

## МОДЕЛИРОВАНИЕ СЕКРЕЦИИ ГРАНУЛ ПРИ АКТИВАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕРЕЗ TLR4-РЕЦЕПТОР

© 2018 г. А.С. Майоров\* \*\* \*\*\*, Т.О. Шепелюк\* \*\* \*\*\*, Ф.А. Балабин\*\*, А.А. Мартьянов\* \*\* \*\*\*, Д.Ю. Нечипуренко\* \*\* \*\*\*, А.Н. Свешникова\* \*\* \*\*\*

\*Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские Горы, 1/2

\*\*Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4

\*\*\*Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Д. Рогачева, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1

\*\*\*\*Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ломоносовский просп., 27/1

E-mail: ne4ipur@gmail.com

Поступила в редакцию 05.12.17 г.

После доработки 08.03.18 г.

Проведено теоретическое исследование возможности активации тромбоцитов крови компонентами клеточной стенки грамотрицательных бактерий – липополисахаридами – через TLR4-рецептор. Построены полная и редуцированная математические модели сигнального каскада в тромбоците, запускаемого TLR4-рецептором, которые учитывают известные особенности внутриклеточной сигнализации и содержания белков-участников сигнального каскада TLR4 в тромбоците человека. Из результатов моделирования следует, что в крови здоровых доноров, возможно, в недостаточном количестве присутствует белок CD14, необходимый для активации тромбоцитов липополисахаридами через TLR4-рецептор. Полученные результаты позволяют предположить, что тромбоциты крови могут активироваться липополисахаридами через TLR4-рецептор только в состояниях сильной активации иммунной системы, когда концентрация белка CD14 в крови возрастает.

*Ключевые слова:* внутриклеточная сигнализация, липополисахариды, кишечная палочка, свертывание крови.

Реакция организма на бактериальную инфекцию в кровотоке является комплексным ответом, в котором участвуют клетки и компоненты иммунной системы, системы свертывания крови и эндотелия с дополнением со стороны регуляторных органов. Даже взаимодействие одной из перечисленных систем, системы свертывания крови, с бактериальной инфекцией является многогранным: тромбоциты агрегируют вокруг бактерий, активируются бактериями, фагоцитируют бактерии, узнают бактериальные паттерны и выпускают антимикробные агенты. Во всех вышеперечисленных случаях тромбоциты запускают иммунный ответ организма. В свою очередь, бактерии образуют колонии на воспаленном эндотелии и тромбах, что позволяет им закрепиться в условиях кровотока. Ко-

лонии бактерий могут также «скрываться» внутри тромба от иммунитета. При этом все вышеперечисленные ответы тромбоцитов на молекулярном уровне специфичны не только для рода, но иногда и для штамма патогенных бактерий [1].

Самой распространенной экспериментальной моделью бактериальной инфекции является непосредственное введение в кровоток компонентов клеточной стенки грамотрицательных бактерий – липополисахаридов (ЛПС) [2]. Несмотря на то, что это приводит к активации свертывания крови, вклад активации тромбоцитов в этом процессе не изучен [3]. В то время как большинство исследователей наблюдает активацию тромбоцитов в присутствии патогенных штаммов кишечной палочки, молекулярный механизм активации тромбоцитов в этом случае также остается неизвестным [4,5]. Некоторые работы свидетельствуют об активации тромбоцитов через FcγRIIa-рецептор [4,5].

Сокращения: ЛПС – липополисахарид(ы), TLR – toll-подобный рецептор, LBP – LPS-binding protein (плазменный белок, связывающий липополисахарид и доставляющий его к белку CD14).

Один из возможных путей для взаимодействия клеток иммунной системы и кишечной палочки – активация Toll-подобными рецепторами (TLR), взаимодействующими с ЛПС [6]. TLR4 – основной рецептор к ЛПС – запускает в ядерных клетках активацию фактора транскрипции NFκB, опосредующего большинство активационных ответов [7]. Несмотря на то, что TLR4 рецепторы присутствуют на мембранах тромбоцитов [8], их потенциальное действие остается неизвестным, так как тромбоциты являются безъядерными клетками. Высказывались предположения, что NFκB может стимулировать трансляцию белков с тромбоцитарной мРНК [9,10].

Существующие математические модели TLR4-сигнализации были разработаны для ядерных клеток, и ключевым индикатором активации клеток в этих моделях является синтез таких белков как TNFα и IκBα [11]. В результате подобные модели неприменимы к безъядерным клеткам, которыми являются тромбоциты.

Известно, что одним из важнейших ответов тромбоцита при его активации является секреция гранул. Тромбоциты содержат три основных типа гранул: плотные гранулы, альфа-гранулы и лизосомы. Плотные гранулы содержат малые молекулы, такие как АТФ, АДФ и серотонин, в то время как альфа-гранулы содержат большое разнообразие белков с различными функциями: митогены, цитокины, факторы свертывания, белки клеточной адгезии (в том числе Р-селектин, трансмембранный белок альфа-гранул, который детектируется на поверхности тромбоцита при их секреции), факторы роста и т.д. Наконец, лизосомы содержат кислые гидролазы и протеазы [12,13]. Таким образом, если имеет место ЛПС-индуцированное высвобождение содержимого гранул, то этот процесс ведет к локальному появлению более сотни биологически активных веществ, модулирующих в том числе и иммунный ответ организма.

В настоящем исследовании описывается разработка и анализ математической модели описанных выше процессов, а именно: активации тромбоцита через TLR4-рецептор молекулами ЛПС в плазме крови, последующей активации каскада внутриклеточной сигнализации, которая приводит к активации IκK, что влияет на секрецию гранул. При построении модели использованы литературные данные о содержании различных белков в тромбоцитах человека и константах взаимодействия ферментов в каскаде TLR4-индуцируемой активации. Модель бы-

ла валидирована на литературных данных [14, 15], описывающих активацию тромбоцитов крови пептидным лигандом TLR4. В результате работы показано, что активация тромбоцитов через TLR4-рецептор липополисахаридами теоретически возможна только в острой фазе воспаления.

## МЕТОДЫ ПОСТРОЕНИЯ, ИНТЕГРИРОВАНИЯ И ВАЛИДАЦИИ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ

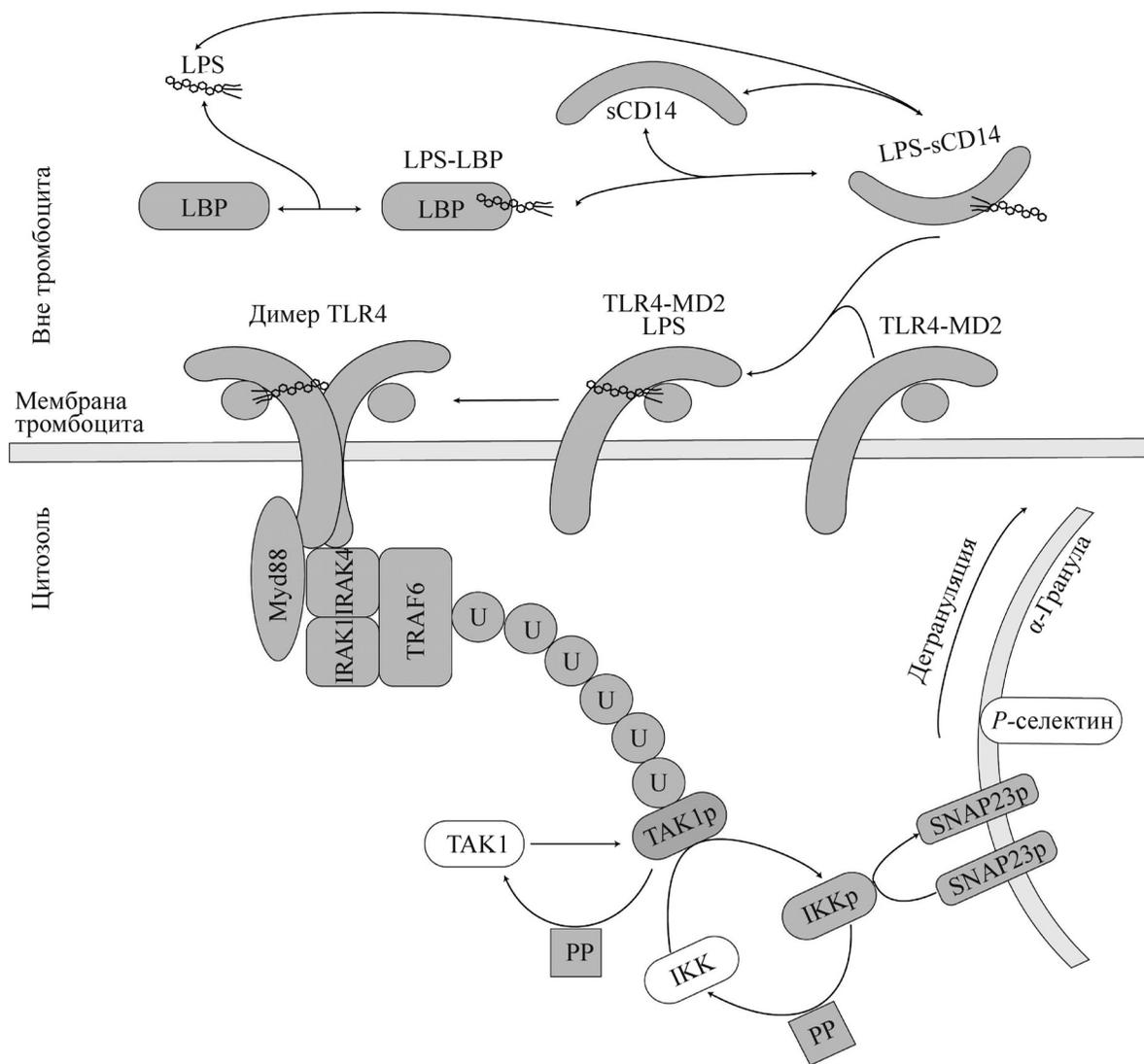
Исходная математическая модель представляет собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений (см. Приложение), описывающих реакции, изображенные на рис. 1, и проходящие в трех компартментах – внеклеточном пространстве, плазматической мембране и цитоплазме клетки. Уравнения записаны согласно закону действующих масс (при взаимодействии ферментов) или уравнению Михаэлиса–Мэнтен. Для моделирования был выбран геометрический домен, соответствующий тромбоциту объемом 5 фл, и суммарной площадью плазматической мембраны 100 мкм<sup>2</sup>. Внеклеточное пространство считалось бесконечно большим – в расчетах пренебрегали изменением концентрации веществ во внеклеточном пространстве. Уравнения и реакции модели приведены в Приложении.

Исходная система уравнений была редуцирована применением квазистационарного приближения к концентрации промежуточных соединений.

Интегрирование системы обыкновенных дифференциальных уравнений проводили методом LSODA [16,17], реализованном в программе COPASI [18]. Подбор неизвестных параметров модели проводили методом эволюционного программирования [19] с размером популяции, равным 200.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

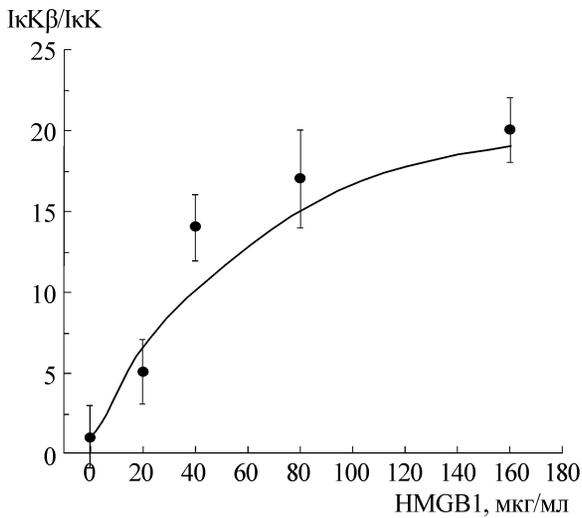
**Последовательность событий при активации тромбоцита через TLR4-рецептор.** В настоящей работе предполагалось, что на поверхности тромбоцита присутствует около тысячи TLR4-рецепторов [8,20], которые распределены равномерно. Для активации TLR4-рецептора липополисахаридом необходимо связывание двух молекул ЛПС с двумя независимыми рецепторами, что приводит к димеризации комплексов «лиганд–рецептор» (рис. 1) [21]. Экспериментально измеренная константа диссоциации комплекса ЛПС с TLR4 составляет 140 мкМ [22]. Эта константа значительно выше известных из



**Рис. 1.** Схема комплексов, образуемых при стимуляции тромбоцитов липополисахаридами. Реакции протекают в четырех компартментах – в плазме, на плазматической мембране тромбоцита, в цитозоле и на мембране гранул. Первым этапом активации является сборка комплекса ЛПС и sCD14, протекающая в плазме, затем происходит связывание комплекса ЛПС-sCD14 с рецептором TLR4, приводящее к его димеризации. После этого происходит образование миддисомы, что в свою очередь приводит к активации TAK1-киназы, которая активирует ИКК. Финальным этапом сигнализации является фосфорилирование SNAP23 с последующей дегрануляцией тромбоцита.

литературы концентраций ЛПС, достаточных для активации свертывания крови. Известно, что на ядерных клетках, взаимодействующих с ЛПС, присутствует мембранный кофактор TLR4-рецептора, белок CD 14 [23], который связывает ЛПС с мембраной клетки и «доставляет» его к TLR4-рецептору. Константа диссоциации комплекса CD14 с ЛПС составляет 2–9 мкМ [22]. Изначально на мембране тромбоцитов нет кофактора CD14, однако его растворимая форма sCD14 появляется в плазме при активации макрофагов и может способствовать доставке ЛПС к TLR4 из раствора [24]. У здорового человека

концентрация sCD14 в плазме не превышает 1,5 мкг/мл [23]. Увеличение концентрации sCD14 вплоть до 5 мкг/мл происходит при различных патологических процессах, таких как ВИЧ-инфекция, аллергические воспаления [25]. Также концентрация sCD14 увеличивается до 50 мкг/мл при острой фазе воспаления [23,24]. Для связывания ЛПС с TLR4-рецептором также важную роль играет белок LBP (LPS binding protein – плазменный белок, связывающий ЛПС и доставляющий его к CD14), обладающий высокой аффинностью как к молекулам ЛПС, так и к молекулам CD14 (см. Приложение).



**Рис. 2.** Расчетная зависимость (кривая) отношения фосфорилированной к нефосфорилированной форме IκK от концентрации HMGB1, пептидного активатора TLR4, в редуцированной модели в сравнении с экспериментальными данными (кружки) из работы [15].

Дальнейшая активация тромбоцита состоит в образовании сигнального комплекса на цитоплазматической части рецептора TLR4. Ключевым событием в этом процессе является связывание и активация нескольких молекул MyD88 [26] – сборка так называемой миддосомы. Комплекс миддосомы связывает киназу-4, ассоциированную с рецептором интерлейкина-1 (IRAK4). Ассоциация данной киназы с миддосомой приводит к ее фосфорилированию и фосфорилированию киназы IRAK1 [27]. Это приводит к фосфорилированию фактора-6, ассоциированного с рецептором к фактору некроза опухолей (TRAF6) [28,29]. Следующим этапом является убиквитинирование комплекса TRAF6. Было показано, что оно играет важную роль в активации TAK1 [30], которая, в свою очередь, активирует комплекс IκK [7,31]. В ядерных клетках IκK фосфорилирует IκB комплекса IκB–NFκB, что приводит к переходу NFκB в состояние, в котором он способен проникать в ядро и активировать транскрипцию генов. Помимо этого, было показано, что субъединица IκKβ фосфорилирует мембранный комплекс SNAP-23 на поверхности гранул, играющий одну из ключевых ролей в дегрануляции клеток. Фосфорилирование SNAP-23 усиливает слияние SNARE-содержащих везикул [32].

**Теоретическое исследование активации тромбоцита через TLR4-рецептор.** В ходе математического описания перечисленных выше процессов была построена система из 15 дифференциальных уравнений (см. Приложение), содер-

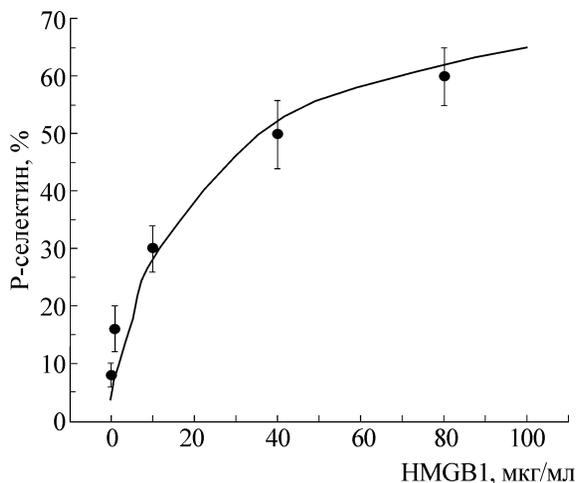
жащая 24 параметра, 9 из которых неизвестны. Доступных экспериментальных данных об активации тромбоцита через TLR4 оказалось недостаточно для подбора значений такого количества параметров. Для описания сигнальных процессов в настоящей работе было применено квазистационарное приближение к переменным, отражающим концентрацию промежуточных соединений – комплексов ТТ, Т1 и Mydd (см. Приложение). Формирование комплексов ЛПС с внеклеточными белками предполагалось квазиравновесным. Для реакций каскада киназ (п12)–(п15), расположенного между миддосомой и Р-селектином, все параметры известны из литературы и необходимости в редукации нет. Однако эта часть системы также может быть сведена к одному уравнению применением квазистационарного приближения к переменным, отражающим концентрации промежуточных киназ, для упрощения исследования системы. Результирующая система уравнений содержит четыре неизвестных параметра и описывает изменение со временем доли активированных TLR4-рецепторов ( $x$ ), мембранную концентрацию убиквитинированной сигнасомы ( $y$ ) и долю экспрессированного Р-селектина ( $PSel$ ):

$$\frac{dx}{dt} = a_1(1 - 2x)^2([HMGB1] + K[sCD14]^2[LPS]^2) - a_{-1}x - 3f(x, y), \quad (1)$$

$$\frac{dy}{dt} = f(x, y) = a_2x([MyD88]_0 - 3y)^2([IRAK]_0 - 3y), \quad (2)$$

$$\frac{dPSel}{dt} = ky(1 - PSel). \quad (3)$$

Значения параметров системы (1)–(3) были подобраны так, чтобы математическая модель описывала экспериментальные данные о связывании ЛПС с TLR4 [22], а также данные о количестве фосфорилированной IκK при активации тромбоцита молекулами HMGB-1 – пептидным лигандом TLR4 (для расчета IκK вместо уравнения (3) использовали уравнения (п12) и (п13) полной системы). В работах [14,15] произведена детекция фосфорилированной IκKβ методом вестерн-блоттинга при стимулировании суспензии тромбоцитов различными концентрациями HMGB-1, а также доли (от максимального количества) экспрессированного Р-селектина. Результаты сравнения предсказаний модели с экспериментальными данными приведены на рис. 2 и 3.



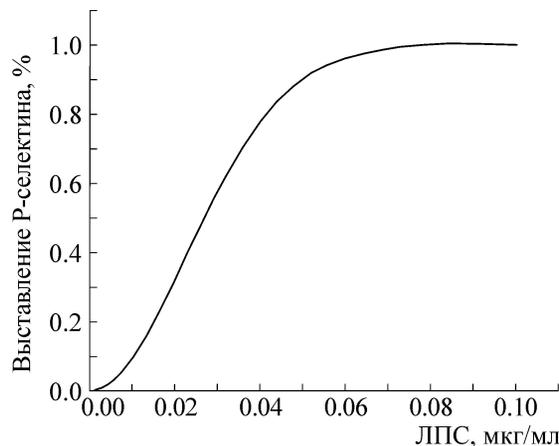
**Рис. 3.** Расчетная зависимость (кривая) доли выставленного Р-селектина от концентрации HMGB1, пептидного активатора TLR4, в редуцированной модели в сравнении с экспериментальными данными (кружки) из работы [15].

Анализ чувствительности степени экспрессии Р-селектина к параметрам модели ((1)–(2), (п12–п15) или (1)–(3)) показывает, что уровень экспрессии Р-селектина изменяется пропорционально кинетическим параметрам ферментов, таким образом, в рассматриваемой системе нет отдельных управляющих параметров.

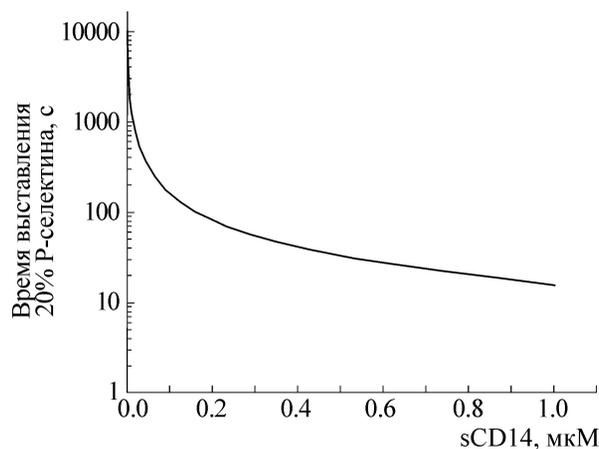
На рис. 4 представлена теоретическая зависимость доли выброшенных тромбоцитом гранул через час после его активации липополисахаридами (с учетом известной афинности липополисахаридов к TLR4 [22] и в случае нормальных плазменных концентраций sCD14) от концентрации ЛПС в плазме. Оценка времени активации тромбоцита (экспрессии 20% Р-селектина) при активации нормальной концентрацией ЛПС (1 мкг/мл) в зависимости от концентрации sCD14 в плазме представлена на рис. 5. Согласно предсказаниям модели при физиологической концентрации sCD14 в 1,5 мкг/мл и ожидаемой концентрации свободных ЛПС 1 мкг/мл, выставление 20% Р-селектина наступает только по истечении 450 мин.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе проведено теоретическое исследование возможности активации тромбоцитов крови липополисахаридами клеточных стенок грамотрицательных бактерий. Построена математическая модель, описывающая процессы связывания ЛПС с рецептором TLR4 и процессы последующей внутриклеточ-



**Рис. 4.** Теоретическая зависимость доли выхода Р-селектина от концентрации липополисахаридов в плазме при концентрации sCD14 в 0,02 мкМ (уровень здорового донора).



**Рис. 5.** Теоретическая зависимость времени выставления 20% Р-селектина от начальной концентрации sCD14 при концентрации липополисахаридов 1 мкг/мл.

ной сигнализации, приводящие к дегрануляции тромбоцита.

Как было отмечено ранее, в настоящее время в литературе существует множество противоречий: встречаются данные, свидетельствующие как об активации тромбоцитов в присутствии ЛПС [2,5], так и говорящие о ее отсутствии [33]. Авторы работы [4] демонстрируют, что активация тромбоцитов происходит только в присутствии целой бактерии, что противоречит данным о связывании TLR4 и липидной части ЛПС [21]. Авторами работы [34] было показано, что имеет место агрегация тромбоцитов через рецептор FcγRIIA, а не по TLR4-зависящему пути. Однако в работах [4] и [34]

были использованы разные штаммы кишечной палочки.

Результаты данной работы показывают, что кинетика активации тромбоцита ЛПС существенным образом зависит от концентрации белка sCD14, которая является донор-специфичной [23] и может существенно увеличиваться при воспалениях.

Следует отметить, что разработанная модель имеет ряд недостатков. Процесс дегрануляции в данной модели реализован примитивным образом и не дифференцирован на стадии. Также не различаются процессы выброса плотных и  $\alpha$ -гранул. Известно, что ввиду донор-зависимых эффектов ответы тромбоцитов различных доноров на одни и те же концентрации стандартных тромбоцитарных активаторов (таких как ADP, CRP и TRAP) не одинаковы. Это приводит к тому, что валидация модели носит скорее качественный характер и позволяет оценить лишь порядок времен ответов тромбоцитов на ЛПС, а также значения порядков кинетических констант.

Тем не менее результаты предсказаний данной модели о существенном вкладе TLR4-зависимой активации тромбоцитов ЛПС при увеличении концентрации растворимой формы белка CD14 в плазме могут быть исследованы экспериментально и, возможно, позволят разрешить ряд имеющихся противоречий в литературных данных.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Правительства г. Москвы в рамках научного проекта № 15-34-70009 «мол\_а\_мос» и гранта Президента Российской Федерации МК-2706.2017.4.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

Представлена система уравнений, описывающих активацию тромбоцита через TLR4. Начальные концентрации белков пересчитаны из данных о количестве белков в тромбоците [35]. Если не указано обратное, для всех химических реакций образования комплексов белков с мембраной или друг с другом предполагалась кинетика закона действующих масс (скорость реакции пропорциональна произведению концентрации реагирующих веществ в степени, равной стехиометрическим коэффициентам).

Плазменная концентрация комплекса LPS (ЛПС) с LBP:

$$\frac{d[\text{LPS LBP}]}{dt} = k_1[\text{LPS}][\text{LBP}] - k_2[\text{LPS LBP}] - k_3[\text{LPS LBP}][\text{sCD14}] + k_4[\text{LBP LPS sCD14}]. \quad (\text{п1})$$

(Реакция  $\text{LPS} + \text{LBP} = \text{LPS-LBP}$ , где  $[\text{LBP LPS sCD14}]$  – мембранная концентрация комплекса LPS с sCD14 и LBP,  $[\text{sCD14}]$  – мембранная концентрация sCD14. Соотношение  $k_2/k_1$  определяет аффинность LPS к LBP и составляет 3,5 нМ [22], соотношение  $k_4/k_3$  определяет сродство комплекса LPS-LBP к CD14 и составляет 5 нМ [36].)

Реакция освобождения LBP из комплекса LPS-LBP-CD14 ( $\text{LBP-LPS-sCD14} \rightarrow \text{LBP} + \text{LPS-CD14}$ ) далее предполагается быстрой, так что скорость наработки комплекса LPS-LBP-CD14 предполагается равной скорости наработки комплекса LPS-CD14 (sCD14-LPS).

Мембранная концентрация комплекса LPS с sCD14 (растворимым CD14):

$$\frac{d[\text{sCD14 LPS}]}{dt} = k_3[\text{LPS LBP}][\text{sCD14}] + k_5[\text{LPS}][\text{sCD14}] - k_6[\text{sCD14 LPS}] - 2k_7[\text{sCD14 LPS}]^2[\text{TLR4}]^2 - k_8[\text{diTLR4}]. \quad (\text{п2})$$

(Реакции  $\text{LBP-LPS} + \text{sCD14} = \text{LBP-LPS-sCD14}$ ;  $\text{LBP-LPS-sCD14} \rightarrow \text{LBP} + \text{sCD14-LPS}$ , где  $[\text{sCD14 LPS}]$  – поверхностная концентрация комплекса LPS с sCD14. Предполагаются три пути образования комплекса LPS-CD14: при прямом связывании LPS с сидящим на мембране sCD14, при необратимом выходе LBP из комплекса LPS-LBP-CD14 и при диссоциации димера активированного TLR4. Кинетические константы связывания LPS с sCD14 известны из экспериментов с применением плазмонного резонанса:  $k_5 = (2,86 \pm 0,1) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ ,  $k_6 = (2,51 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}\text{c}^{-1}$  [22].)

Предполагается, что реакция активации TLR4 происходит согласно следующему механизму:  $2 \text{LPS-CD14} + 2 \text{TLR4} = \text{diTLR4}$ , где происходит ассоциация двух комплексов LPS-CD14 с двумя TLR4 и их мгновенная димеризация. Это дает слагаемое  $[\text{sCD14 LPS}]^2[\text{TLR4}]^2$  в уравнении для мембранной концентрации димера TLR4 (ассоциированного с ЛПС):

$$\frac{d[\text{diTLR4}]}{dt} = k_n[\text{TLR4}]^2[\text{HMGB1}] - k_{10}[\text{diTLR4}] + k_7[\text{sCD14 LPS}]^2[\text{TLR4}]^2 - k_8[\text{diTLR4}] - k_9[\text{diTLR4}][\text{MyD88}]^2[\text{IRAK}]. \quad (\text{п3})$$

Другая возможность активации TLR4 существует при связывании одновременно двух мономеров TLR4 с одной молекулой пептид-

ного лиганда HMGB1 (high mobility group box 1):  $2TLR4 + HMGB1 = diTLR4$ . Кинетические константы связывания LPS с TLR4 известны из экспериментов с применением плазмонного резонанса:  $k_{on} = (5,61 \pm 0,2) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ ,  $k_{off} = (1,28 \pm 0,8) \cdot 10^{-2}\text{c}^{-1}$  [22], откуда могут быть пересчитаны  $k_7$  и  $k_9$ .

Реакция образования первого сигнального комплекса  $T_1$  предполагается необратимой (см. текст):  $diTLR4 + IRAK + 2 MyD88 \rightarrow T_1$ , что определяет последнее слагаемое в уравнении (п3). Скорость образования  $T_1$  неизвестна.

Мембранная концентрация неактивированного TLR4 ( $[TLR4]_0 = 10$  молекул/мкм<sup>2</sup>):

$$\frac{d[TLR4]}{dt} = -2k_n[TLR4]^2[HMGB1] + 2k_{10}[diTLR4] - k_7[sCD14 LPS]^2[TLR4]^2 + k_8[diTLR4]. \quad (п4)$$

Цитоплазменная концентрация IRAK ( $[IRAK]_0 = 0,41$  мкМ):

$$\frac{d[IRAK]}{dt} = -k_9 \frac{V_{mem}}{V_{cyt}} [diTLR4][IRAK][MyD88]^2. \quad (п5)$$

Цитоплазменная концентрация MyD88 ( $[MyD88]_0 = 0,31$  мкМ):

$$\frac{d[MyD88]}{dt} = -2k_9 \frac{V_{mem}}{V_{cyt}} [diTLR4][IRAK][MyD88]^2. \quad (п6)$$

Мембранная концентрация сигнального комплекса  $T_1$  ( $2TLR4-2MyD88-IRAK$ ):

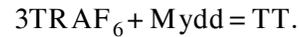
$$\frac{d[T_1]}{dt} = k_9[diTLR4][IRAK][MyD88]^2 - 3k_{11}[T_1]^3 + 3k_{12}[Mydd]. \quad (п7)$$

Для образования миддосомы требуется три первых сигнальных комплекса, этот процесс предполагается обратимым:  $3T_1 = Mydd$ . Так как этот процесс является гипотетическим, его скорости, как и скорости последующих реакций сборки и убиквитинирования миддосомы, неизвестны.

Мембранная концентрация миддосомы,  $[Mydd]$ :

$$\frac{d[Mydd]}{dt} = k_{11}[T_1]^3 - k_{12}[Mydd] - k_{13}[Mydd][TRAF_6]^3 + k_{14}[TT]. \quad (п7)$$

Предполагается, что присоединение белка TRAF<sub>6</sub> к миддосоме обратимо:



Мембранная концентрация комплекса миддосомы с TRAF<sub>6</sub>, TT:

$$\frac{d[TT]}{dt} = k_{13}[Mydd][TRAF_6]^3 - (k_{14} + k_{15})[TT]. \quad (п9)$$

Цитоплазменная концентрация TRAF<sub>6</sub>,  $[TRAF_6]_0 = 0,53$  мкМ:

$$\frac{d[TRAF_6]}{dt} = 3 \frac{V_{mem}}{V_{cyt}} (k_{14}[TT] - k_{13}[Mydd][TRAF_6]^3). \quad (п10)$$

Реакция убиквитинирования предполагается быстрой и необратимой. Концентрация убиквитина предполагается неизменной в ходе реакции. Поэтому образование убиквитинированной миддосомы, sTT, описывается уравнением:

$$\frac{d[sTT]}{dt} = k_{15}[TT]. \quad (п11)$$

Для дальнейшего каскада сериновых киназ  $sTT \rightarrow TAK1 \rightarrow IkK \rightarrow SNAP23$  предполагается кинетика Михаэлиса–Ментен, при этом инактивация всех киназ происходит одними и теми же неспецифическими сериновыми фосфатазами PP1 и PP2, для которых  $v_{pp} = 13,7$  мкМ/с,  $K_{pp} = 25$  мкМ [35,37]. Для каждой киназы предполагается, что она участвует в единственной реакции, т.е. сумма концентраций фосфорилированной в ходе активации и нефосфорилированной форм постоянны и равны исходной концентрации киназы в цитозоле. До начала активации тромбоцита все киназы предполагаются неактивными.

Цитоплазменная концентрация фосфорилированной киназы TAK1,  $[TAK1]_0 = 0,37$  мкМ:

$$\frac{d[TAK1p]}{dt} = \frac{k_{18}[sTT]([TAK1]_0 - [TAK1p])}{K_2 + ([TAK1]_0 - [TAK1p]) - \frac{v_{pp}[TAK1p]}{K_{pp} + [TAK1p]}}. \quad (п12)$$

Каталитическая константа аутофосфорилирования TAK1 и константа Михаэлиса для TAK1 также известны:  $k_{18} = 15 \text{ c}^{-1}$ ,  $K_2 = 0,37$  мкМ [38].

Цитоплазменная концентрация фосфорилированной киназы IkK,  $[IkK]_0 = 0,43$  мкМ:

$$\frac{d[\text{IKKp}]}{dt} = \frac{k_{19}[\text{TAK1p}](\text{IKK}_0 - [\text{IKKp}])}{K_3 + ([\text{IKK}]_0 - [\text{IKKp}])} - \frac{v_{pp}[\text{IKKp}]}{K_{pp} + [\text{IKKp}]} \quad (\text{п13})$$

Каталитическая константа TAK1 и константа Михаэлиса для TAK по отношению к IKK также известны:  $k_{19} = 0,13 \text{ c}^{-1}$ ,  $K_3 = 0,2 \text{ мкМ}$  [38].

Цитоплазматическая концентрация фосфорилированной формы SNAP23,  $[\text{SNAP23}]_0 = 0,7 \text{ мМ}$ :

$$\frac{d[\text{SNAP23}]}{dt} = \frac{k_{20}[\text{IKKp}](\text{SNAP23}]_0 - [\text{SNAP23p}])}{K_4 + ([\text{SNAP23}]_0 - [\text{SNAP23p}])} - \frac{v_{pp}[\text{SNAP23p}]}{K_{pp} + [\text{SNAP23p}]} \quad (\text{п14})$$

Каталитическая константа IKK и константа Михаэлиса для IKK также известны:  $k_{20} = 8 \text{ c}^{-1}$ ,  $K_4 = 0,001 \text{ мкМ}$  [38].

Доля экспрессированного Р-селектина (*PSel*):

$$\frac{dPSel}{dt} = k_{21}[\text{SNAP23p}](1 - PSel). \quad (\text{п15})$$

Константа  $k_{21}$  влияния SNAP23p на выход Р-селектина является искусственной и отражает известную из экспериментов корреляцию выхода гранул с фосфорилированием Р-селектина. Эта константа является неизвестной и подбирается в ходе моделирования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. D. Michelson, *Platelets* (Elsevier, 2013).
2. G. Zhang, J. Han, E. J. Welch, et al., *J. Immunol.* **182** (12), 7997 (2009).
3. G. Andonegui, S. M. Kerfoot, K. McNagny, et al., *Blood* **106** (7), 2417 (2005).
4. V. Matus, J. G. Valenzuela, P. Hidalgo, et al., *PLoS One* **4**, 1 (2017).
5. A. L. Ståhl, M. Svensson, M. Mörgelin, et al., *Blood* **108** (1), 167 (2006).
6. N. E. Gomes, M. K. C. Brunialti, M. E. Mendes, et al., *Braz. J. Med. Biol. Res.* **43**, 853 (2010).
7. S. Akira and K. Takeda, *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499 (2004).
8. G. Andonegui, S. M. Kerfoot, K. McNagny, et al., *Blood* **106**, 2417 (2005).
9. E. Ampofo, I. Müller, I. N. Dahmke, et al., *Thromb. Res.* **136**, 996 (2015).
10. R. Aslam, E. R. Speck, M. Kim, et al., **107**, 637 (2006). doi:10.1182/blood-2005-06-2202.
11. G. C. Sharp, H. Ma, P. T. K. Saunders, and J. E. Norman, *PLoS One* **8** (7), e70180 (2013).
12. F. Rendu and B. Brohard-Bohn, *Platelets* **12**, 261 (2001).
13. M. H. Fukami, J. S. Bauer, G. J. Stewart, and L. Salganicoff, *J. Cell Biol.* **77**, 389 (1978).
14. S. Vogel, R. Bodenstern, Q. Chen, et al., *J. Clin. Invest.* **125** (12), 4638 (2015).
15. X. Yang, H. Wang, M. Zhang, et al., *Diagn. Pathol.* **10**, 134 (2015).
16. L. Petzold and A. Hindmarsh, *LSODA (Livermore solver of ordinary differential equations)* (Lawrence Livermore Natl. Lab. Livermore, CA, 1997).
17. A. C. Hindmarsh, *ACM Signum Newsl.* **15**, 10 (1980).
18. P. Mendes, S. Hoops, S. Sahle, et al., *Methods Mol. Biol.* **500**, 17 (2009).
19. D. B. Fogel, L. J. Fogel, W. Atmar, and G. B. Fogel, in *Proc. of the First Annu. Conf. on Evolutionary Programming* (1992), p. 175.
20. J. Berthet, P. Damien, H. Hamzeh-Cognasse, et al., *Br. J. Haematol.* **151** (1), 89 (2010).
21. B. S. Park, D. H. Song, H. M. Kim, et al., *Nature* **458**, 1191 (2009).
22. H. J. Shin, H. Lee, J. D. Park, et al., *Mol. Cells* **24** (1), 119 (2007).
23. L. A. Ryan, J. Zheng, M. Brester, et al., *J. Infect. Dis.* **184** (6), 699 (2017).
24. E. Hailman, T. Vasselon, M. Kelley, et al., *J. Immunol.* **156**, 4384 (1996).
25. T. Kusunoki, S. D. Wright, Y. Inoue, and T. Miyamoto, *Allergol. Int.* **47**, 271 (1998).
26. P. G. Motshwene, M. C. Moncrieffe, J. G. Grossmann, et al., *J. Biol. Chem.* **284**, 25404 (2009).
27. S.-C. Lin, Y.-C. Lo, and H. Wu, *Nature* **465**, 885 (2010).
28. H. Wu and J. R. Arron, *BioEssays* **25**, 109605 (2003).
29. C. W. Philipson, J. Bassaganya-Riera, M. Viladomiu, et al., *PLoS One* **10**, e0137839 (2015).
30. L. Deng, Ch. Wang, E. Spencer, et al., *Cell* **103**, 351 (2000).
31. J. Napetschnig and H. Wu, *Annu. Rev. Biophys.* **42**, 443 (2013).
32. Z. A. Karim, J. Zhang, M. Banerjee, et al., *Blood* **121** (22), 4567 (2016).
33. R. D. Moriarty, A. Cox, M. McCall, et al., *J. Thromb. Haemost.* **14**, 797 (2016).
34. C. N. Watson, S. W. Kerrigan, D. Cox, et al., *Platelets* **7104**, 1 (2016).
35. J. M. Burkhardt, M. Vaudel, S. Gambaryan, et al., *Blood* **120**, e73 (2012).
36. J. Pugin, C. C. Schürer-Maly, D. Leturcq, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** (7), 2744 (1993).
37. D. R. Alexander, J. M. Hexham, and M. J. Crumpton, *Biochem. J.* **256**, 885 (1988).
38. K. C. Yeung, D. W. Rose, A. S. Dhillon, et al., *Mol. Cell. Biol.* **21** (21), 7207 (2001).

## Modeling of Granule Secretion upon Platelet Activation through TLR4

**A.S. Maiorov\* \*\* \*\*\*, T.O. Shepelyuk\* \*\* \*\*\* \*\*\*, F.A. Balabin\*\*,  
A.A. Martyanov\* \*\* \*\*\*, D.Y. Nechipurenko\* \*\* \*\*\*, and A.N. Sveshnikova\* \*\* \*\*\***

*\*Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia*

*\*\*Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences,  
ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia*

*\*\*\*National Medical Research Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology  
named after Dmitry Rogachev, ul. Samory Mashela 1, Moscow, 117198 Russia*

*\*\*\*\*Faculty of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University,  
Lomonosovsky prosp. 27/1, Moscow, 119991 Russia*

This paper considers the possibility of blood platelets activation by the components of the cell wall of gram-negative bacteria, lipopolysaccharides, through toll-like receptor TLR 4 using mathematical modeling. We have developed complete and reduced models of the platelet signaling cascade triggered by TLR4 taking into account the known kinetics of intracellular signaling enzymes and the content of the proteins participating in the TLR4 signaling cascade in human platelets. The results of our simulation show that in blood from healthy donors the content of the soluble CD14 protein, which is necessary for the activation of platelets by lipopolysaccharides via TLR4, is likely insufficient for platelet activation. Thus, our results suggest that blood platelets can be activated by lipopolysaccharides through TLR4 only in states of strong activation of the immune system, when an increase in CD14 concentration is observed in the blood.

*Keywords: intracellular signaling, lipopolysaccharides, Escherichia coli, blood coagulation*