — С. 109–119.
- [122] Belyaev, A. V. Threshold of microvascular occlusion: injury size defines the thrombosis scenario / A. V. Belyaev, M. A. Panteleev, F. I. Ataullakhanov // Biophys. J. — 2015. — Vol. 109, no. 2. — P. 450–456.
- [123] Погорелова, Е. А. К расчету роста тромбоцитарного тромба на основе уравнений типа “адвекция-диффузия” / Е. А. Погорелова, А. И. Лобанов // Матем. моделирование. — 2015. — Т. 27, № 6. — С. 54–66.
- [124] Tosenberger, A. Modelling of thrombus growth in flow with a DPD-PDE method / A. Tosenberger, F. Ataullakhanov, N. Bessonov, et al. // J. Theor. Biol. — 2013. — Vol. 337, no. 21. — P. 30–41.
- [125] Погорелова, Е. А. Влияние ферментативных реакций на скорость автоволны свертывания крови / Е. А. Погорелова, А. И. Лобанов // Биофизика. — 2014. — Т. 59, № 1. — С. 140–149.
- [126] Marion, M. Existence of pulses for a monotone reaction-diffusion system / M. Marion, V. Volpert // Pure and applied func. anal. — 2010. — Vol. 1, no. 1. — P. 97–122.
- [127] Marion, M. Existence of pulses for the system of competition of species / M. Marion, V. Volpert // J. Dyn. Diff. Equat. (in press). — 2017.
- [128] Franco, R. F. The in vivo kinetics of tissue factor messenger RNA expression during human endotoxemia: relationship with activation of coagulation / R. F. Franco, E. de Jonge, P. E. P. Dekkers, et al. // Blood. — 2000. — Vol. 96, no. 2. — P. 554–559.
- [129] Derhaschnig, U. Blockade of GPIIb/IIIa by eptifibatide and tirofiban does not alter tissue factor induced thrombin generation in human endotoxemia / U. Derhaschnig, C. Pachinger, I. Schweeger-Exeli, et al. // Thromb. Haemost. — 2003. — Vol. 90. — P. 1054–1061.

- [130] Aras, O. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia / O. Aras, A. Shet, R. R. Bach, et al. // *Blood*. — 2004. — Vol. 103. — P. 4545–4553.
- [131] Warr, T. Disseminated intravascular coagulation in rabbits induced by administration of endotoxin or tissue factor: Effect of anti-tissue factor antibodies and measurement of plasma extrinsic pathway inhibitor activity / T. Warr, L. Rao, S. Rapaport // *Blood*. — 1990. — Vol. 75. — P. 1481–1489.
- [132] Taylor, F. B. Jr. Lethal *E. coli* septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody / F. B. Jr. Taylor, A. Chang, W. Ruf, et al. // *Circ Shock*. — 1991. — Vol. 33. — P. 127–134.
- [133] Levi, M. Inhibition of endotoxin-induced activation of coagulation and fibrinolysis by pentoxifylline or by a monoclonal anti-tissue factor antibody in chimpanzees / M. Levi, H. ten Cate, K. A. Bauer, et al. // *J. Clin. Invest.* — 1994. — Vol. 93. — P. 114–120.
- [134] Taylor, F. B. Active site inhibited factor VIIa (DEGR VIIa) attenuates the coagulant and interleukin-6 and -8, but not tumor necrosis factor, responses of the baboon to LD100 *Escherichia coli* / F. B. Taylor, A. C. Chang, G. Peer, et al. // *Blood*. — 1998. — Vol. 91. — P. 1609–1615.
- [135] Creasey, A. A. Tissue factor pathway inhibitor reduces mortality from *Escherichia coli* septic shock / A. A. Creasey, A. C. Chang, L. Feigen, et al. // *J. Clin. Invest.* — 1993. — Vol. 91. — P. 2850–2860.
- [136] Pawlinski, R. Role of tissue factor and protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia / R. Pawlinski, B. Pedersen, G. Schabbauer, et al. // *Blood*. — 2004. — Vol. 103. — P. 1342–1347.
- [137] Xu, H. A coagulation factor VII deficiency protects against acute inflammatory responses in mice / H. Xu, V. A. Ploplis, F. J. Castellino // *J. Pathol.* — 2006. — Vol. 210. — P. 488–496.
- [138] Egorina, E. M. Intracellular and surface distribution of monocyte tissue factor: application to intersubject variability. / E. M. Egorina, M. A. Sovershaev, G. Bjorkoy, et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2005. — Vol. 25. — P. 1493–1498.

- [139] Rivers, R. P. The endotoxin-induced coagulant activity of human monocytes / R. P. Rivers, W. E. Hathaway, W. L. Weston // *Br. J. Haematol.* — 1975. — Vol. 30, no. 3. — P. 311–316.
- [140] Gregory, S. A. Regulation of tissue factor gene expression in the monocyte procoagulant response to endotoxin / S. A. Gregory, J. H. Morrissey, T. S. Edgington // *Mol. Cell. Biol.* — 1989. — Vol. 9, no. 6. — P. 2752–2755.
- [141] Drake, T. A. Functional tissue factor is entirely cell surface expressed on lipopolysaccharide-stimulated human blood monocytes and a constitutively tissue factor-producing neoplastic cell line / T. A. Drake, W. Ruf, J. H. Morrissey, T. S. Edgington // *J. Cell. Biol.* — 1989. — Vol. 109, no. 1. — P. 389–395.
- [142] Meszaros, K. Monocyte tissue factor induction by lipopolysaccharide (LPS): dependence on LPS-binding protein and CD14, and inhibition by a recombinant fragment of bacterial/permeability-increasing protein / K. Meszaros, S. Aberle, R. Dedrick, et al. // *Blood.* — 1994. — Vol. 83, no. 9. — P. 2516–2525.
- [143] Suzuki, T. Comprehensive gene expression profile of LPS-stimulated human monocytes by SAGE / T. Suzuki, S. Hashimoto, N. Toyoda, et al. // *Blood.* — 2000. — Vol. 96, no. 7. — P. 2584–2591.
- [144] Aird, W. C. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome / W. C. Aird // *Sepsis.* — 2003. — Vol. 101, no. 10. — P. 3765–3777.
- [145] Moore, K. L. Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro / K. L. Moore, S. P. Andreoli, N. L. Esmon, N. U. Bang // *J. Clin. Invest.* — 1987. — Vol. 79, no. 1. — P. 124–130.
- [146] Crossman, D. C. The regulation of tissue factor mRNA in human endothelial cells in response to endotoxin or phorbol ester / D. C. Crossman, D. P. Carr, E. G. Tuddenham, et al. // *J. Biol. Chem.* — 1990. — Vol. 265, no. 17. — P. 9782–9787.
- [147] Bannerman, D. D. Integrity and survival signaling events through caspase cleavage of adherens junction proteins / D. D. Bannerman, M. Sathymoorthy, S. E. Goldblum // *J. Biol. Chem.* — 1998. — Vol. 273, no. 52. — P. 35371–35380.

- [148] Haimovitz-Friedman, A. Lipopolysaccharide Induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation / A. Haimovitz-Friedman, C. Cordon-Cardo, S. Bayoumy, et al. // J. Exp. Med. — 1997. — Vol. 186, no. 11. — P. 1831.
- [149] Owens, A. P. 3rd. Microparticles in hemostasis and thrombosis / A. P. 3rd Owens, N. Mackman // Circ. Res. — 2011. — Vol. 108. — P. 1284–1297.
- [150] Morel, O. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? / O. Morel, F. Toti, B. Hugel, et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2006. — Vol. 26. — P. 2594–2604.
- [151] Falati, S. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin / S. Falati, Q. Liu, P. Gross, et al. // J. Exp. Med. — 2003. — Vol. 197. — P. 1585–1598.
- [152] Mayr, F. B. Racial differences in endotoxin-induced tissue factor-triggered coagulation / F. B. Mayr, A. O. Spiel, J. M. Leitner, et al. // J. Thromb. Haemost. — 2009. — Vol. 7. — P. 634–640.
- [153] Челушкин, М. А. Активация контактного пути свертывания крови на циркулирующих микровезкулах может объяснить гиперкоагуляцию при разбавлении плазмы / М. А. Челушкин, М. А. Пантелеев, А. Н. Свешникова // Биол. мембр. — 2017. — Т. 34, № 2. — С. 126–141.
- [154] Lipets, E. Circulating contact-pathway-activating microparticles together with factors IXa and XIa induce spontaneous clotting in plasma of hematology and cardiologic patients / E. Lipets, O. Vlasova, E. Urnova, et al. // PLoS ONE. — 2014. — Vol. 9, no. 1. — P. e87692.
- [155] DeLa Cadena, R. A. Activation of the kallikrein-kinin system after endotoxin administration to normal human volunteers / R. A. DeLa Cadena, A. F. Suffredini, J. D. Page, et al. // Blood. — 1993. — Vol. 81, no. 12. — P. 3313–3317.
- [156] Roeise, O. Dose dependence of endotoxin-induced activation of the plasma contact system: an in vitro study / O. Roeise, B. N. Bouma, J. O. Stadaas, A. O. Aasen // Circ. Shock. — 1988. — Vol. 26. — P. 419–430.

- [157] Lerner, R. G. Endotoxin-induced intravascular clotting: the need for granulocytes / R. G. Lerner, S. I. Rapaport, J. M. Spitzer // *Thromb. Diath. Haemorrh.* — 1968. — Vol. 20. — P. 430–443.
- [158] Gallimore, M. J. Falls in plasma levels of prekallikrein, high molecular weight kininogen, and kallikrein inhibitors during lethal endotoxin shock in dogs / M. J. Gallimore, A. O. Aasen, K. H. Lyngaas, et al. // *Thromb. Res.* — 1978. — Vol. 12. — P. 307–318.
- [159] Minnema, M. C. Activation of clotting factor XI without detectable contact activation in experimental human endotoxemia / M. C. Minnema, D. Pajkrt, W. A. Willemin, et al. // *Blood.* — 1998. — Vol. 92. — P. 3294–3301.
- [160] van Deventer, S. Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways / S. van Deventer, H. Buller, J. ten Cate, et al. // *Blood.* — 1990. — Vol. 76. — P. 2520–2526.
- [161] Frick, I.-M. The contact system—a novel branch of innate immunity generating antibacterial peptides. / I.-M. Frick, P. Akesson, H. Herwald, et al. // *EMBO J.* — 2006. — Vol. 25, no. 23. — P. 5569–5578.
- [162] Herwald, H. Activation of the contact-phase system on bacterial surfaces — a clue to serious complications in infectious diseases / H. Herwald, M. Mörgelin, A. Olsén, et al. // *Nature medicine.* — 1998. — Vol. 4, no. 3. — P. 298–302.
- [163] Oursel, D. Lipid composition of membranes of *Escherichia coli* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using negative electrospray ionization / D. Oursel, C. Loutelier-Bourhis, N. Orange, et al. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2007. — Vol. 21. — P. 1721–1728.
- [164] Nikaido, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited / H. Nikaido // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 2003. — Vol. 67, no. 4. — P. 593–656.
- [165] Silipo, A. Lipid A structure / A. Silipo, A. Molinaro // *Bacterial Lipopolysaccharides* / Ed. by Y.A. Knirel, Y.A. Valvano. — : Springer Vienna, 2011. — P. 1–20.
- [166] Silipo, A. The diversity of the core oligosaccharide in lipopolysaccharides / A. Silipo, A. Molinaro // *Subcell. Biochem.* — 2010. — Vol. 53. — P. 69–99.
- [167] Raetz, R. Lipopolysaccharide endotoxins / R. Raetz, C. Whitfield // *Annu. Rev. Biochem.* — 2002. — Vol. 71. — P. 635–700.

- [168] Nikaido, H. The outer membrane of Gram-negative bacteria / H. Nikaido, T. Nakae // *Adv. Microb. Physiol.* — 1980. — Vol. 20. — P. 163–250.
- [169] Takeuchi, O. Pattern recognition receptors and inflammation. / O Takeuchi, S Akira // *Cell.* — 2010. — Vol. 140. — P. 805–820.
- [170] Holst, O. Core oligosaccharide and lipid A components of lipopolysaccharides / O. Holst, A. Molinaro // *Microbial glycobiology: structures relevance and applications* / Ed. by A Moran, P Brennan, O Holst, M von Itszstein. — San Diego : 2009. — P. 29–56.
- [171] Zahring, U. Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides / U. Zahring, B. Lindner, E. Rietschel // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* — 1994. — Vol. 50. — P. 211–276.
- [172] Brandenburg, K. Endotoxins: relationships between structure, function, and activity / K. Brandenburg, A. Wiese // *Curr. Top. Med. Chem.* — 2004. — Vol. 4, no. 11. — P. 1127–1146.
- [173] Wang, X. Endotoxins: lipopolysaccharides of gram-negative bacteria / X. Wang, P. J. Quinn // *Subcell. Biochem.* — 2010. — Vol. 53. — P. 3–25.
- [174] Bacterial lipopolysaccharides: structure, chemical synthesis, biogenesis and interaction with host cells / Ed. by Yu. Knirel, M. Valvano. — Springer edition. — 2011. — ISBN: 9783709107324.
- [175] Книрель, Ю. А. Строение липополисахаридов грамотрицательных бактерий. II. Структура кора. / Ю. А. Книрель, Н. К. Кочетков // *Биохимия.* — 1993. — Т. 58, № 2. — С. 182–220.
- [176] Holst, O. Endotoxin in health and disease / O. Holst. — 1999. — ISBN: 0824719441.
- [177] Nikaido, H. Role of permeability barriers in resistance to b-lactam antibiotics. / H. Nikaido // *Pharmacol. Ther.* — 1985. — Vol. 27. — P. 197–231.
- [178] Nikaido, H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria / H. Nikaido // *Semin. Cell. Dev. Biol.* — 2001. — Vol. 12, no. 3. — P. 215–223.
- [179] Книрель, Ю. А. Строение липополисахаридов грамотрицательных бактерий. III. Структура О-специфических полисахаридов / Ю. А. Книрель, Н. К. Кочетков // *Биохимия.* — 1994. — Т. 59, № 12. — С. 1784–1851.

- [180] Wang, L. The variation of O antigens in gram-negative bacteria / L. Wang, Q. Wang, P. R. Reeves // *Subcell. Biochem.* — 2010. — Vol. 53. — P. 123–152.
- [181] Hölzer, S. Effect of the O-antigen length of lipopolysaccharide on the functions of type III secretion systems in *Salmonella enterica* / S Hölzer, M Schlumberger, D Jäckel, M Hensel // *Infect. Immun.* — 2009. — Vol. 77, no. 12. — P. 5458–5470.
- [182] Lerouge, I. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions / I. Lerouge, J. Vanderleyden // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2001. — Vol. 26. — P. 17–47.
- [183] Walker, S. L. Role of cell surface lipopolysaccharides in *Escherichia coli* K12 adhesion and transport / S. L. Walker, J. A. Redman, M. Elimelech // *Langmuir.* — 2004. — no. 24. — P. 7736–7746.
- [184] Wang, W. Method of X-ray anomalous diffraction for lipid structures / W. Wang, D. Pan, Y. Song, et al. // *Biophys. J.* — 2006. — Vol. 91, no. 2. — P. 736–743.
- [185] Zeuke, S. TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS / S. Zeuke, A. J. Ulmer, S. Kusumoto, et al. // *Cardiovasc. Res.* — 2002. — Vol. 56, no. 1. — P. 126–134.
- [186] Sabroe, I. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses / I. Sabroe, E. C. Jones, L. R. Usher, et al. // *J. Immunol.* — 2002. — Vol. 168, no. 9. — P. 4701–4710.
- [187] Poltorak, A. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene / A. Poltorak, X. He, I. Smirnova, et al. // *Science.* — 1998. — Vol. 282. — P. 2085–2088.
- [188] Park, B. S. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes / B. S. Park, J. O. Lee // *Exp. Mol. Med.* — 2013. — Vol. 45. — P. e66.
- [189] Wright, S. D. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein / S. D. Wright, R. A. Ramos, P. S. Tobias, et al. // *Science.* — 1990. — Vol. 249. — P. 1431–1433.
- [190] Shimazu, R. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4 / R. Shimazu, S. Akashi, H. Ogata, et al. // *J. Exp. Med.* — 1999. — Vol. 189. — P. 1777–1782.

- [191] Mueller, M. Endotoxin: physical requirements for cell activation / M. Mueller, B. Lindner, R. Dedrick, et al. // J. Endotoxin. Res. — 2005. — Vol. 11, no. 5. — P. 299–303.
- [192] Gutschmann, T. The physicochemistry of endotoxins in relation to bioactivity / T. Gutschmann, A. B. Schromm, K. Brandenburg // Int. J. Med. Microbiol. — 2007. — Vol. 297, no. 5. — P. 341–352.
- [193] Lynn, W. A. Neither CD14 nor serum is absolutely necessary for activation of mononuclear phagocytes by bacterial lipopolysaccharide / W. A. Lynn, Y. Liu, D. T. Golenbock // Infect. Immun. — 1993. — Vol. 61. — P. 4452–4461.
- [194] Gangloff, S. C. Lipopolysaccharide structure influences the macrophage response via CD14-independent and CD14-dependent pathways. / S. C. Gangloff, N. Hijiya, A. Haziot, S. M. Goyert // Clin. Infect. Dis. — 1999. — Vol. 28. — P. 491–496.
- [195] Seydel, U. Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity / U. Seydel, M. Oikawa, K. Fukase, et al. // Eur. J. Biochem. — 2000. — Vol. 267, no. 10. — P. 3032–3039.
- [196] Seydel, U. The generalized endotoxic principle / U. Seydel, L. Hawkins, A. B. Schromm, et al. // Eur. J. Immunol. — 2003. — Vol. 33, no. 6. — P. 1586–1592.
- [197] Brandenburg, K. Influence of the supramolecular structure of free lipid A on its biological activity / K. Brandenburg, H. Mayer, M. H. J. Koch, et al. // Eur. J. Biochem. — 1993. — Vol. 218, no. 2. — P. 555–563.
- [198] Fukuoka, S. Physico-chemical analysis of lipid A fractions of lipopolysaccharide from *Erwinia carotovora* in relation to bioactivity / S. Fukuoka, K. Brandenburg, M. Muller, et al. // Biochim. Biophys. Acta. — 2001. — Vol. 1510. — P. 185–197.
- [199] Oikawa, M. NMR conformational analysis of biosynthetic precursor-type lipid A: monomolecular state and supramolecular assembly / M. Oikawa, T. Shintaku, N. Fukuda, et al. // Org. Biomol. Chem. — 2004. — Vol. 2. — P. 3557–3565.
- [200] Brandenburg, K. Physicochemical properties of bacterial glycopolymers in relation to bioactivity / K. Brandenburg, J. Andrä, M. Müller, et al. // Carbohydr. Res. — 2003. — Vol. 338, no. 23. — P. 2477–2489.
- [201] D'Errico, G. Mesoscopic and microstructural characterization of liposomes formed by the lipooligosaccharide from *Salmonella minnesota* strain 595 (Re mutant) / G. D'Errico,

- A. Silipo, G. Mangiapia, et al. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2009. — Vol. 11, no. 13. — P. 2314–2322.
- [202] Kim, J. I. Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling / J. I. Kim, J. L. Chang, S. J. Mi, et al. // *J. Biol. Chem.* — 2005. — Vol. 280, no. 12. — P. 11347–11351.
- [203] Boutet, J. Detailed investigation of the immunodominant role of O-antigen stoichiometric O-acetylation as revealed by chemical synthesis, immunochemistry, solution conformation and STD-NMR spectroscopy for *Shigella flexneri* 3a / J. Boutet, P. Blasco, C. Guerreiro, et al. // *Chemistry*. — 2016. — Vol. 22, no. 31. — P. 10892–10911.
- [204] D’Errico, G. Characterization of liposomes formed by lipopolysaccharides from *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia multivorans* and *Agrobacterium tumefaciens*: from the molecular structure to the aggregate architecture / G. D’Errico, A. Silipo, G. Mangiapia, et al. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2010. — Vol. 12, no. 41. — P. 13574–13585.
- [205] Vanderley, P. O-antigenic chains of lipopolysaccharide prevent binding of antibody molecules to an outer-membrane pore protein in enterobacteriaceae / P. Vanderley, O. Kuipers, J. Tommassen, B. Lugtenberg // *Microb. Pathog.* — 1986. — Vol. 1. — P. 43–49.
- [206] Bentley, A. T. Effect of lipopolysaccharide structure on reactivity of antiporin monoclonal antibodies with the bacterial cell surface / A. T. Bentley, P. E. Klebba // *J. Bacteriol.* — 1988. — Vol. 170. — P. 1063–1068.
- [207] Normark, S. A pathogen attacks while keeping up defense / S. Normark, C. Nilsson, B. H. Normark // *Science*. — 2005. — Vol. 307. — P. 1211–1212.
- [208] West, N. P. Optimization of virulence functions through glucosylation of *Shigella* LPS / N. P. West, P. Sansonetti, J. Mounier, et al. // *Science*. — 2005. — Vol. 307, no. 5713. — P. 1313–1317.
- [209] Bock, K. Lipopolysaccharide solution conformation: antigen shape inferred from high resolution ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy and hard-sphere calculations / K. Bock, S. Josephson, D. R. Bundle // *J. Chem. Soc., Perkin Transactions 2*. — 1982. — Vol. 0. — P. 59–70.

- [210] Knirel, Y. A. Variations in O-antigen biosynthesis and O-acetylation associated with altered phage sensitivity in *Escherichia coli* 4s / Y. A. Knirel, N. S. Prokhorov, A. S. Shashkov, et al. // *J. Bacteriol.* — 2014. — Vol. 197, no. 5. — P. 905–912.
- [211] Naumann, D. New insights into the phase behaviour of a complex anionic amphiphile: architecture and dynamics of bacterial deep rough lipopolysaccharide membranes as seen by FTIR, X-Ray, and molecular modelling techniques / D. Naumann, C. Schultz, C. Sabisch, et al. // *J. Mol. Struct.* — 1989. — Vol. 214. — P. 213–246.
- [212] Glauert, A. M. The topography of the bacterial cell wall / A. M. Glauert, M. J. Thornley // *Ann. Rev. Microbiol.* — 1969. — Vol. 23. — P. 159–198.
- [213] Amro, N. High-resolution atomic force microscopy studies of the *Escherichia coli* outer membrane: structural basis for permeability / N. Amro, L. Kotra, K. Wadu-Mesthrige, et al. // *Langmuir.* — 2000. — Vol. 16, no. 6. — P. 2789–2796.
- [214] Nascimento, A. Jr. Hydration, ionic valence and cross-linking propensities of cations determine the stability of lipopolysaccharide (LPS) membranes / A. Jr. Nascimento, F. J. Pontes, R. D. Lins, T. A. Soares // *Chem. Commun. (Camb.).* — 2014. — Vol. 50. — P. 231–233.
- [215] Murzyn, K. Structural properties of the water/membrane interface of a bilayer built of the *E. coli* lipid A / K. Murzyn, M. Pasenkiewicz-Gierula // *J. Phys. Chem. B.* — 2015. — Vol. 119. — P. 5846–56.
- [216] Kirschner, K. N. A glycam-based force field for simulations of lipopolysaccharide membranes: parametrization and validation / K. N. Kirschner, R. D. Lins, A. Maass, T. A. Soares // *J. Chem. Theory. Comput.* — 2012. — Vol. 8. — P. 4719–4731.
- [217] Pontes, F. J. The effect of temperature, cations, and number of acyl chains on the lamellar to non-lamellar transition in lipid-a membranes: a microscopic view / F. J. Pontes, V. H. Rusu, T. A. Soares, R. D. Lins // *J. Chem. Theory Comput.* — 2012. — Vol. 8. — P. 3830–3838.
- [218] Kim, S. Bilayer properties of lipid A from various Gram-negative bacteria / S. Kim, D. S. Patel, S. Park, et al. // *Biophys. J.* — 2016. — Vol. 111, no. 8. — P. 1750–1760.
- [219] Piggot, T. J. Electroporation of the *E. coli* and *S. Aureus* membranes: molecular dynamics simulations of complex bacterial membranes / T. J. Piggot, D. Holdbrook, S. Khalid // *J. Phys. Chem. B.* — 2011. — Vol. 115, no. 45. — P. 13381–13388.

- [220] Raetz, C. R. Biochemistry of endotoxins / C. R. Raetz // Annu. Rev. Biochem. — 1990. — Vol. 59. — P. 129–70.
- [221] De Felice, A. Structural and conformational study of the O-antigenic portion of the lipopolysaccharide isolated from *Burkholderia gladioli* pv. *cocovenenans* / A. De Felice, A. Silipo, K. Scherlach, et al. // Eur. J. Org. Chem. — 2016. — P. 748–755.
- [222] Kang, Y. Bacteriophage tailspikes and bacterial O-antigens as a model system to study weak-affinity protein-polysaccharide interactions / Y. Kang, U. Gohlke, O. Engström, et al. // J. Am. Chem. Soc. — 2016. — Vol. 138, no. 29. — P. 9109–9118.
- [223] Geyer, A. A glycosidic linkage constrained to the “Anti” conformation / A. Geyer, M. Müller, R. Schmidt // J. Am. Chem. Soc. — 1999. — Vol. 121, no. 26. — P. 6312–6313.
- [224] Höög, C. Oligosaccharides display both rigidity and high flexibility in water as determined by ¹³C NMR relaxation and ¹H,¹H NOE spectroscopy: evidence of anti-phi and anti-psi torsions in the same glycosidic linkage. / C. Höög, C. Landersjö, G. Widmalm // Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany). — 2001. — Vol. 7, no. 14. — P. 3069–3077.
- [225] Jonsson, K. H. M. Studies on the conformational flexibility of α -l-rhamnose-containing oligosaccharides using ¹³C-site-specific labeling, NMR spectroscopy and molecular simulations: implications for the three-dimensional structure of bacterial rhamnan polysaccharides / K. H. M. Jonsson, E. Säwén, G. Widmalm // Org. Biomol. Chem. — 2012. — Vol. 10, no. 12. — P. 2453.
- [226] Sarkar, A. Conformational preferences of the O-antigen polysaccharides of *Escherichia coli* O5ac and O5ab using NMR spectroscopy and molecular modeling / A. Sarkar, C. Fontana, A. Imberty, et al. // Biomacromolecules. — 2013. — Vol. 14, no. 7. — P. 2215–2224.
- [227] Miljkovic, M. Carbohydrates: Synthesis, mechanisms, and stereoelectronic effects / M. Miljkovic. — 2009. — P. 543.
- [228] Lycknert, K. Dynamics of the *Escherichia coli* O91 O-antigen polysaccharide in solution as studied by carbon-13 NMR relaxation / K. Lycknert, G. Widmalm // Biomacromolecules. — 2004. — Vol. 5, no. 3. — P. 1015–1020.
- [229] Jorgensen, W. L. Potential energy functions for atomic-level simulations of water and organic and biomolecular systems / W. L. Jorgensen, J. Tirado-rives // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2005. — Vol. 102, no. 19. — P. 6665–6670.

- [230] Kirschner, K. N. GLYCAM06: A generalizable biomolecular force field. Carbohydrates / K. N. Kirschner, A. B. Yongye, S. M. Tschampel, J. González-Outeiriño // J. Comput. Chem. — 2008. — Vol. 29. — P. 622–655.
- [231] Sorin, E. J. Exploring the helix-coil transition via all-atom equilibrium ensemble simulations / E. J. Sorin, V. S. Pande // Biophys. J. — 2005. — Vol. 88, no. 4. — P. 2472–2493.
- [232] Jorgensen, W. L. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids / W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell, J. Tirado-Rives // J. Am. Chem. Soc. — 1996. — Vol. 118, no. 45. — P. 11225–11236.
- [233] Boyle, N. M. O. Open Babel: An open chemical toolbox / N. M. O. Boyle, M. Banck, C. A. James, et al. // J. Cheminform. — 2011. — Vol. 3, no. 1. — P. 1–14.
- [234] Granovsky, A. A. Extended multi-configuration quasi-degenerate perturbation theory: the new approach to multi-state multi-reference perturbation theory / A. A. Granovsky // J. Chem. Phys. — 2011. — Vol. 134, no. 21. — P. 214113.
- [235] Connolly, M. L. Analytical molecular surface calculation / M. L. Connolly // J. Appl. Cryst. — 1983. — Vol. 16. — P. 548–558.
- [236] Bayly, C. I. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model / C. I. Bayly, P. Cieplak, W. Cornell, P. A. Kollman // J. Phys. Chem. — 1993. — Vol. 97, no. 40. — P. 10269–10280.
- [237] Hess, B. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation / B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, E. Lindahl // J. Chem. Theor. Comput. — 2008. — Vol. 4, no. 3. — P. 435–447.
- [238] Nose, S. Constant pressure molecular dynamics for molecular systems / S. Nose, M. L. Klein // Mol. Phys. — 1983. — Vol. 50. — P. 1055–1076.
- [239] Parrinello, M. Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method / M. Parrinello, A. Rahman // J. Appl. Phys. — 1981. — Vol. 52. — P. 7182–7190.
- [240] Hess, B. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations / B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, J. Fraaije // J. Comput. Chem. — 1997. — Vol. 18. — P. 1463–1472.
- [241] Essmann, U. A smooth particle mesh Ewald method / U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, et al. // J. Chem. Phys. — 1995. — Vol. 103. — P. 8577–8593.

- [242] Van Der Spoel, D. A systematic study of water models for molecular simulation: Derivation of water models optimized for use with a reaction field / D. Van Der Spoel, P. J. Van Maaren, H. J. C. Berendsen // J. Chem. Phys. — 1998. — Vol. 108, no. 24. — P. 10220.
- [243] Berendsen, H. J. C. Molecular dynamics with coupling to an external bath / H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, A. DiNola, J. R. Haak // J. Chem. Phys. — 1984. — Vol. 81. — P. 3684–3690.
- [244] Jo, S. CHARMM-GUI: A Web-based Graphical User Interface for CHARMM / S. Jo, T. Kim, V. G. Iyer, W. Im // J. Comput. Chem. — 2008. — Vol. 29, no. 11. — P. 1859–1865.
- [245] Eisenhaber, F. The double cube lattice method: efficient approaches to numerical integration of surface area and volume and to dot surface contouring of molecular assemblies / F. Eisenhaber, P. Lijnzaad, P. Argos, et al. // J. Comp. Chem. — 1995. — Vol. 16. — P. 273–284.
- [246] Schrodinger, L. L. C. The PyMOL molecular graphics system, version 1.3r1. — 2010.
- [247] Nesterenko, A. M. Molecular-dynamic simulation of phospholipid bilayers: Ion distribution at the surface of neutral and charged bilayer in the liquid crystalline state / A. M. Nesterenko, Yu. A. Ermakov // Biochemistry (Moscow) Suppl. Series A. — 2013. — Vol. 6, no. 4. — P. 320–328.
- [248] Pautsch, A. Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain / A. Pautsch, G. E. Schulz // Nature Struct. Biol. — 1998. — Vol. 5, no. 11. — P. 1013–1017.
- [249] Wu, E. L. CHARMM-GUI Membrane builder toward realistic biological membrane simulations / E. L. Wu, X. Cheng, S. Jo, et al. // J. Comp. Chem. — 2014. — Vol. 35, no. 27. — P. 1997–2004.
- [250] Guixà-González, R. MEMBPLUGIN: studying membrane complexity in VMD / R. Guixà-González, I. Rodríguez-Espigares, J. M. Ramírez-Angueta, et al. // Bioinformatics. — 2014. — Vol. 30, no. 10. — P. 1478–1480.
- [251] Eswar, N. Comparative protein structure modeling using Modeller / N. Eswar, B. Webb, M. A. Marti-Renom, et al. // Cur. Protoc. Bioinformatics. — 2006. — Vol. 5. — P. 5.6.1–5.6.30.

- [252] Humphrey, W. VMD: visual molecular dynamics / W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten // J. Mol. Graph. — 1996. — Vol. 14, no. 1. — P. 33–38.
- [253] van der Walt, S. The NumPy array: A structure for efficient numerical computation / S. van der Walt, S. C. Colbert, G. Varoquaux // Comp. in Science & Engineering. — 2011. — Vol. 13, no. 2. — P. 22–30.
- [254] Hunter, J. D. Matplotlib: A 2D graphics environment / J. D. Hunter // Comp. in Science & Engineering. — 2007. — Vol. 9, no. 3. — P. 90–95.
- [255] Symbols for specifying the conformation of polysaccharide chains // Pure Appl. Chem. — 1983. — Vol. 55, no. 8. — P. 1269–1272.
- [256] Dabrowski, J. Conformational mobility of oligosaccharides: experimental evidence for the existence of an “anti” conformer of the Gal β 1-3Glc β 1-OMe disaccharide / J. Dabrowski, T. Kozar, H. Grosskurth, N. Nifant’ev // J. Am. Chem. Soc. — 1995. — no. 117. — P. 5534–5539.
- [257] Landersjö, C. Conformational flexibility of carbohydrates: a folded conformer at the phi dihedral angle of a glycosidic linkage / C. Landersjö, R. Stenutz, G. Widmalm // J. Am. Chem. Soc. — 1997. — Vol. 119, no. 37. — P. 8695–8698.
- [258] Chorin, A. Numerical solution of the Navier-Stokes equations / A. Chorin // Math. Comput. — 1968. — Vol. 22, no. 104. — P. 745–762.
- [259] Strang, G. Computational Science and Engineering. 1st ed. / G. Strang. — : Wellesley Cambridge: Press, 2007.
- [260] Jucker, B. Polymer interactions between five gram-negative bacteria and glass investigated using LPS micelles and vesicles as model systems / B. Jucker, H. Harms, A. Zehnder // Colloids Surf., B. — 1998. — Vol. 11, no. 1-2. — P. 33–45.
- [261] Lugtenberg, B. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of Escherichia coli and other Gram-negative bacteria / B Lugtenberg, L Van Alphen // Biochim. Biophys. Acta. — 1983. — Vol. 737. — P. 51–115.
- [262] Zhuo, R. Competitive-protein adsorption in contact activation of blood factor XII / R. Zhuo, C. A. Siedlecki, E. A. Vogler // Biomaterials. — 2007. — Vol. 28, no. 30. — P. 4355–4369.

- [263] Tait, J. Primary structure requirements for the binding of human high molecular weight kininogen to plasma prekallikrein and factor XI / J Tait, K Fujikawa // J. Biol. Chem. — 1987. — Vol. 262, no. 24. — P. 11651–11656.
- [264] Volpert, V. Elliptic partial differential equations / V. Volpert. — Monographs edition. — Basel : Springer Basel, 2014. — Vol. 104. — P. 469–478.
- [265] Volpert, V. Spectrum of elliptic operators and stability of travelling waves / V. Volpert, A. Volpert // Asymptotic Anal. — 2000. — Vol. 23. — P. 111–134.
- [266] Zeldovich, Ya. B. A theory of thermal propagation of flame / Ya. B. Zeldovich, D. A. Frank-Kamenetskii // Acta Physicochim. USSR. — 1938. — Vol. 9. — P. 341–350.
- [267] Volpert, A. I. Traveling wave solutions of parabolic systems / A. I. Volpert, V. A. Volpert, V. A. Volpert. — Translatio edition. — Providence, Rhode Island : American Mathematical Society, 1994. — Vol. 140. — P. 448.
- [268] Volpert, V. Convergence to a wave of solutions of a nonlinear diffusion equation avec a source of general type / V. Volpert // Siberian Math. Journal. — 1989. — Vol. 30, no. 2. — P. 203–210.
- [269] Volpert, V. Asymptotic behavior of solutions of a nonlinear diffusion equation avec a source of general type / V. Volpert // Siberian Math. Journal. — 1989. — Vol. 30, no. 1. — P. 25–36.
- [270] Wufsus, A. R. The hydraulic permeability of blood clots as a function of fibrin and platelet density / A. R. Wufsus, N. E. Macera, K. B. Neeves // Biophys. J. — 2013. — Vol. 104, no. 8. — P. 1812–1823.
- [271] Beavers, G. S. Boundary conditions at a naturally permeable wall / G. S. Beavers, D. D. Joseph // J. Fluid Mech. — 1967. — Vol. 30, no. 1. — P. 197–207.
- [272] Yu, P. K. Quantitative study of age-related endothelial phenotype change in the human vortex vein system / P. K. Yu, S. J. Cringle, D. Yi Yu // Microvasc. Res. — 2014. — Vol. 94. — P. 64–72.
- [273] Zakharova, N. V. Platelet surface-associated activation and secretion-mediated inhibition of coagulation factor XII / N. V. Zakharova, E. O. Artemenko, N. A. Podoplelova, et al. // PLoS ONE. — 2015. — Vol. 10, no. 2. — P. 1–20.

- [274] Kastowsky, M. Molecular modelling of the three-dimensional structure and conformational flexibility of bacterial lipopolysaccharide / M. Kastowsky, T. Gutberlet, H. Bradaczek // J. Bacteriol. — 1992. — Vol. 174, no. 14. — P. 4798–4806.
- [275] Sugita, Y. Replica exchange molecular dynamics method for protein folding simulation / Y. Sugita, Y. Okamoto // Chem. Phys. Lett. — 1999. — Vol. 314. — P. 141–151.
- [276] Whitfield, C. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides / C. Whitfield, M. Trent // Ann. Rev. Biochem. — 2014. — Vol. 83. — P. 99–128.
- [277] Okuda, S. Cytoplasmic ATP hydrolysis powers transport of lipopolysaccharide across the periplasm in *E. coli* / S. Okuda, E. Freinkman, D. Kahne // Science. — 2012. — Vol. 338, no. 6111. — P. 1214–1217.
- [278] Gu, Y. Lipopolysaccharide is inserted into the outer membrane through an intramembrane hole, a lumen gate, and the lateral opening of *lptD* / Y. Gu, P. J. Stansfeld, Yi. Zeng, et al. // Structure. — 2015. — Vol. 23, no. 3. — P. 496–504.
- [279] Dong, H. Structural basis for outer membrane lipopolysaccharide insertion / H. Dong, Q. Xiang, Y. Gu, et al. // Nature. — 2014. — Vol. 511, no. 7507. — P. 52–56.
- [280] Rees, D. A. Polysaccharide conformation. Part VII. Model building computations for α -1,4 galacturonan and the kinking function of L-rhamnose residues in pectic substances / D. A. Rees, A. W. Wight // J. Chem. Soc. B. — 1971. — P. 1366–72.
- [281] Whittington, S. G. The conformational statistics of pectic acid / S. G. Whittington, R. M. Glover, G. M. Hallman // J. Polymer Sci. — 1973. — Vol. 42. — P. 1493–1497.
- [282] Axelos, M. A. V. Influence of the substituents of the carboxyl groups and of the rhamnose content on the solution properties and flexibility of pectins / M. A. V. Axelos, J. F. Thibault // Int. J. Biol. Macromolec. — 1991. — Vol. 13, no. 2. — P. 77–82.
- [283] Fritz, Jahnig. What is the surface tension of a lipid bilayer membrane? / Jahnig Fritz // Biophys. J. — 1996. — Vol. 71. — P. 1348–1349.
- [284] Kucerka, N. Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature / N. Kucerka, M. P. Nieh, J. Katsaras // Biochim. Biophys. Acta. — 2011. — Vol. 1808, no. 11. — P. 2761–2771.

- [285] Kucerka, N. Structure of fully hydrated fluid phase lipid bilayers with monounsaturated chains / N. Kucerka, S. Tristram-Nagle, J. F. Nagle // *J. Membr. Biol.* — 2005. — Vol. 208, no. 3. — P. 193–202.
- [286] Sennato, S. Evidence of domain formation in cardiolipin-glycerophospholipid mixed monolayers. A thermodynamic and AFM study / S. Sennato, F. Bordini, C. Cametti, et al. // *J. Phys. Chem. B.* — 2005. — Vol. 109, no. 33. — P. 15950–15957.
- [287] Pan, J. Molecular structures of fluid phase phosphatidylglycerol bilayers as determined by small angle neutron and X-ray scattering / J. Pan, F. A. Heberle, S. Tristram-Nagle, et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2012. — Vol. 1818, no. 9. — P. 2135–2148.
- [288] Jorgensen, W. L. The OPLS potential functions for proteins. Energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin / W. L. Jorgensen, J. Tirado-rives // *J. Am. Chem. Soc.* — 1988. — Vol. 110, no. 4. — P. 1657–1666.
- [289] Kulig, W. Cis and trans unsaturated phosphatidylcholine bilayers: A molecular dynamics simulation study / W. Kulig, M. Pasenkiewicz-Gierula, T. Rog // *Chem. Phys. Lipids.* — 2016. — Vol. 195. — P. 12–20.
- [290] Kony, D. An improved OPLS-AA force field for carbohydrates / D. Kony, W. Damm, S. Stoll, W. F. Van Gunsteren // *J. Comp. Chem.* — 2002. — Vol. 23, no. 15. — P. 1416–1429.
- [291] Геннис, Р. Б. Биомембраны / Р. Б. Геннис. — МИР изд. — Москва : 1997. — С. 623.
- [292] Raetz, C. R. H. Lipid A modifications in Gram-negative bacteria / C. R. H. Raetz, C. M. Reynolds, M. S. Trent, R. E. Bishop // *Annu. Rev. Biochem.* — 2007. — Vol. 76. — P. 295–329.
- [293] Zhou, Z. Lipid A modifications in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium*: PmrA-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation / Z. Zhou, A. A. Ribeiro, S. Lin, et al. // *J. Biol. Chem.* — 2001. — Vol. 276, no. 46. — P. 43111–43121.
- [294] Gailani, D. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation / D. Gailani, G. J. Broze // *Science.* — 1991. — Vol. 253, no. 5022. — P. 909–912.
- [295] Scott, C. F. Inactivation of factor XIa by plasma protease inhibitors: predominant role of alpha 1-protease inhibitor and protective effect of high molecular weight kininogen /

- C. F. Scott, M. Schapira, H. L. James, et al. // J. Crit. Invest. — 1982. — Vol. 69, no. 4. — P. 844–852.
- [296] Van Dieijen, G. The role of phospholipid and factor VIII(a) in the activation of bovine factor X / G. Van Dieijen, G. Tans, J. Rosing, H. C. Hemker // J. Biol. Chem. — 1981. — Vol. 256, no. 7. — P. 3433–3442.
- [297] Jesty, J. Analysis of the generation and inhibition of activated coagulation factor X in pure systems and in human plasma / J. Jesty // J. Biol. Chem. — 1986. — Vol. 261, no. 19. — P. 8695–8702.
- [298] Rosenberg, J. S. Inhibition of human factor IXa by human antithrombin / J. S. Rosenberg, P. W. McKenna // J. Biol. Chem. — 1975. — Vol. 250, no. 23. — P. 8883–89.
- [299] Neuenschwander, P. F. Thrombin-activated and factor Xa-activated human factor VIII: Differences in cofactor activity and decay rate / P. F. Neuenschwander, J. Jesty // Arch. Biochem. Biophys. — 1992. — Vol. 296, no. 2. — P. 426–434.
- [300] Rosing, J. Role of phospholipids and factor-Va in the prothrombinase complex / J. Rosing, G. Tans, J. W. P. Goversriemslag, et al. // J. Biol. Chem. — 1980. — Vol. 255, no. 1. — P. 274–283.
- [301] Бутенас, С. Свертывание крови. Обзор / С. Бутенас, К. Г. Манн // Биохимия. — 2002. — Т. 67, № 1. — С. 5–15.
- [302] Krasotkina, Yu. V. Spatiotemporal dynamics of fibrin formation and spreading of active thrombin entering non-recalcified plasma by diffusion / Yu. V. Krasotkina, E. I. Sinauridze, F. I. Ataullakhanov // Biochim. Biophys. Acta — General Subjects. — 2000. — Vol. 1474, no. 3. — P. 337–345.

Приложение

1 Численное интегрирование модели из раздела 2 главы 3

Уравнения химических реакций. Пример дискретизацию уравнения на изменение концентрации тромбина (2.1.5):

$$\begin{aligned} \frac{T_{i,j}^{n+1} - T_{i,j}^n}{dt} + v_{x\ i,j}^n (T_{i,j}^n)_x^+ + v_{y\ i,j}^n (T_{i,j}^n)_y^+ = D \frac{T_{i+1,j}^n + T_{i,j+1}^n - 4T_{i,j}^{n+1} + T_{i-1,j}^n + T_{i,j-1}^n}{h^2} \\ + \left((k_3 B_{a\ i,j}^n) + \frac{k_4 (T_{i,j}^n)^3}{1 + k_5 C_{a\ i,j}^n} \right) P_{i,j}^n - k_a A_{i,j}^n T_{i,j}^n. \end{aligned} \quad (1.0.1)$$

Здесь dt — это шаг по времени, h — шаг по пространству. Мы рассматриваем схему против потока, то есть значение разностей принимают вид:

$$(T_{i,j}^n)_x^+ = \begin{cases} \frac{T_{i,j}^n - T_{i-1,j}^n}{h}, & \text{если } v_{x\ i,j}^n \geq 0, \\ \frac{T_{i+1,j}^n - T_{i,j}^n}{h}, & \text{если } v_{x\ i,j}^n < 0. \end{cases} \quad (1.0.2)$$

Поток. Рассматривается уравнение потока в двумерном случае:

$$\frac{\partial u_x}{\partial t} + u_x \nabla \frac{\partial u_x}{\partial x} + u_y \nabla \frac{\partial u_x}{\partial y} = -\frac{1}{\rho} \frac{\partial p}{\partial x} + \mu \left(\frac{\partial^2 u_x}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u_y}{\partial x^2} \right) - \frac{\mu}{K_f} u_x, \quad (1.0.3)$$

$$\frac{\partial u_y}{\partial t} + u_x \nabla \frac{\partial u_y}{\partial x} + u_y \nabla \frac{\partial u_y}{\partial y} = -\frac{1}{\rho} \frac{\partial p}{\partial y} + \mu \left(\frac{\partial^2 u_x}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 u_y}{\partial y^2} \right) - \frac{\nu}{K_f} u_y, \quad (1.0.4)$$

$$\nabla \vec{u} = 0. \quad (1.0.5)$$

Мы строим численное решение методом проекций [258], подробно описанным в [259]. На каждом шаге сначала проводится дискретизация нелинейных членов:

$$\frac{u_x^* - u_x^n}{dt} = -u_x^n (u_x^n)_x^+ - u_y^n (u_x^n)_y^+ - \frac{\mu}{K_f} u_x^n, \quad (1.0.6)$$

$$\frac{u_y^* - u_y^n}{dt} = -u_x^n (u_y^n)_x^+ - u_y^n (u_y^n)_y^+ - \frac{\mu}{K_f} u_y^n, \quad (1.0.7)$$

где члены $(u_x^n)^+$, $(u_y^n)^+$, $(u_x^n)^+$, $(u_y^n)^+$ получены дискретизацией против направления потока. Далее мы получали неявные значения для членов, описывающих вязкое трение, через вычисление промежуточной скорости:

$$\frac{u_x^{eq:1d**} - u_x^*}{dt} = \mu((u_x^{eq:1d**})_{xx} + (u_y^{eq:1d**})_{xx}), \quad (1.0.8)$$

$$\frac{u_y^{eq:1d**} - u_y^*}{dt} = \mu((u_x^{eq:1d**})_{yy} + (u_y^{eq:1d**})_{yy}). \quad (1.0.9)$$

Корректировка второй промежуточной скорости производилась с использованием неявного градиента давления:

$$\frac{u_x^{n+1} - u_x^{eq:1d**}}{dt} = -\frac{1}{\rho} \frac{\partial p^{n+1}}{\partial x}, \quad \frac{u_y^{n+1} - u_y^{eq:1d**}}{dt} = -\frac{1}{\rho} \frac{\partial p^{n+1}}{\partial y}. \quad (1.0.10)$$

Градиент давления $(\frac{\partial p^{n+1}}{\partial x}, \frac{\partial p^{n+1}}{\partial y})$ рассчитывался из уравнения Пуассона:

$$-\frac{1}{\rho} \Delta p^{n+1} = -\frac{1}{dt} \nabla \cdot u^n, \quad (1.0.11)$$

с использованием последовательного метода релаксации (ПМР). ПМР является итеративным методом, демонстрирующим более высокую скорость сходимости, чем метод Якоби или Гаусса-Зейделя. Следующая итерация повторялась до сходимости численного решения:

$$p_{i,j}^{k+1} = (1 - \omega) p_{i,j}^k + \frac{\omega}{4} (p_{i+1,j}^k + p_{i,j+1}^k + p_{i-1,j}^k + p_{i,j-1}^k) - \frac{\rho h^2}{2hdt} (u_{i+1,j}^n - u_{i-1,j}^n + u_{i,j+1}^n - u_{i,j-1}^n), \quad (1.0.12)$$

где релаксационный параметр ω для сетки размером $N_x \times N_y$ точек вычислялся по формуле:

$$\omega = 2 \left(1 + \sqrt{1 - \frac{(\cos(\pi/N_x) + \cos(\pi/N_y))^2}{2}} \right)^{-1}. \quad (1.0.13)$$

2 Параметры расчетов в главе 3

Таблица 5.6: Параметры расчетов в модели из раздела 1 главы 3.

параметр	значение	ед. изм.	источник
k_{11}	0.000011	мин ⁻¹	[294]
h_{11}	0.5	мин ⁻¹	[295]
k_{10}	0.00033	мин ⁻¹	[296]
$\overline{k_{10}}$	500	мин ⁻¹	[296]
h_{10}	1	мин ⁻¹	[297]
k_9	20	мин ⁻¹	[95]
h_9	0.2	мин ⁻¹	[298]
k_{89}	100	нМ ⁻¹ мин ⁻¹	[107]
h_{89}	100	мин ⁻¹	[107]
k_8	0.00001	мин ⁻¹	[107]
h_8	0.31	мин ⁻¹	[299]
k_5	0.17	мин ⁻¹	[107]
h_5	0.31	мин ⁻¹	[107]
k_{510}	100	нМ ⁻¹ мин ⁻¹	[107]
h_{510}	100	мин ⁻¹	[107]
k_2	2.45	мин ⁻¹	[300]
$\overline{k_2}$	2000	мин ⁻¹	[300]
h_2	1.45	мин ⁻¹	[92]
D	0.0037	мм ² мин ⁻¹	[107]
T_0	1400	нМ	[301]

Таблица 5.7: Параметры расчетов в модели из раздела 2 главы 3.

Параметр	Значение	Описание
Параметры расчетов		
dx	0.125 мкм	шаг по пространству
dt	0.005 с	шаг по времени
H	50 мкм	диаметр сосуда
L	250 мкм	длина участка
D	$0.5 \text{ мкм}^2 / 10^{-2} \text{ с}$	коэффициент диффузии
Константы реакций (в 10^2 с^{-1})		
k_1	0.1	образование фибрина из фибриногена [302]
k_2	1	полимеризация фибрина [302]
k_3	2500	образование тромбина на начальной стадии [302]
k_4	22.5	образование тромбина за счет реакций каскада свертывания [92]
k_5	3122.2	ингибирование каскада свертывания активированным протеином С [92]
k_6	$6 \cdot 10^{-6}$	активация факторов IX, X тканевым фактором [92]
k_b	0.05	ингибирование факторов IXa и Xa [44]
k_c	0.05	деградация активированного протеина С
k_7	1	скорость связывания комплекса [TF, FVIIa] с факторами IX и X [92]
k_8	9400	активация протеина С комплексом тромбина и тромбомодулина [92]
k_9	9400	скорость связывания протеина С с комплексом тромбина и тромбомодулина
k_a	0.68	связывание тромбина антитромбином [92]
Нормированные начальные концентрации		
T_F	0.5	активный комплекс ТФ и FVIIa
P_0	0.8	протромбин
A_0	0.35, 0.375, 0.4	антитромбин
B_0	1	факторы IX и X
C_0	1	протеин С
F_{g0}	1	фибриноген