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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва, 2017

Работа выполнена на кафедре биофизики биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель:

**Рубин Андрей Борисович**,
доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой биофизики биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова.

Официальные оппоненты:

**Лобанов Алексей Иванович,**
доктор физико-математических наук, профессор Московского физико-технического института

**Бовин Николай Владимирович**,
доктор химических наук, профессор, руководитель отдела
Института биоорганической химии РАН

**Чугунов Алексей Олегович**,
кандидат физико-математических наук, с.н.с. Института биоорганической химии РАН

Защита диссертации состоится 19 октября 2017 г. в 17 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.01.04 Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, д. 1, строение 2.
E-mail: biophys.dissovet@physics.msu.ru
С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М. В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: `https://istina.msu.ru/dissertation_councils/councils/28357490/`

Автореферат разослан « __ » _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета МГУ.01.04,
кандидат технических наук А. Э. Сидорова

## Общая характеристика работы

Работа посвящена исследованию надмолекулярный структуры липополисахаридов (ЛПС), их агрегатов и мембран методами молекулярной динамики (МД), а также исследованию различных аспектов активации свертывания крови при сепсисе при помощи математических моделей.

**Актуальность исследования.** Развитие сепсиса при инфекционном заражении является одной из наиболее распространенных причин смертности в больницах. Одним из осложнений при сепсисе является синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания, который характеризуется образованием тромбов по всему организму, ведущему к отказу жизненно важных органов. Наиболее распространенной причиной развития сепсиса являются грамотрицательные инфекции, реакция на которые связана, в первую очередь, с попаданием в кровь компонентов клеточной стенки бактерий (рис. 1 A) — липополисахаридов (ЛПС). ЛПС крайне иммуногенны, а также активируют моноциты и нейтрофилы и вызывают апоптоз клеток эндотелия [1]. В результате, попадание ЛПС в кровь ведет к активации плазменного звена системы свертывания крови (рис. 1 B), и, возможно, тромбоцитов, что провоцирует образование тромбов. Ингибирование системы свертывания крови приводит к подавлению спонтанного тромбообразования, снижает уровень воспалительного ответа и улучшает выживаемость при сепсисе [1].

Несмотря на значительный прогресс в описании отдельных компонентов системы свертывания, суммарный ответ этой системы на возмущение часто невозможно предсказать, исходя из экспериментальных наблюдений. В связи с этим, ключевую роль в исследовании тромбообразования играет моделирование. Модели тромбообразования в различных условиях позволяют воспроизвести два основных свойства системы свертывания — поро-

говый ответ на возмущение и быстрый рост сгустка. Основополагающая гипотеза, объясняющая такое поведение системы, была сформулирована в работе Атауллаханова и Гурии в 1994 году [2]. Было предположено, что процесс нарастания концентрации тромбина в пространстве, имеет автоволновую природу, что было подтверждено в многочисленных *in vitro* и *in silico* экспериментах [3, 4]. При этом, аналитически модели свертывания крови исследованы в существенно меньшей степени из-за сложности рассматриваемой системы. Основные теоретические результаты получены либо для пространственно однородных систем [5, 6], либо для распределенных моделей, включающих в себя минимальное количество переменных [7].

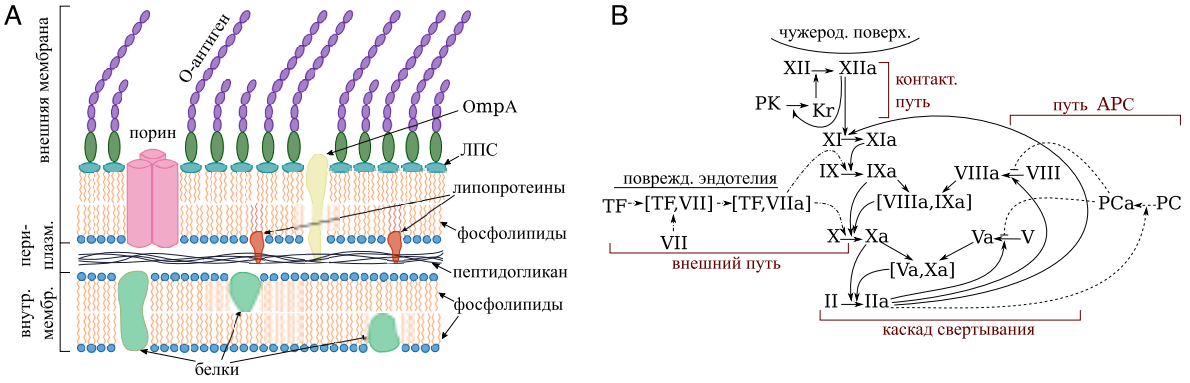


Рис. 1: Схематическое изображение структуры клеточной стенки грамотрицательной бактерии (A) и схема основных реакций каскада свертывания крови (B).

Моделирование процесса тромбообразования существенно осложняется влиянием геометрии сосуда на динамику формирования сгустка. Размер повреждения и скорость потока играют ключевую роль при образовании тромба вблизи поврежденной стенки сосуда в случае запуска внешнего пути каскада свертывания [3, 4]. Активация контактной системы на инородных объектах в плазме, в свою очередь, зависит от площади и структуры поверхности активатора [8]. Роль ЛПС в этом процессе продемонстрирована в экспериментах *in vitro* [9].

Структура молекул ЛПС влияет на их взаимодействие с клетками хозяина, на устойчивость бактерий к антибиотикам [10, 11] и на биологическую активность образуемых ими агрегатов [12]. Природу наблюдаемых различий часто невозможно объяснить, не принимая во внимание пространственную организацию ЛПС. Экспериментальное исследование трехмерной организации ЛПС осложняется неоднородностью их химической структуры и конформаций, что особенно критично для О-антигена, имеющего длину до сотен гексапиранозных остатков [13]. 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 отсутствием у О-антигенов предопределенного фолда. Более того, фолдинг О-антигенов всегда происходит среди других молекул и существенно зависит от окружения.

В последние годы начали появляться работы, посвященные моделированию ЛПС-содержащих систем методами МД. Конформационная динамика ЛПС в мембранном окружении была исследована для моделей мембран *E. coli* [14–16], однако поведение О-антигена было рассмотрено на минимальном, качественном уровне. Более подробные исследования подвижности О-антигенов были проведены для свободных фрагментов О-антигена в растворе [17–19]. В то же время, вопросы о влиянии выбора силового поля и начальных условий на результаты моделирования все еще требуют исследования. В перспективе, аккуратно верифицированные МД модели позволят пролить свет на молекулярные детали взаимодействия клеток грамотрицательных бактерий, а также фрагментов их клеточной стенки и агрегатов ЛПС с клетками организма хозяина и белками каскада свертывания крови.

**Цели и задачи исследования**

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.

**Методы исследования.** Основными методами, использованными в исследовании, являлись разработка и анализ математических моделей, описывающих разные стадии процесса свертывания крови, а также МД моделирование 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. typhimurium*, как в растворе, так и в мембранном окружении, является переход в *анти-*$\psi$ 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-антигенных 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.

**Личный вклад автора** состоял в систематизации литературных данных, численном моделировании и теоретическом анализе математических моделей свертывания крови, а также в построении моделей и проведении расчетов МД для ЛПС-содержащих систем и анализе полученных результатов.

**Апробация работы.** Результаты работы были представлены на 12 научных конференциях (в том числе, на 8 международных конференциях).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 6 статей в рецензируемых изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI.

**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.

## Основное содержание работы

Во **введении** к работе сформулирована актуальность рассматриваемой темы, цели и задачи исследования, показаны научная новизна и практическая значимость работы.

В **первой главе** приводится литературный обзор, посвященный экспериментальным и теоретическим аспектам динамики свертывания крови, роли ЛПС в этом процессе, а также обзор существующих данных о пространственной структуре ЛПС-агрегатов и ЛПС-мембран и о ее влиянии на степень биологической активности ЛПС.

Во **второй главе** описаны использованные методы. Интегрирование реакционно-диффузионных моделей, описывающих основные реакции каскада свертывания крови, рассматриваемых в разд. 1 гл. 3, производилось в среде MATLAB с использованием встроенного функционала `pdepe`. Моделирование распределенной системы, рассматриваемой в разд. 2 гл. 3, проводилось с помощью программы на C++, написанной аспирантом университета Лион 1 Анассом Бушнита. Кинетические модели активации контактного пути были проинтегрированы с использованием метода LSODA программы COPASI. Доказательства существования решений типа пульс в модели основных реакций каскада свертывания проводилось с помощью метода Лере-Шаудера. МД расчеты были проведены с использованием программного пакета GROMACS версии 5.1.X в силовых полях OPLS-AA и GLYCAM. Для анализа конформаций полисахаридных цепей были рассмотрены двугранные углы вокруг O-гликозидных связей. Расчет недостающих параметров модели молекулы ЛПС проводился методами *ab initio* с использованием пакета Firefly 8 в базисе 6-31G+(1p,1d) с функционалом B3LYP5 (DFT).

В **третьей главе** проведен теоретический анализ различных стадий процесса свертывания крови: инициации, распространения и остановки роста тромба, а также переходных режимов с помощью математических моделей. В разд. 1 гл. 3 рассматривается одномерная реакционно-диффузионная модель основных реакций каскада свертывания крови, описывающая

этап распространения волны концентрации тромбина:

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

где $T$ — концентрация тромбина, $v_i,\ i = 1, \ldots, 5$ — концентрации факторов V, VIII, XI, IX и X, соответственно. Система монотонна, рассматривается двуустойчивый случай. Если мы используем квази-стационарное приближение и выразим все переменные, кроме $T$, как функции $T$ и подставляем их в первое уравнение, то стационарные точки полученного уравнения $\frac{\partial T}{\partial t} = \Delta T + P(T)$ $(1^*)$ совпадают со стационарными решениями системы (1), что позволяет нам сформулировать следующую теорему:

**Теорема.** *Предположим, что* $P(T^-) = 0$ *для некоторого* $T^- > 0$ *и* $P'(0) \neq 0,\ P'(T^-) \neq 0$. *Пусть* $\mathbf{w}^*$ *— соответствующая стационарная точка системы (1). Если существует положительный корень полинома* $P(T)$ *в интервале* $0 < T < T^-$, *то система (1) обладает монотонно убывающим автоволновым решением* $\mathbf{w}(x,t) = \mathbf{u}(x - ct)$ *уравнения*

$$\mathbf{D}\mathbf{u}'' + c\mathbf{u}' + \mathbf{F}(\mathbf{u}) = \mathbf{0},\ \mathbf{u}(\pm\infty) = \mathbf{w}^{\pm}, \tag{2}$$

*для единственного значения скорости* $c$.

Было доказано, что положительность скорости $c$ в уравнении (2) является необходимым и достаточным условием существования стационарных решений типа пульс в системе (1), определяющим величину критического начального условия для начала распространения автоволны. Скорость

распространения автоволны $c$ в системе (1) приближена через аналитические оценки скорости автоволны в уравнении (1*), используя доказанную теорему:

**Теорема.** *Скорость распространения автоволны в системе (1) стремится к скорости распространения автоволны в уравнении (1*) при скоростях реакций правой части для всех факторов свертывания, кроме тромбина, стремящихся к бесконечности.*

В разд. 2 гл. 3 нами рассмотрена модель типа реакция-диффузия-конвекция активации внешнего пути при повреждении стенки сосуда. В модели учитывается роль потока и пути активированного протеина С в регуляции роста тромба. Мы рассматривали переходные режимы между полной и частичной закупоркой сосуда в зависимости от различных параметров системы с использованием численного моделирования (рис. 2 A,B) и теоретического анализа упрощенной модели. Основным результатом данной части работы является оценка критического размера повреждения стенки сосуда, равного $\sim 50$ мкм при скорости потока 400 мкм/с и $\sim 90$ мкм для скорости потока 1000 мкм/с (рис. 2 C) для венулы диаметра 50 мкм.

В разд. 3 гл. 3 рассмотрена кинетическая модель активации контактного пути ЛПС, построенная на основании доступных *in vitro* данных и учитывающая поверхностные эффекты, имеющие решающее значение для активации фактора XII и прекалликреина. Данная модель воспроизводит экспериментальную зависимость наработки калликреина от концентрации ЛПС (рис. 2 D) и позволяет сделать предварительные выводы о влиянии агрегатного состояния ЛПС на активацию контактной системы.

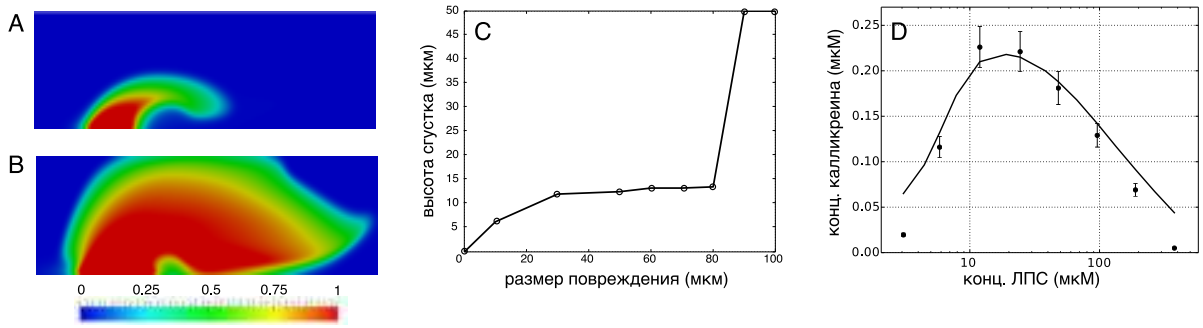


Рис. 2: Режимы частичной (A) и полной (B) закупорки сосуда и размер сгустка при разных размерах повреждения (C) в модели активации внешнего пути. Степень активации контактной системы для разных концентраций ЛПС в модели и эксперименте (D).

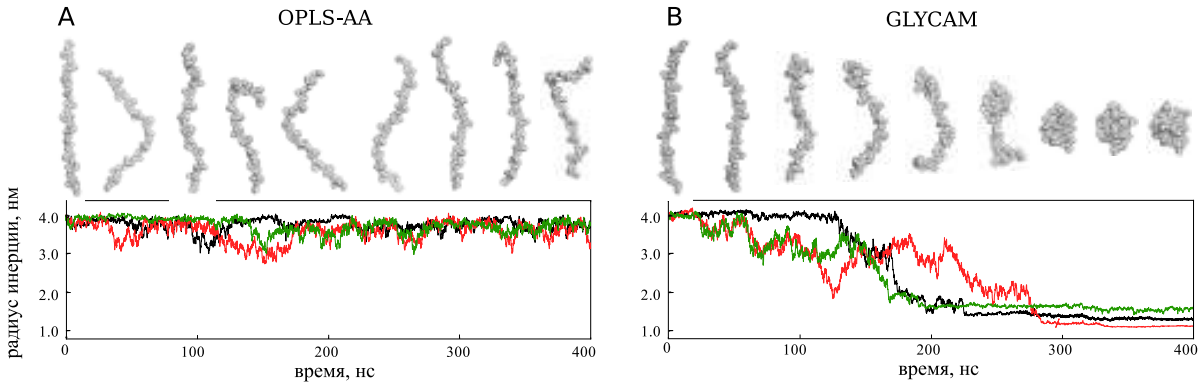


Рис. 3: Радиус инерции цепи O-антигена в 400 нс расчетах в силовых полях OPLS-AA (A) и GLYCAM (B) при температуре 300 K. Конформации цепи изображены для расчетов, соответствующим красным графикам с шагом по времени в 50 нс

**Четвертая глава** посвящена моделированию пространственной структуры ЛПС *S. typhimurium*, их агрегатов и мембран методами МД. Структура центрального олигосахарида и O-антигена этой молекулы, были рассмотрены в раннем модельном исследовании [20]. Структура Re-LPS была получена в нашей лаборатории с помощью методов масс-спектрометрии. Так как O-антиген является наиболее объемной и вариабельной частью ЛПС, то, в первую очередь, мы разработали две МД модели цепочки O-антигена *S. typhimurium* B с использованием силовых полей OPLS-AA и GLYCAM и проанализировали их конформационное поведение в раство-

ре (разд. 1). Наши модели продемонстрировали качественно новое конформационное поведение, которое не может быть выведено из анализа динамики более коротких олигосахаридов: в обеих моделях мы наблюдали образование шпилек и компактных глобул. В обеих моделях основной причиной формирования шпилек является переход связи Man-Rha в состояние $A_\psi$, однако только в поле GLYCAM подобные переходы необратимы (рис. 3). Причина наблюдаемого различия лежит в существенно более низком значении свободной энергии состояния *анти-*$\psi$ Man-Rha связи, оцененного нами по результатам 1 мкс расчетов для дисахаридных фрагментов О-антигена, проведенных для обоих силовых полей (рис. 4). Для оценки свободных энергий конформаций был использован метод расчета потенциала средней силы (PMF), в основе которого лежит оценка относительных заселенностей различных конформаций (разд. 1). Анализ косвенных экспериментальных данных и сравнение полученных распределений свободной энергии с профилями *ab initio* энергии позволяет нам сделать вывод в пользу дальнейшего использования поля OPLS-AA для моделирования ЛПС-структур.

Затем, используя в качестве основного параметр плотность упаковки модельных липидов (ApL), была проведена валидация параметров модели липидной части ЛПС (разд. 2). Наилучшее соответствие экспериментальным данным для простых фосфолипидов было достигнуто при использовании недавно опубликованного набора параметров [21] (рис. 5). Мы также провели корректировку отсутствующих в силовом поле параметров для фрагментов полярной головки липида А и центрального олигосахарида с использованием методов *ab initio* (разд. 3). В частности, были рассчитаны парциальные заряды атомов не описанных в поле фрагментов, а также скорректированы параметры некоторых торсионных углов.

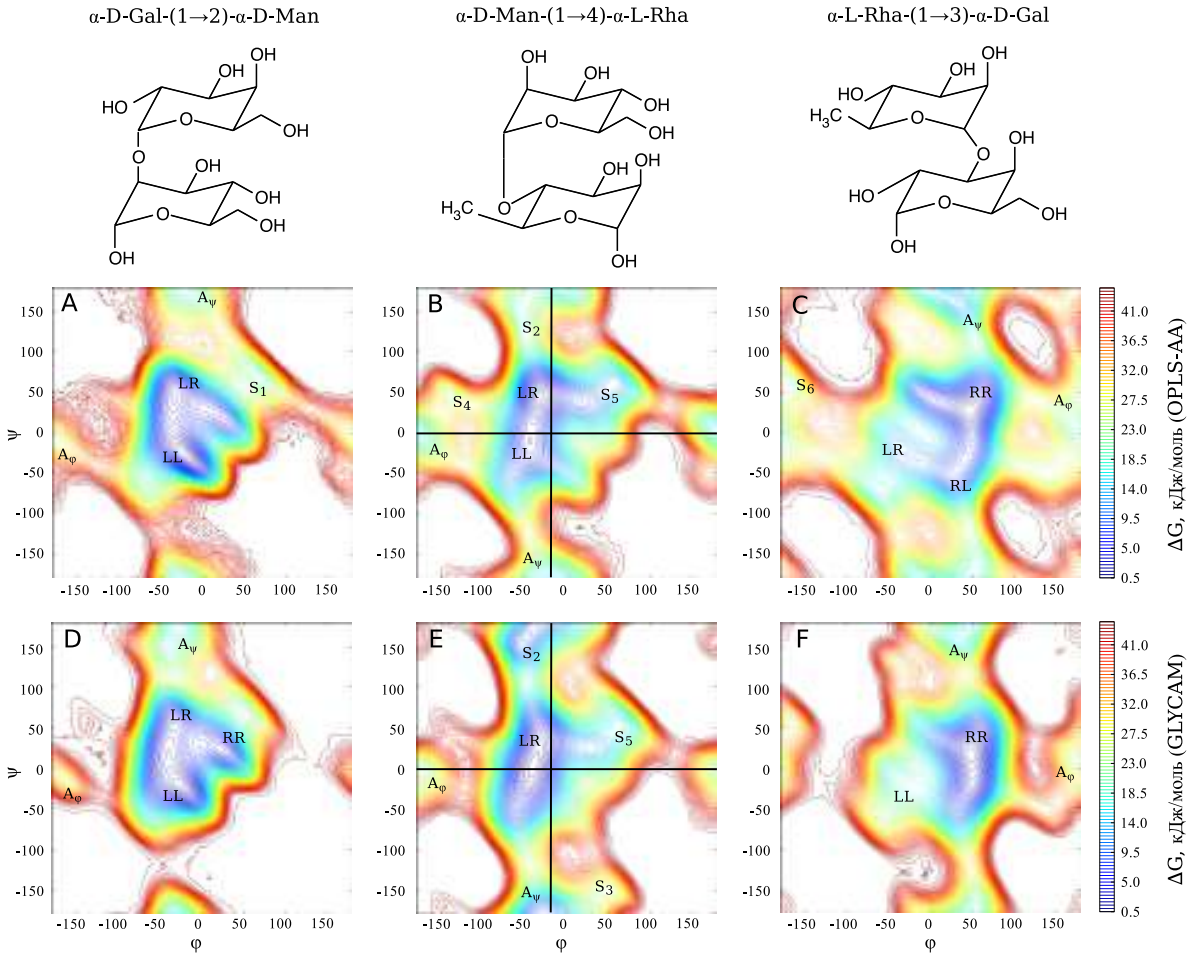


Рис. 4: Распределения свободной энергии, рассчитанные методом PMF, в координатах двугранных углов $(\varphi, \psi)$ для дисахаридов Gal-Man, Man-Rha и Rha-Gal в вакууме при температуре 500 K. Расчеты проводились в силовых полях OPLS-AA (верхний ряд) и GLYCAM (нижний ряд). Буквами отмечены локальные энергетические минимумы.

Полученные параметры были использованы для создания моделей ЛПС-молекул (разд. 4) и ЛПС-содержащих систем (мицелл и мембран). Были рассмотрены модели мицелл, состоящих из $N$ молекул Re-, Ra- и S-LPS, где $N = 4,\ 6,\ 8,\ 14$ (рис. 6 A), и для уравновешенных в растворе структур была оценена площадь гидрофобной поверхности липида A, экспонированной в раствор (разд. 5). Эта величина убывает с увеличением числа молекул, входящих в состав мицеллы, а также снижается с увеличением углеводной составляющей молекул ЛПС (рис. 6 B). Тем не менее, для всех

полученных агрегатов ее величина достаточно велика, что свидетельствует о склонности ЛПС к формированию агрегатов, содержащих большее количество молекул, чем может быть исследовано в рамках МД моделирования. При этом, взаимодействующие друг с другом цепочки О-антигена существенным образом влияют на структуру гидрофобной части мицелл.

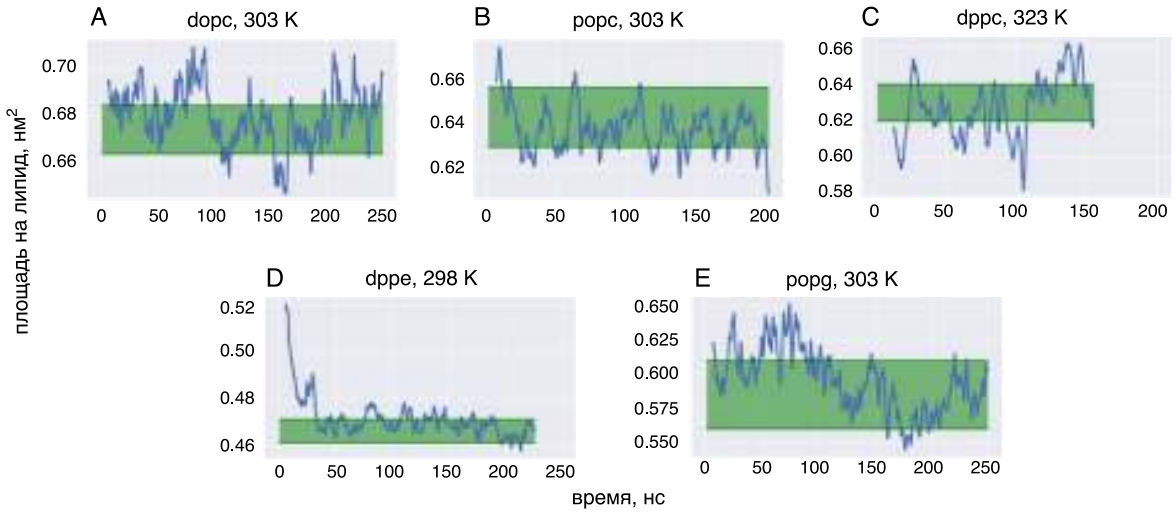


Рис. 5: Значения площади на липид в расчетах для модельных бислоев. Зеленым отмечена область, соответствующая экспериментальным данным.

В разд. 6 четвертой главы представлены результаты МД расчетов для двух моделей наружной мембраны грам-отрицательных бактерий. Первая модель представляла собой чистый ЛПС бислой, один из монослоев которого состоял из Ra-LPS, в то время как половина молекул второго монослоя несла на себе О-антиген. Вторая модель представляла собой бислой Ra-LPS/S-LPS, пронизанный мембранными $\beta$-бочонками молекул белка OmpA. В качестве стартовой конформации О-антигенных цепей в каждой модели была выбрана энергетически выгодная спиральная структура, построенная на основе анализа подвижности свободного О-антигена в растворе, а также полученных для дисахаридных фрагментов распределений свободной энергии по конформациям (рис. 4). Локальная конформационная подвижность О-антигенных цепей хорошо соответствует результатам,

полученным для свободных О-антигенов. Для О-антигенов *S. typhimurium* в мембранном окружении характерно образование шпилек за счет перехода О-гликозидной связи между остатками маннозы и ранозы, как это имело место для дисахаридов и свободных цепей. Тем не менее, глобальная архитектура О-антигенного слоя существенно зависти от выбора модели.

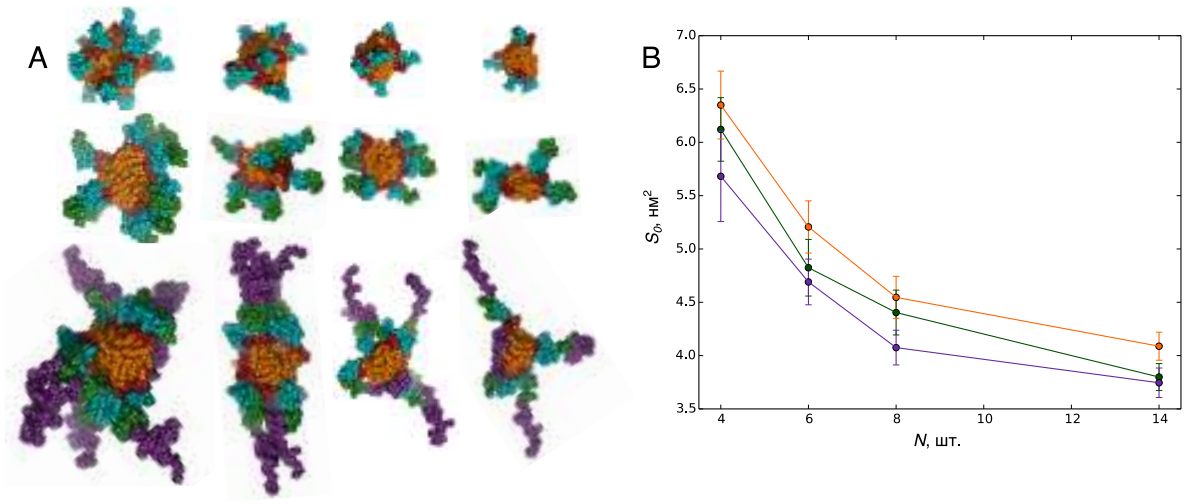


Рис. 6: Структура (A) и площадь экспонированной в раствор гидрофобной поверхности (B) ЛПС-мицелл в МД расчетах.

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. 7 A) и высокую плотность. Наличие молекул белков в ЛПС-бислое ведет к образованию неравномерно распределенных полостей между несущими О-антиген молекулами ЛПС. О-антигены в этой модели 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 $1\,\text{нм}^3$, разделенные областями пространства, занятыми плотно переплетенными цепочками О-антигена.

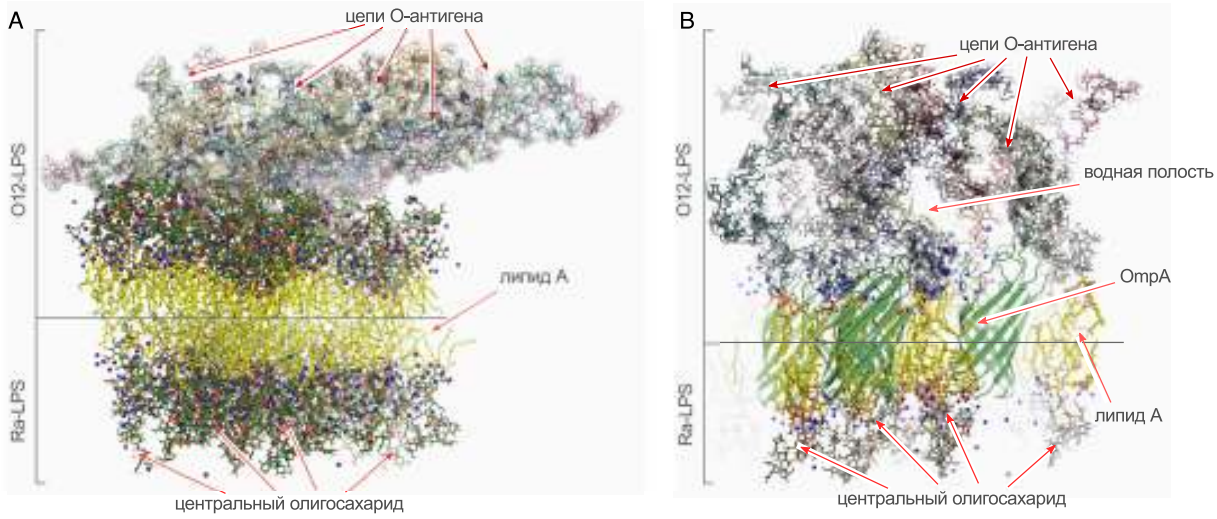


Рис. 7: Финальная структура модели бактериальной мембраны Ra-LPS/Ra-LPS & O12-LPS (A) и мембраны Ra-LPS/O12-LPS/OmpA после 500 нс уравновешивающих МД расчетов.

В последнем разделе четвертой главы получены предварительные результаты по моделированию бислоев ЛПС с модифицированным липидом А. Проведено сравнение ApL для ЛПС, содержащих в составе липида А один, два или ни одного остатка 4-амино-L-арабинозы (Ara4N). Этот положительно заряженный остаток снижает общий отрицательный заряд молекулы ЛПС (что повышает устойчивость бактерий), а также потенциально способен влиять на плотность упаковки молекул в бислое, так как располагается по бокам от остатков глюкозы в составе липида А. В нашей модели добавление остатков двух остатков Ara4N увеличивает ApL в $\sim 1.2$ раза по сравнению с немодифицированным ЛПС-бислоем. Наблюдаемое увеличение площади при добавлении Ara4N не было обнаружено ранее [22] из-за различий в количестве ацильных цепей в составе рассмат-

риваемых ЛПС. Тем не менее, изменение ApL оказывает влияние на плотность упаковки О-антигенов, а значит, может существенное влиять на их конформационную подвижность в случае использования модифицированных молекул для моделирования мембран гладких штаммов.

В **заключении** сформулированы основные результаты и выводы диссертационной работы. В **приложении** приведены численные схемы и значения параметров, использованные для интегрирования моделей из третьей главы.

## Основные результаты и 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 по-

врeждения на стенке сосуда ($\sim$ 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 $\sim$ 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 **TppMkTop**. Недостающие силовые параметры были рассчитаны с использованием методов *ab initio*. Силовые параметры ацильных цепей валидированы в уравновешивающих 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 мем-

бранном кружении, является переход в *анти-$\psi$* 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 Ara4N в составе липида А. Показано, что добавление Ara4N 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.

# Список литературы


[1] J. Cohen // Nature. — 2002. — Vol. 420, no. 6917. — P. 885–91.

[2] Ф. И. Атауллаханов, Г. Т. Гурия // Биофизика. — 1994. — Т. 39, № 1. — С. 89–95.

[3] K. Guria, G. Guria // Thromb. Res. — 2015. — Vol. 135, no. 3. — P. 423–433.

[4] M. A. Panteleev, N. M. Dashkevich, F. I. Ataullakhanov // Thromb. Res. — 2015. — Vol. 136, no. 4. — P. 699–711.

[5] K. G. Mann // J. Thromb. Haemost. — 2012. — Vol. 10, no. 8. — P. 1463–1469.

[6] H. C. Hemker, S. Kerdelo, R. M. W. Kremers // J. Thromb. Haemost. — 2012. — Vol. 10, no. 8. — P. 1470–1477.

[7] F. I. Ataullakhanov, M. A. Panteleev // Pathophysiol. Haemost. Thromb. — 2005. — Vol. 34. — P. 60–70.

[8] C. Maas, T. Renné // Thromb. Res. — 2012. — Vol. 129, no. SUPPL. 2. — P. S73–S76.

[9] E. S. Kalter, W. C. van Dijk, A. Timmerman, et al. // J. Inf. Diseases. — 1983. — Vol. 148, no. 4. — P. 682–691.

[10] E. T. Rietschel, T. Kirikae, F. U. Schade, et al. // FASEB J. — 1994. — Vol. 8. — P. 217–225.

[11] H. I. Zgurskaya, C. A. Lopez, S. Gnanakaran // Infect. Dis. — 2015. — Vol. 1, no. 11. — P. 512–522.

[12] M. Mueller, B. Lindner, S. Kusumoto, et al. // J. Biol. Chem. — 2004. — Vol. 279, no. 25. — P. 26307–26313.

[13] G. L. Murray, S. R. Attridge, R. Morona // J. Bacteriol. — 2006. — Vol. 188, no. 7. — P. 2735–2739.

[14] E. L. Wu, O. Engström, S. Jo, et al. // Biophys. J. — 2013. — Vol. 105, no. 6. — P. 1444–1455.

[15] E. L. Wu, P. J. Fleming, M. S. Yeom, et al. // Biophys. J. — 2014. — Vol. 106, no. 11. — P. 2493–2502.

[16] D. S. Patel, S. Re, E. L. Wu, et al. // Biophys. J. — 2016. — Vol. 110, no. 4. — P. 930–938.

[17] M.-J. Clement, A. Imberty, A. Phalipon, et al. // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278, no. 48. — P. 47928–47936.

[18] Y. Kang, S. Barbirz, R. Lipowsky, M. Santer // J. Phys. Chem. B. — 2014. — Vol. 118. — P. 2523–2534.

[19] P. Blasco, D. S. Patel, O. Engstrom, et al. // Biochemistry. — 2017. — Vol. 56, no. 29. — P. 3826–3839.

[20] M. Kastowsky, T. Gutberlet, H. Bradaczek // J. Bacteriol. — 1992. — Vol. 174, no. 14. — P. 4798–4706.

[21] W. Kulig, M. Pasenkiewicz-Gierula, T. Rog // Chem. Phys. Lipids. — 2016. — Vol. 195. — P. 12–20.

[22] S. Kim, D. S. Patel, S. Park, et al. // Biophys. J. — 2016. — Vol. 111, no. 8. — P. 1750–1760.

## Публикации по теме диссертации

**Статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых 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 lipopolysaccharide 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.

**Тезисы конференций:**

1. **T. 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 грам-отрицательной бактерии. III Всероссийская конференция «Фундаментальная гликобиология». Владивосток, Россия. 2016.

5. **T. 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. **Т. В. Галочкина**, Д. В. Зленко, И. Б. Коваленко, А. М. Нестеренко. 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. **T. Galochkina**, A. Nesterenko, D. Zlenko, I. Kovalenko. 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.