

Математическое моделирование биохимических реакций на примере биосинтеза каучука

Васин А.А.¹, Гапоненко А.К.², Теплов А.Е.¹, Маркеев А.Н.²

¹ Московский государственный университет им. Ломоносова М.В., факультет
вычислительной математики и кибернетики

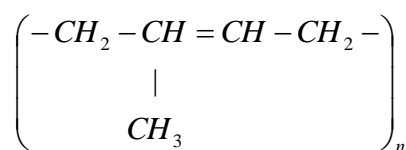
² Центр "Биоинженерия" РАН

Ключевые слова: метаболизм, биосинтез каучука

Введение. Натуральный каучук - важнейший природный материал, широко используемый в военной, транспортной и другой промышленности. По значимости для промышленной экономики он занимает третье место после энергоресурсов: нефти и газа. Натуральный каучук является стратегическим природным ресурсом, имеющим множество применений. Известно более 40,000 вариантов его использования без возможности замены искусственным каучуком. Российская Федерация не имеет собственного источника производителя натурального каучука и полностью зависит от импорта. Поставки натурального каучука в Российскую Федерацию зависят от многих факторов. В последнее время значительный рост цен на натуральный каучук связан с ростом цен на нефть.

Каучук представляет собой аморфное, способное кристаллизоваться твёрдое тело. Он не набухает и не растворяется в воде, спирте, ацетоне и ряде других жидкостей. Набухая и затем растворяясь в жирных и ароматических углеводородах (бензине, бензоле, эфире и других) и их производных, каучук образует коллоидные (клееобразные) растворы, широко используемые в технике.

Натуральный каучук представляет собой полимер изопрена, его состав отвечает формуле:



Природных ресурсов натурального каучука недостаточно для того, чтобы полностью удовлетворить быстрорастущую потребность в нём. В настоящее время во всё возрастающих масштабах производится синтетический каучук. Методы производства синтетического каучука были разработаны ещё в начале прошлого века. В 1910 году С.В. Лебедеву впервые удалось получить синтетический каучук из бутадиена. Сырьём для получения синтетического каучука служил этиловый спирт, из которого получали бутадиен 1,3 (бутадиен оказался более доступным продуктом, чем изопрен). Затем через реакцию полимеризации в присутствии металлического натрия получали бутадиеновый синтетический каучук. В 1932 году именно на базе этого углеводорода возникла крупная промышленность синтетического каучука. Однако свойства синтетического каучука по многим показателям уступают свойствам природного каучука. Натуральный каучук ценится больше благодаря эластичности, упругости и стойкости к более высоким температурам. Поэтому получение природного каучука всё ещё остаётся актуальной задачей.

Природный каучук встречается во многих растениях. Последние исследования показали, что каучук содержится в почти 2000 видов растений ([4]). Лучшим производителем каучука, является бразильская гевея, дающая по разным оценкам от 90 до 96% мирового производства натурального каучука. Каучук в гевее содержится в млечном соке, распределённом в млечных каналах, которые образуют в стволе концентрические кольца.

Для каучуконосов требуется очень тёплый и влажный климат и плодородная почва. Каучуконосы лучше всего произрастают не далее 10° от экватора на север и юг, в Южной Америке, Африке и на Малайском архипелаге. Попытки выращивать бразильскую гевею в других климатических условиях заканчивались неудачей. Уменьшающиеся площади каучуковых плантаций и аллергия, вызываемая гевеей, в совокупности с возрастающей во всём мире потребностью в каучуке, вызвали новую волну интереса к процессу биосинтеза каучука и разработке его альтернативных источников.

Природный каучук встречается во многих растениях, не составляющих одного определённого ботанического семейства. В зависимости от того, в каких тканях накапливается каучук, каучуконосные растения делят на:

- паренхимные — каучук в корнях и стеблях;
- хлоренхимные — каучук в листьях и зелёных тканях молодых побегов;
- латексные — каучук в млечном соке.

Для примера можно привести данные исследований о содержании каучука в различных растениях.

Растение	Содержание каучука (%)	Молекулярная масса (kD)
Бразильская гевея		
в латексе	32.10 +/- 0.65	1500
<i>F.elastica</i>		
в латексе	6.08 +/- 2.6	590
Фиговое дерево		
в латексе	4.10 +/- 0.35	190
в листьях	0.15 +/- 0.05	
в коре	0.35 +/- 0.10	
Подсолнечник	2	

Как видно из таблицы, содержание каучука в других растениях мало по сравнению с бразильской гевеей. Поэтому в настоящее время ведутся научные работы с целью выведения растений с повышенным содержанием каучука. В частности, в Центре «Биоинженерия» РАН разработаны технологии генетической трансформации подсолнечника и исследуется возможность создания подсолнечника - продуцента натурального каучука.

Для того, чтобы иметь возможность прогнозировать последствия введения гетероличных генов, кодирующих ферменты синтеза каучука, для растения в целом и для содержания каучука в частности, необходимо детально изучить метаболизм растения. При этом полезной, а возможно, и необходимой является математическая модель биосинтеза каучука.

В бразильской гевее каучук синтезируется на поверхности частиц, взвешенных в латексе (млечном соке). Физиологическая роль латекса и молекул каучука остаётся не вполне понятной. Зачем растения тратят так много энергии на биосинтез каучука? И как происходит этот процесс? Недавние работы ([3]) в растительной геномике дали возможность для ответа на эти вопросы. Анализ транскриптома в латексе может предоставить информацию о метаболической активности в ткани. В ходе исследований

предыдущих лет было обнаружено, что наибольшую экспрессию проявляют REF (rubber elongation factor), HMG-CoA, SRPP (small rubber particle protein). Известно, что изопентил дифосфат (isopentenyl disphosphate – IPP) и demethylallyl diphosphate(DMAPP) – основные субстраты для производства каучука в растениях. Следовательно, одним из основных факторов для биосинтеза каучука является наличие в достаточном количестве IPP, который может быть синтезирован из метаболического пути мевалоната. Как показали последние исследования ([4]), IPP может быть так же получен и из другого метаболического пути синтеза 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate, также присутствующего в бразильской гевее (см. рис.2).

Рассмотрим модель метаболизма каучука в растениях более подробно. Известно, что синтез каучука является частью метаболического пути биосинтеза стерола, витамина К, витамина Е и каротеноидов.

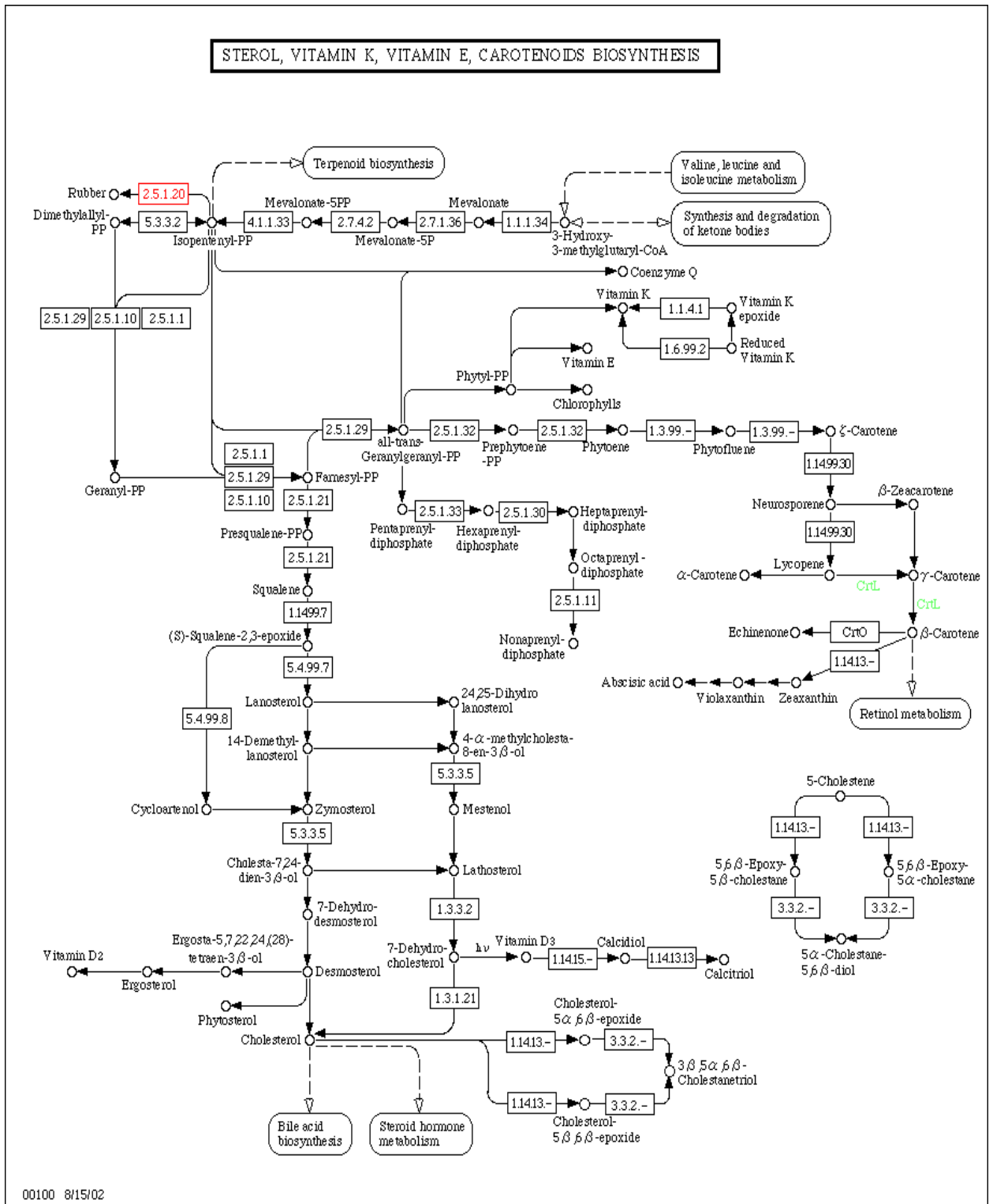


Рис. 1.

Нас интересует часть этого пути, непосредственно участвующая в биосинтезе каучука ([4]).

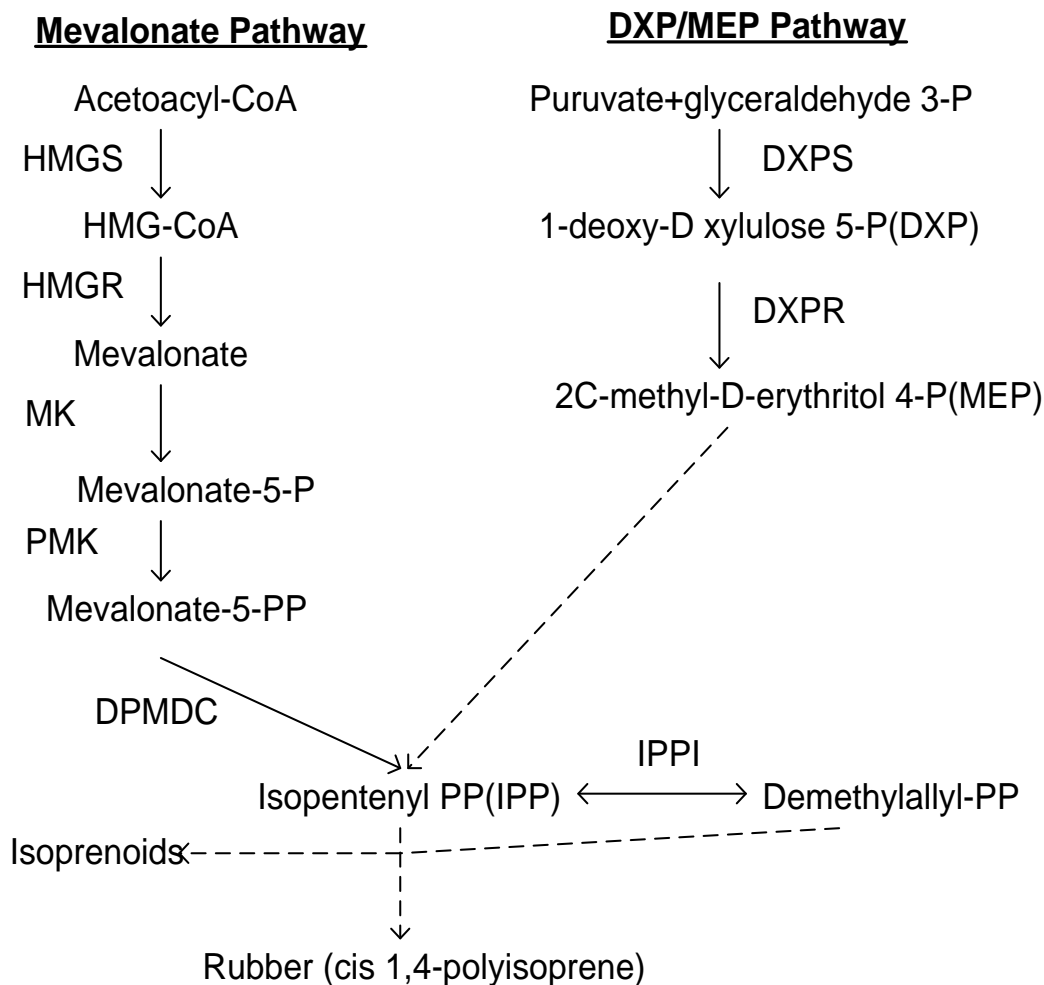


Рис. 2.

Здесь пунктирными линиями отмечены реакции, детали которых до конца не известны. Поэтому в данной работе мы рассмотрим несколько вариантов описания этих реакций.

При изучении моделей основное внимание уделяется двум типам состояний, в которых может находиться система реакций. Это стационарное и квазистационарное состояния.

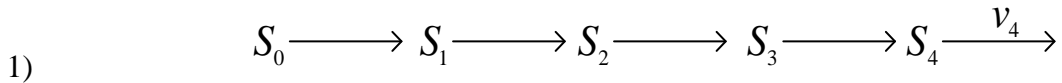
Стационарным называется состояние, в котором концентрации всех метаболитов не меняются во времени.

Квазистационарным называется состояние, в котором неизменными остаются концентрации всех субстрат-ферментных комплексов. При этом концентрации метаболитов могут изменяться во времени с постоянными скоростями.

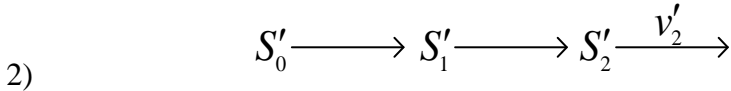
Стационарное состояние существует лишь для систем обратимых реакций. Для таких систем задача состоит в том, чтобы рассчитать концентрации конечных продуктов и промежуточных метаболитов в равновесном состоянии в зависимости от параметров среды: начальных концентраций ферментов участвующих в реакциях, констант скоростей этих ферментов и начальной концентрации первого субстрата в цепи реакций.

Для системы с необратимыми реакциями, в частности для биосинтеза каучука, интерес представляет квазистационарное состояние. В этом случае задача состоит в том, чтобы рассчитать скорости производства конечных продуктов и промежуточных метаболитов в зависимости от тех же параметров, а так же исследовать сходимость решения системы к квазистационарному состоянию.

Интересующую нас совокупность реакций биосинтеза каучука можно разделить на две последовательные части. Первая часть состоит из двух независимых метаболических путей (Mevalone Pathway и DXP/MEP Pathway). Они представляют собой последовательности из нескольких необратимых реакций:



где S_0 – ацетил-КоА, S_1 – 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА, S_2 – мевалонат, S_3 – мевалонат-5P, S_4 – мевалонат-5PP.



где S'_0 – pyruvate+glyceraldehydes 3-P, S'_1 – 1-deoxy-D xylulose 5-P(DXP), S'_2 – 2C-methyl-D-erythritol 4-P(MEP).

Их суммарный выходной поток $v_{sum} = v_4 + v'_2$ поступает на вход последней реакции в метаболическом пути биосинтеза каучука.

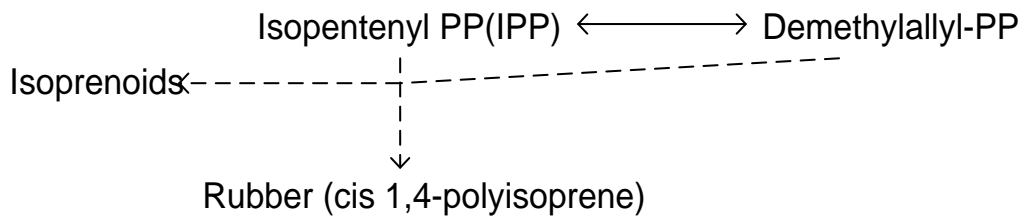
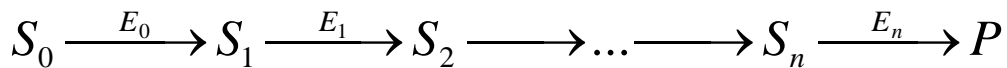
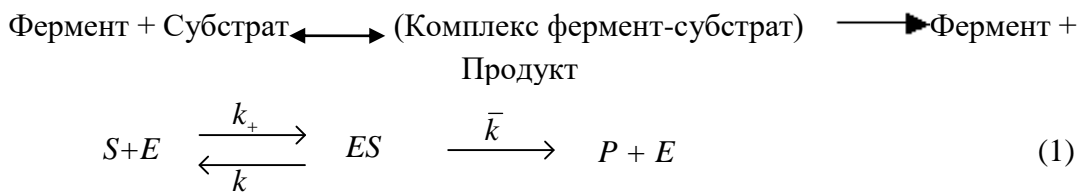


Рис. 3.

Линейная последовательность необратимых реакций. Начнём с анализа первой части метаболического пути. Будем рассматривать более общий случай, когда цепочка реакций состоит из $n+1$ последовательной реакции.



Рассмотрим, как ведёт себя отдельная реакция в этой цепи. Механизм отдельной необратимой реакции, изученный Михаэлисом ([1], [2]), заключается в следующем. Фермент и субстрат образуют фермент-субстратный комплекс, который затем частично распадается на продукт и фермент, а частично распадается обратно на субстрат и фермент. Схематически это выглядит следующим образом.



Здесь k_{1+} – константа скорости, с которой субстрат и фермент образуют субстрат-ферментный комплекс,

k_{1-} – константа скорости, с которой субстрат-ферментный комплекс распадается обратно на субстрат и фермент,

k_{2+} – константа скорости, с которой комплекс распадается на продукт и фермент.

Скорость реакции (v) – это скорость, с которой образуется продукт реакции P:

$$v(t) = [P]'(t) = \bar{k}[ES](t), \quad (2)$$

где $[]$ – обозначает концентрацию вещества, стоящего в скобках.

Концентрация субстрата предполагается постоянной: $d[S]/dt = 0$.

Скорость роста фермент-субстратного комплекса равна скорости его образования минус скорость его распада: $[ES]' = k_+[E][S] - (k_- + \bar{k})[ES]$.

В течение всего времени реакции суммарное количество фермента в виде свободного фермента([E]) и фермента в фермент-субстратном комплексе([ES]) не меняется и равно концентрации фермента в начальный момент времени ($[E]_0$), т.е. $[E]_0 = [E] + [ES]$

Следовательно

$$[ES]' = k_+([E]_0 - [ES])[S] - (k_- + \bar{k})[ES] \quad (3)$$

Квазистационарным называется состояние, в котором неизменным остаётся концентрация субстрат-ферментного комплекса.

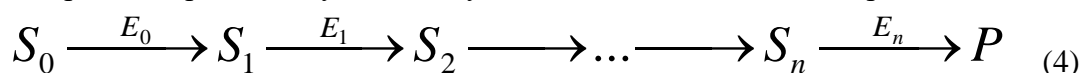
Скорость реакции в этом состоянии, как было показано в работе [1], равна:

$$\bar{v} = \bar{k}[ES] = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_M},$$

где $V_{\max} \equiv \bar{k}[E]_0$ – максимальная скорость реакции, которая наступает тогда, когда фермент полностью связан с субстратом, $K_M = (k_- + \bar{k})/k_+$ – константа Михаэлиса.

Утверждение 1. При $t \rightarrow \infty$ скорость необратимой реакции (1) сходится к стационарной скорости \bar{v} .

Рассмотрим теперь цепочку, состоящую из n+1 последовательной реакции:



Здесь $S_i, i = 1, \dots, n$, – промежуточные метаболиты, E_i – фермент, под действием которого протекает i-я реакция, P – конечный продукт. Обозначим $v_i = [S_{i+1}]', i = 0, \dots, n$, – скорости образования соответствующих метаболитов-продуктов реакции. Механизм протекания каждой реакции в линейной цепочке аналогичен механизму, рассмотренному выше для одиночной реакции: метаболит S_{i+1} образуется из метаболита S_i под действием фермента E_i , при этом образуется промежуточный фермент-субстратный комплекс ES_i . При этом указанные элементарные реакции характеризуются константами скоростей $k_{i+}, k_{i-}, \bar{k}_i$. Отличие от одиночной реакции, рассмотренной выше, заключается в том, что концентрация метаболита S_i не является постоянной, а определяется предыдущей реакцией.

Нас будет интересовать поведение этой системы в квазистационарном состоянии и вопрос о сходимости к этому состоянию. Как и в случае отдельной реакции, **квазистационарным** называется состояние, в котором неизменными остаются концентрации всех субстрат-ферментных комплексов. При этом концентрации метаболитов могут изменяться во времени с постоянными скоростями.

Применив полученный выше результат для первой реакции в цепи, мы получим:

$$v_0 = \frac{V_{\max,0}[S_0]}{[S_0] + K_{M,0}} = \frac{\bar{k}_0[E_0]_0[S_0]}{[S_0] + K_{M,0}},$$

где $V_{\max,0}$ – максимальная скорость первой реакции, $[E_0]_0$ – начальная концентрация фермента E_0 , с участием которого протекает первая реакция, $K_{M,0}$ – константа Михаэлиса для фермента E_0 , $[S_0]$ – концентрация субстрата S_0 .

В последующих реакциях цепи скорость поступления субстрата определяется предыдущими реакциями. Для реакции i справедлива следующая система уравнений:

$$[S_i]' = v_{i-1} + k_{i-}[E_i S_i] - k_{i+}[S_i][E_i]$$

$$[E_i S_i]' = k_{i+} [S_i][E_i] - (k_{i-} + \bar{k}_i)[E_i S_i] \quad (5)$$

$$v_i = [S_{i+1}]' = \bar{k}_i [E_i S_i]$$

В результате этой цепи реакций образуется конечный продукт P: $v_p = [P]' = \bar{k}_n [E_n S_n]$.

Утверждение 2. В квазистационарном состоянии скорость роста концентрации продукта, являющегося конечным метаболитом цепи последовательных необратимых реакций, определяется минимальной из максимальных скоростей реакций, составляющих эту цепочку: $v_p = \min(v_0, \min_{i=1, n} V_{\max, i})$. При этом для концентраций

промежуточных метаболитов справедливо: если $v_0 < V_{\max, i}$ при $i = 1, \dots, n$, то

$$[S_i] = \frac{K_{M, i} v_0}{V_{\max, i} - v_0} = \frac{K_{M, i} V_{\max, 0} [S_0]}{[S_0](V_{\max, i} - V_{\max, 0}) + V_{\max, i} K_{M, 0}}, \quad v_i \equiv v_0 \quad i = 1, \dots, n,$$

иначе $[S_i]' = \begin{cases} V_{\max, i} - v_{i-1}, & V_{\max, i} \leq v_{i-1} \\ 0, & V_{\max, i} > v_{i-1} \end{cases}, \quad v_i = \begin{cases} V_{\max, i}, & V_{\max, i} \leq v_{i-1} \\ v_{i-1}, & V_{\max, i} > v_{i-1} \end{cases}, \quad i = 1, \dots, n.$

Исследуем устойчивость квазистационарного состояния. Для первой реакции в цепи мы в Утверждении 1 показали, что $v(t) \xrightarrow{t \rightarrow \infty} \bar{v}$. Допустим, что это верно для реакции $i-1$, и покажем, что скорость реакции i также сходится к стационарной. Рассмотрим одиночную реакцию, на вход которой поступает субстрат со скоростью $v(t)$. Эта реакция описывается следующей нелинейной системой дифференциальных уравнений:

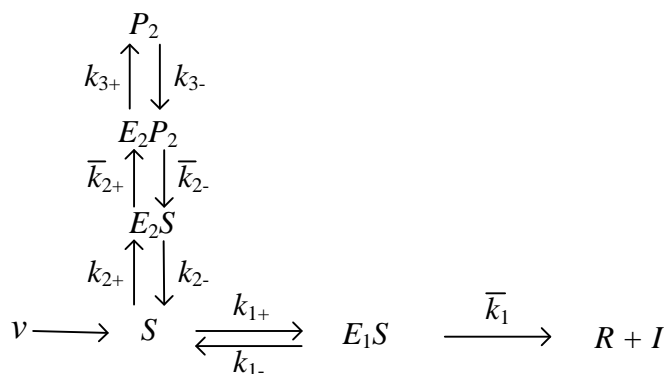
$$\begin{aligned} [S]' &= v(t) + k_- [ES](t) - k_+ [S](t)([E_0] - [ES](t)) \\ [ES]' &= k_+ [S](t)([E_0] - [ES](t)) - (k_- + \bar{k})[ES](t) \\ [P]' &= \bar{k}[ES](t). \end{aligned} \quad (6)$$

Утверждение 3. Если скорость притока субстрата меньше пропускной способности реакции ($\bar{v} \leq V_{\max} = \bar{k}[E]_0$), то скорость реакции (6) сходится к стационарной и является асимптотически устойчивой. Если же $\bar{v} > V_{\max}$, то скорость реакции (6) стремится к V_{\max} , а $[S] \rightarrow \infty$ при $t \rightarrow \infty$.

Последовательно применяя утверждение 3 для каждой реакции в цепи, мы получим, что для системы уравнений квазистационарное состояние является асимптотически устойчивым в смысле сходимости скоростей.

Модель разветвленной реакции. Теперь рассмотрим последнюю часть метаболического пути, представленную на рисунке 3. Поскольку, как уже было сказано, эта часть не до конца изучена, мы рассмотрим несколько разных вариантов этого участка.

Первый вариант – когда этот участок представляет собой две независимые реакции с общим субстратом Isopentenyl-PP (S), поступление которого из предыдущего участка пути, рассмотренного нами выше, осуществляется со скоростью v . Первая реакция – обратимая, продуктом которой является Demethylallyl-PP (P_2). Вторая реакция является необратимой двухпродуктовой реакцией, её продуктами являются Rubber (R) и Isoprenoids (I), и она протекает под действием одного фермента.



Эта схема реакций описывается следующей системой дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned}
 [S]' &= v - k_{1+}[S][E_1] - k_{2+}[S][E_2] + k_{1-}[E_1S] + k_{2-}[E_2S] \\
 [P_2]' &= [E_2P_2]k_{3+} - k_{3-}[P_2][E_2] \\
 [P]' &= \bar{k}_1[E_1S] \\
 [E_1S]' &= k_{1+}[S][E_1] - (k_{1-} + \bar{k}_1)[E_1S] \\
 [E_2S]' &= k_{2+}[S][E_2] - (k_{2-} + \bar{k}_{2+})[E_2S] + \bar{k}_{2-}[E_2P_2] \\
 [E_2P_2]' &= \bar{k}_{2+}[E_2S] - \bar{k}_{3-}[P_2][E_2] - [E_2P_2](\bar{k}_{2-} + k_{3+}) \\
 [E_1] + [E_1S] &= [E_1]_0 \\
 [E_2P_2] + [E_2] + [E_2S] &= [E_2]_0.
 \end{aligned} \tag{7}$$

Утверждение 4. В квазистационарном состоянии скорость образования результирующего продукта R определяется следующей формулой:

$$[R]' = \min(v, V_{\max}),$$

где v - входящий поток субстрата S, V_{\max} - максимальная скорость реакции (S->R).

Это утверждение говорит о том что, перед тем как рассматривать влияние метаболических путей мевалона и DXP/MEP на производство каучука, надо убедиться, что сама реакция образования каучука не является узким местом.

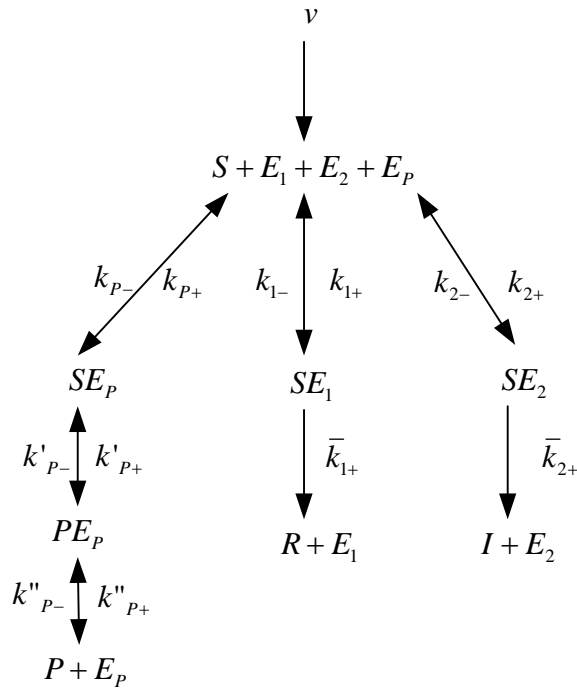
Заметим, что как следствие из Утверждения 4 можно вывести утверждение для случая, когда у одного из субстратов, вообще говоря, произвольного, есть обратимая побочная реакция.

Утверждение 5. Наличие обратимой побочной реакции в квазистационарном случае не оказывает влияния на скорость протекания основной необратимой реакции.

Рассмотрим второй вариант, когда под действием различных ферментов, посредством необратимых реакций образуются I – изопреноид, R – каучук и, посредством обратимой реакции P – демитулалил. Как и в предыдущем случае, имеется постоянный приток v субстрата S.

Нас интересует как ситуация, когда данный процесс уже находится в квазистационарном состоянии, так и вопрос о сходимости к квазистационарному состоянию. Таким образом, далее в работе мы будем рассматривать условия достижимости квазистационарного состояния.

Как было доказано выше, в случае квазистационарного процесса ветвь P, отвечающая за обратимую реакцию, не будет оказывать влияния на ветви I и R вне зависимости от параметров этой реакции. Поэтому данная ветвь рассматриваться не будет.



Таким образом, для этой схемы можно написать следующую систему дифференциальных уравнений, описывающих протекающий процесс:

$$\begin{aligned} [SE_1]' &= k_{1+}[S][E_1] - k_{1-}[SE_1] - \bar{k}_{1+}[SE_1] \\ [SE_2]' &= k_{2+}[S][E_2] - k_{2-}[SE_2] - \bar{k}_{2+}[SE_2] \\ [S]' &= v - k_{2+}[S][E_2] - k_{1+}[S][E_1] + k_{2-}[SE_2] + k_{1-}[SE_1] \end{aligned}$$

Подставляя в систему $[E_1]_0 = [E_1] + [SE_1]$, $[E_2]_0 = [E_2] + [SE_2]$, получим уравнения для расчета квазистационарного состояния:

$$\begin{aligned} [SE_1]' &= k_{1+}[S][E_1] - [SE_1](k_{1-} + \bar{k}_{1+} + k_{1+}[S]) = 0 \\ [SE_2]' &= k_{2+}[S][E_2]_0 - [SE_2](k_{2-} + \bar{k}_{2+} + k_{2+}[S]) = 0 \\ [S]' &= v - k_{2+}[S][E_2]_0 - k_{1+}[S][E_1]_0 + [SE_2](k_{2-} + k_{2+}[S]) + [SE_1](k_{1-} + k_{1+}[S]). \end{aligned} \tag{8}$$

Утверждение 6. Пусть $v > V_{\max,R} + V_{\max,I}$, то есть количество вещества, поступающего в систему, превосходит максимально возможное количество вещества, исходящего из системы, тогда процесс стремится к квазистационарному состоянию, где субстрат-ферментные комплексы и скорости реакций достигают максимальных значений, т.е.

$$[SE_2] \rightarrow [E_2]_0, [SE_1] \rightarrow [E_1]_0$$

$$v_R \rightarrow V_{\max,R}, v_I \rightarrow V_{\max,I} \text{ при } t \rightarrow \infty.$$

Если же $v \leq V_{\max,R} + V_{\max,I}$, то есть количество вещества, поступающего в систему, не превосходит максимально возможное количество вещества, исходящего из системы, то существует единственное квазистационарное состояние системы, где скорости имеют значения

$$v_I = \frac{k_{2+} \frac{-\beta - \sqrt{\beta^2 - 4\alpha\gamma}}{2\alpha} [E_2]_0}{(k_{2-} + \bar{k}_{2+} + k_{2+} \frac{-\beta - \sqrt{\beta^2 - 4\alpha\gamma}}{2\alpha})} \bar{k}_{2+}, \quad v_R = \frac{k_{1+} \frac{-\beta - \sqrt{\beta^2 - 4\alpha\gamma}}{2\alpha} [E_1]_0}{(k_{1-} + \bar{k}_{1+} + k_{1+} \frac{-\beta - \sqrt{\beta^2 - 4\alpha\gamma}}{2\alpha})} \bar{k}_{1+}$$

и параметры определяются следующим образом:

$$\begin{aligned} \alpha &= k_{2+}k_{1+}(v - V_{\max,R} - V_{\max,I}) \\ \beta &= k_{2+}(k_{1-} + \bar{k}_{1+})(v - V_{\max,I}) + k_{1+}(k_{2-} + \bar{k}_{2+})(v - V_{\max,R}) \end{aligned}$$

$$\gamma = v(k_{2-} + \bar{k}_{2+})(k_{1-} + \bar{k}_{1+}).$$

Утверждение 6 означает, что в случае избыточного притока метаболита S этот метаболит накапливается в системе. Соответственно, для поддержания равновесия весь фермент переходит в субстрат-ферментные комплексы, и их молярная масса достигает своих максимальных значений. Заметим также, что указанная выше сходимость имеет место при любом исходном состоянии. Утверждение 6 позволяет нам получать решение при любых исходных физических характеристиках системы, более того, оно позволяет по типу квазистационарного решения определить некоторые физические характеристики системы.

В рассматриваемой задаче одним из самых важных вопросов является вопрос о распределении входящего потока по рукавам. Найденное решение является довольно громоздким. Рассмотрим некоторые правдоподобные допущения, относительно параметров системы и получим более простые и компактные выражения для скоростей реакций.

Рассмотрим ситуацию, когда скорость прямой реакции намного выше, чем скорость обратной реакции, т.е. $k_{1-}/k_{1+} = c\varepsilon$, $\bar{k}_{1+}/k_{1+} = b\varepsilon$, $k_{2-}/k_{2+} = a\varepsilon$, $\bar{k}_{2-}/k_{2+} = \varepsilon$,

где $a, b, c > 0$ некоторые константы порядка 1 и где ε - малая величина.

Описанные выше условия будем называть *Условиями соотношения*.

Теперь, чтобы решить нашу задачу в *Условиях соотношения* необходимо определить, каким образом v соотносится со скоростями реакций. Естественно рассмотреть два случая, когда v является величиной того же порядка, что и $\bar{k}_{1+}, \bar{k}_{2+}, k_{1-}, k_{2-}$, и когда v является величиной того же порядка, что и k_{1+}, k_{2+} . *Условия соотношения*, дополненные определением значения v , будем называть соответственно *Условиями соотношения первого рода* и *Условиями соотношения второго рода*.

Утверждение 7. Если выполнены *Условия соотношения первого рода* и $(K_I v - k_{2+}[E_2]_0) \geq \frac{K_{M,I}}{K_{M,R}}(K_I v - k_{1+}[E_1]_0)$, то квазистационарное состояние системы имеет следующий вид:

$$[SE_1] = \frac{(K_I v - k_{2+}[E_2]_0) - \frac{K_{M,I}}{K_{M,R}}(K_I v - k_{1+}[E_1]_0)}{(K_I v - k_{2+}[E_2]_0) + \frac{K_{M,I}}{K_{M,R}}(K_I v - k_{1+}[E_1]_0 - 2k_{2+}[E_2]_0)},$$

$$[SE_2] = \frac{(K_I v - k_{2+}[E_2]_0) - \frac{K_{M,I}}{K_{M,R}}(K_I v - k_{1+}[E_1]_0)}{(3K_I v - 3k_{2+}[E_2]_0 - 2k_{1+}b[E_2]_0) + \frac{K_{M,I}}{K_{M,R}}(K_I v - k_{1+}[E_1]_0)},$$

$$v_R = \frac{(K_I v - k_{2+}[E_2]_0) - \frac{K_{M,I}}{K_{M,R}}(K_I v - k_{1+}[E_1]_0)}{(K_I v - k_{2+}[E_2]_0) + \frac{K_{M,I}}{K_{M,R}}(K_I v - k_{1+}[E_1]_0 - 2k_{2+}[E_2]_0)} \bar{k}_{1+},$$

$$v_I = \frac{(K_I v - k_{2+}[E_2]_0) - \frac{K_{M,I}}{K_{M,R}}(K_I v - k_{1+}[E_1]_0)}{(3K_I v - 3k_{2+}[E_2]_0 - 2k_{1+}b[E_2]_0) + \frac{K_{M,I}}{K_{M,R}}(K_I v - k_{1+}[E_1]_0)} \bar{k}_{2+},$$

где $K_I = k_{2+}/\bar{k}_{2+}$.

Условие $(K_I v - k_{2+}[E_2]_0) \geq \frac{K_{M,I}}{K_{M,R}}(K_I v - k_{1+}[E_1]_0)$ говорит о том, что пропускная способность у рукава I больше чем у R. Ввиду произвольности выбора параметров $a, b, c > 0$ и симметричности рукавов решение для случая $(K_I v - k_{2+}[E_2]_0) \leq \frac{K_{M,I}}{K_{M,R}}(K_I v - k_{1+}[E_1]_0)$ выписывается аналогично.

Утверждение 7 дает нам ответ на вопрос о распределении входящего потока по рукавам, то есть мы можем увидеть, как соотносятся скорости v_I и v_R .

$$\frac{v_R}{v_I} = \frac{(3K_I v - 3k_{2+}[E_2]_0 - 2k_{1+}b[E_2]_0) + \frac{K_{M,I}}{K_{M,R}}(K_I v - k_{1+}[E_1]_0)}{(K_I v - k_{2+}[E_2]_0) + \frac{K_{M,I}}{K_{M,R}}(K_I v - k_{1+}[E_1]_0 - 2k_{2+}[E_2]_0)} \frac{\bar{k}_{1+}}{\bar{k}_{2+}}$$

Утверждение 8. Если выполнены *Условия соотношения второго рода*, то найдется ε_0 , такое что для любого $\varepsilon < \varepsilon_0$ система имеет единственное квазистационарное решение,

в котором $v_R \rightarrow V_{\max,R}$, $v_I \rightarrow V_{\max,I}$ при $t \rightarrow \infty$.

Таким образом, мы получили, что в *Условиях соотношения второго рода* имеет место избыточность входного потока. Соотношение исходящих потоков в этом случае имеет вид: $\frac{v_R}{v_I} = \frac{bk_{1+}[E_1]_0}{k_{2+}[E_2]_0}$.

Итак, на основе Утверждения 6 мы можем получить решение при любых исходных физических характеристиках системы. Полученные решения позволяют определить, в каком отношении входящий поток делится по рукавам, а Утверждения 7 и 8 позволяют получить эти соотношения и решение системы в упрощенном виде. Таким образом, мы имеем довольно полное описание метаболического процесса для рассматриваемой модели.

Заключение. В данной работе был рассмотрен процесс биосинтеза натурального каучука, являющийся частью метаболического пути биосинтеза стерола, витамина К, витамина Е и каротеноидов. Была предложена математическая модель, описывающая данный процесс в виде системы дифференциальных уравнений. Описаны квазистационарные состояния, в которых скорости промежуточных реакций в цепи не меняются во времени, установлена сходимости к этим состояниям. Поскольку процесс ещё не до конца изучен, то в работе были рассмотрены разные возможные варианты метаболизма каучука. Для этих вариантов получены формулы для расчёта скорости образования каучука при различных исходных данных. Эти формулы позволяют вычислить, какое влияние на весь метаболический процесс оказывает изменение характеристик отдельных ферментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cornish-Bowden A. 1995. *Analysis of Enzyme Kinetic Data*. Oxford University Press.
2. Michaelis L., Menten M. L. 1913. *Biochemisches Zeitschrift*. **49**. 333-369.
3. Hunseung Kang, Min Young Kang, Kyung-Hwan Han. 2000. Identification of Natural Rubber and Characterization of Rubber Biosynthetic Activity in Fig Tree. *Plant Physiol.* **123**.
4. Jae-Heung Ko, Keng-See Chow, Kyung-Hwan Han. 2003. Transcriptome analysis reveals novel features of the molecular events occurring in the laticifers of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Plant Molecular Biology*. **53**.

Приложение

Доказательство утверждения 1. Подставляя $[ES]' = 0$ в (3), найдём стационарное значение $[ES]$ и из (2) получим:
$$\bar{v} = [P]' = \bar{k}[ES] = \frac{\bar{k}[E]_0[S]}{[S] + K_M}$$

Теперь покажем, что скорость реакции сходится к стационарному значению. Решение линейного дифференциального уравнения (3) имеет вид:

$$[ES](t) = e^{-(k_+[S]+k_-+\bar{k})t} + \frac{k_+[E]_0[S]}{k_+[S]+k_-+\bar{k}}$$

Поскольку $k_+[S]+k_-+\bar{k} > 0$, то $[ES] \xrightarrow{t \rightarrow \infty} \frac{k_+[E]_0[S]}{k_+[S]+k_-+\bar{k}}$.

Отсюда получаем, что $v(t) = \bar{k}[ES](t) \xrightarrow{t \rightarrow \infty} \bar{v}$. Что и требовалось доказать.

Доказательство утверждения 2. Рассмотрим решение системы (5) в квазистационарном состоянии.

$$\begin{aligned} 0 &= v_{i-1} + k_{i-}[E_i S_i] - k_{i+}[S_i][E_i] \\ 0 &= k_{i+}[S_i][E_i] - k_{i-}[E_i S_i] - \bar{k}_i[E_i S_i] \\ v_i &= \bar{k}_i[E_i S_i] \end{aligned}$$

Возможны два варианта её решения.

1) Если $v_0 < V_{\max,i}$, $i = 1, \dots, n$, то в квазистационарном состоянии скорости реакций в цепи станут равны
$$v_i \equiv v_0 = \frac{V_{\max,0}[S_0]}{[S_0] + K_{M,0}} = \frac{\bar{k}_0[E_0]_0[S_0]}{[S_0] + K_{M,0}}, \quad i = 1, \dots, n.$$

При этом концентрации промежуточных метаболитов составят

$$[S_i] = \frac{(k_{i-} + \bar{k}_i)[E_i S_i]}{k_{i+}([E_i]_0 - [E_i S_i])} = \frac{K_{M,i} v_i}{V_{\max,i} - v_i} = \frac{K_{M,i} V_{\max,0} [S_0]}{[S_0](V_{\max,i} - V_{\max,0}) + V_{\max,i} K_{M,0}}, \quad i = 1, \dots, n.$$

2) Если $\exists i: v_0 > V_{\max,i}$, то обозначим $r = \arg \min_i V_{\max,i}$ - номер реакции с минимальной максимальной скоростью. Рассмотрим возможные варианты соотношений между $V_{\max,i}$, $i = 1, \dots, n$.

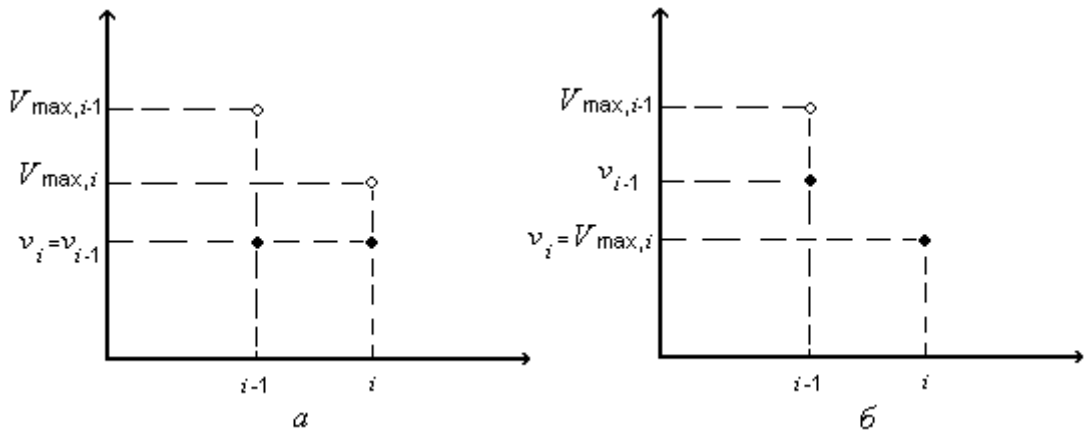


Рис. 4.

а) Если $v_{i-1} < V_{\max,i}$, то скорость реакции v_i станет равной v_{i-1} , как было показано выше.

И соответственно

$$[S_i] = \frac{K_{M,i} v_{i-1}}{V_{\max,i} - v_{i-1}}.$$

б) Если $v_{i-1} \geq V_{\max,i}$, тогда скорость реакции v_i установится $V_{\max,i}$, поскольку это максимальная скорость реакции. При этом будет происходить накопление субстрата $[S_i]$ со скоростью $[S_i]' = v_{i-1} - V_{\max,i}$.

Соответственно получаем рекуррентное соотношение

$$[S_i]' = \begin{cases} V_{\max,i} - v_{i-1}, & V_{\max,i} \leq v_{i-1} \\ 0, & V_{\max,i} > v_{i-1} \end{cases}, \quad v_i = \begin{cases} V_{\max,i}, & V_{\max,i} \leq v_{i-1} \\ v_{i-1}, & V_{\max,i} > v_{i-1} \end{cases}, \quad i = 1, \dots, n.$$

Таким образом, в этом случае $v_p = \min_{i=1,n} V_{\max,i} = V_r$. Утверждение доказано.

Доказательство утверждения 3. Рассмотрим случай, когда входящий поток $v(t)$ меньше пропускной способности системы, т.е. $V_{\max} = \bar{k}[E]_0 > v(t)$.

В квазистационарном состоянии, когда $[ES]' = 0, [S]' = 0, v(t) = \bar{v}$, получим следующие выражения для концентраций фермент-субстратного комплекса \overline{ES} и субстрата \bar{S} :

$$\overline{ES} = \frac{\bar{v}}{\bar{k}} \quad \bar{S} = \bar{v} \left(1 + \frac{k_-}{\bar{k}} \right) / k_+ \left(E_0 - \frac{\bar{v}}{\bar{k}} \right).$$

Пусть $v(t) = \bar{v} + \Delta v(t)$, $S(t) = \bar{S} + \Delta S(t)$, $ES(t) = \overline{ES} + \Delta ES(t)$. Тогда система (6) примет следующий вид:

$$\Delta S' = \Delta v + k_- \Delta ES - k_+ [\Delta S (E_0 - \overline{ES} - \Delta ES) - \bar{S} \Delta ES]$$

$$\Delta ES' = -\bar{k} \Delta ES - k_- \Delta ES + k_+ [\Delta S (E_0 - \overline{ES} - \Delta ES) - \bar{S} \Delta ES]$$

Данная система является нелинейной. Приведём эту систему к линейной, отбросив члены второго порядка малости.

$$\Delta S' \approx -k_+ \left(E_0 - \frac{\bar{v}}{\bar{k}} \right) \Delta S + (k_- + k_+ \bar{S}) \Delta ES + \Delta v$$

$$\Delta ES' \approx k_+ \left(E_0 - \frac{\bar{v}}{\bar{k}} \right) \Delta S - (\bar{k} + k_- + k_+ \bar{S}) \Delta ES$$

Исследуем систему на устойчивость. Для этого рассмотрим однородную систему:

$$\Delta S' = -k_+ \left(E_0 - \frac{\bar{v}}{\bar{k}} \right) \Delta S + (k_- + k_+ \bar{S}) \Delta ES$$

$$\Delta ES' = k_+ \left(E_0 - \frac{\bar{v}}{\bar{k}} \right) \Delta S - (\bar{k} + k_- + k_+ \bar{S}) \Delta ES.$$

Характеристический многочлен для этой системы имеет вид:

$$\left(\lambda + k_+ \left(E_0 - \frac{\bar{v}}{\bar{k}} \right) \right) \left(\lambda + \bar{k} + k_- + k_+ \bar{S} \right) - k_+ \left(E_0 - \frac{\bar{v}}{\bar{k}} \right) (k_- + k_+ \bar{S}) = 0$$

Решая уравнение, находим корни, являющиеся собственными значениями матрицы:

$$\lambda_{1,2} = \frac{- \left(k_+ \left(E_0 - \frac{\bar{v}}{\bar{k}} \right) + \bar{k} + k_- + k_+ \bar{S} \right) \pm \sqrt{\left(k_+ \left(E_0 - \frac{\bar{v}}{\bar{k}} \right) + \bar{k} + k_- + k_+ \bar{S} \right)^2 - 4k_+ \left(E_0 - \frac{\bar{v}}{\bar{k}} \right) \bar{k}}}{2}$$

Видно, что собственные значения $\lambda_1, \lambda_2 < 0$, следовательно, по теореме Ляпунова нулевое решение однородной системы асимптотически устойчиво.

Рассмотрим случай, когда $v(t) > V_{\max}$. Как было показано в утверждении 2, в этом случае $[S]' \geq v(t) - V_{\max} > 0$. Следовательно, $[S] \rightarrow \infty$ при $t \rightarrow \infty$.

Доказательство утверждения 4. Решая систему (7) в квазистационарном состоянии, мы получим следующее решение:

$$[S]' = v - \bar{k}_1[E_1S] = 0 \Rightarrow [E_1S] = \frac{v}{\bar{k}_1}$$

$$[E_1S] = \frac{k_{1+}[S][E_1]_0}{k_{1+}[S] + k_{1-} + \bar{k}_1} = \frac{v}{\bar{k}_1}$$

$$[S] = \frac{v(k_{1-} + \bar{k}_1)}{\bar{k}_1 k_{1+}[E_1]_0 - v k_{1+}} = \frac{v(k_{1-} + \bar{k}_1)}{k_{1+}(\bar{k}_1[E_1]_0 - v)} > 0$$

Таким образом, в случае если $\bar{k}_1[E_1]_0 = V_{\max} > v$, скорость образования продукта установится равной: $[R]' = \bar{k}_1[E_1S] = v$.

Если же $\bar{k}_1[E_1]_0 = V_{\max} \leq v$, то $[R]' = V_{\max} = \bar{k}_1[E_1]_0$.

Другими словами $[R]' = \min(v, V_{\max})$.

Доказательство утверждения 5. Доказательство утверждения следует из утверждения 4.

Доказательство утверждения 6. Рассмотрим теперь ситуацию когда $v > V_{\max, R} + V_{\max, I}$

Докажем, что в указанных условиях $[S] \rightarrow \infty$ при $t \rightarrow \infty$.

Общее приращение количества вещества есть $[S]' + [SE_1]' + [SE_2]'$, с другой стороны это есть $v - [SE_1]_0 k'_{1+} + [SE_2]_0 k'_{2+} = a = const$, следовательно, $[S]' + [SE_1]' + [SE_2]' = a = const$. Значит, количество вещества $[S] + [SE_1] + [SE_2]$ монотонно неограниченно возрастает.

Но $[SE_1]$ и $[SE_2]$ ограничены, так как $[SE_2], [SE_1] \leq \max([E_1]_0 + [E_2]_0)$.

Отсюда получаем, что $[S]$ неограниченно возрастает, то есть $[S] \rightarrow \infty$ при $t \rightarrow \infty$.

Из (8) при $t \rightarrow \infty$ имеем:

$[SE_1]' = k_{1+}[S]([E_1]_0 - k_{1+}[SE_1]) - [SE_1](k_{1-} + \bar{k}_{1+})$ ограничено только при $[SE_2] \rightarrow [E_2]_0$. Ограниченность $[SE_1]'$ следует из ограниченности $[SE_1]$.

Аналогично $[SE_1] \rightarrow [E_1]_0$. Итак, получили $[SE_1] \rightarrow [E_1]_0$, $[SE_2] \rightarrow [E_2]_0$. Далее, учитывая что $v_{P_1} = [SE_1]\bar{k}_{1+}$, $v_{P_2} = [SE_2]\bar{k}_{2+}$, получим $v_{P_1} \rightarrow \bar{k}_{1+}[E_1]_0$, $v_{P_2} \rightarrow \bar{k}_{2+}[E_2]_0$ при $t \rightarrow \infty$.

Рассмотрим теперь ситуацию когда $v \leq V_{\max, R} + V_{\max, I}$

Решая систему (8), получим:

$$[SE_1] = \frac{k_{1+}[S][E_1]_0}{(k_{1-} + \bar{k}_{1+} + k_{1+}[S])} \quad (9)$$

$$[SE_2] = \frac{k_{2+}[S][E_2]_0}{(k_{2-} + \bar{k}_{2+} + k_{2+}[S])} \quad (10)$$

$$[S]' = v - k_{2+}[S][E_2]_0 - k_{1+}[S][E_1]_0 + [SE_2](k_{2-} + k_{2+}[S]) + [SE_1](k_{1-} + k_{1+}[S]) = 0. \quad (11)$$

Сделаем подстановку из (9), (10) в (11). Получим уравнение:

$$[S]' = v - k_{2+}[S][E_2]_0 - k_{1+}[S][E_1]_0 + \frac{k_{2+}[S][E_2]_0}{(k_{2-} + \bar{k}_{2+} + k_{2+}[S])}(k_{2-} + k_{2+}[S]) + \frac{k_{1+}[S][E_1]_0}{(k_{1-} + \bar{k}_{1+} + k_{1+}[S])}(k_{1-} + k_{1+}[S]) = 0.$$

Решая это уравнение, получим корни: $[S]_{1,2} = \frac{-\beta \pm \sqrt{\beta^2 - 4\alpha\gamma}}{2\alpha}$,

где $\alpha = k_{2+}k_{1+}(v - \bar{k}_{2+}[E_2]_0 - \bar{k}_{1+}[E_1]_0)$,

$\beta = k_{2+}(k_{1-} + \bar{k}_{1+})(v - \bar{k}_{2+}[E_2]_0) + k_{1+}(k_{2-} + \bar{k}_{2+})(v - \bar{k}_{1+}[E_1]_0)$,

$\gamma = v(k_{2-} + \bar{k}_{2+})(k_{1-} + \bar{k}_{1+})$.

Заметим, что при определенных условиях на α и β , того или иного решения может не существовать. Рассмотрим, при каких значениях параметров существуют полученные решения. Нетрудно убедиться подстановкой, что $\beta^2 - 4\alpha\gamma > 0$ при любых значениях параметров задачи. Таким образом, квадратный корень всегда существует.

Необходимо чтобы выполнялось ещё одно условие $[S]_{1,2} = \frac{-\beta \pm \sqrt{\beta^2 - 4\alpha\gamma}}{2\alpha} \geq 0$.

Заметим также, что из условия $v \leq [E_2]_0 \bar{k}_{2+} + [E_1]_0 \bar{k}_{1+}$, следует, что $\alpha < 0$. Далее учитывая, что $\gamma > 0$ и $\alpha < 0$, получаем, что $\sqrt{\beta^2 - 4\alpha\gamma} > |\beta|$ и, следовательно, всегда

$[S]_1 = \frac{-\beta + \sqrt{\beta^2 - 4\alpha\gamma}}{2\alpha} < 0$. Таким образом, остается только одно решение

$[S]_2 = \frac{-\beta - \sqrt{\beta^2 - 4\alpha\gamma}}{2\alpha}$. Очевидно, что это решение будет достигаться при любом значении β .

Как было получено нами выше, скорость образования продукта в необратимой реакции выражается в следующем виде:

$$v_R = \frac{k_{1+}[S][E_1]_0}{(k_{1-} + \bar{k}_{1+} + k_{1+}[S])} \bar{k}_{1+}, \quad v_I = \frac{k_{2+}[S][E_2]_0}{(k_{2-} + \bar{k}_{2+} + k_{2+}[S])} \bar{k}_{2+}.$$

Посредством подстановки $[S]_2 = \frac{-\beta - \sqrt{\beta^2 - 4\alpha\gamma}}{2\alpha}$ получаем:

$$v_R = \frac{k_{1+} \frac{-\beta - \sqrt{\beta^2 - 4\alpha\gamma}}{2\alpha} [E_1]_0}{(k_{1-} + \bar{k}_{1+} + k_{1+} \frac{-\beta - \sqrt{\beta^2 - 4\alpha\gamma}}{2\alpha})} \bar{k}_{1+}, \quad v_I = \frac{k_{2+} \frac{-\beta - \sqrt{\beta^2 - 4\alpha\gamma}}{2\alpha} [E_2]_0}{(k_{2-} + \bar{k}_{2+} + k_{2+} \frac{-\beta - \sqrt{\beta^2 - 4\alpha\gamma}}{2\alpha})} \bar{k}_{2+}. \quad (12)$$

Доказательство утверждения 7. Применяя Условия соотношения первого рода к (12) и отбрасывая высокие порядки малости ε , учитывая при раскрытии модуля, что

$(K_I v - k_{2+}[E_2]_0) \geq \frac{K_{M,I}}{K_{M,R}} (K_I v - k_{1+}[E_1]_0)$, получим:

$$[SE_1] = \frac{(c+b)(v' - k_{2+}[E_2]_0) - (a+1)(v' - k_{1+}[E_1]_0)}{(c+b)(v' - k_{2+}[E_2]_0) + (a+1)(v' - k_{1+}[E_1]_0) - 2k_{2+}[E_2]_0},$$

$$[SE_2] = \frac{(c+b)(v' - k_{2+}[E_2]_0) - (a+1)(v' - k_{1+}[E_1]_0)}{(c+b)(3v' - 3k_{2+}[E_2]_0 - 2k_{1+}b[E_2]_0) + (a+1)(v' - k_{1+}[E_1]_0)},$$

$$v_R = \frac{(c+b)(v'-k_{2+}[E_2]_0) - (a+1)(v'-k_{1+}[E_1]_0)}{(c+b)(v'-k_{2+}[E_2]_0) + (a+1)(v'-k_{1+}[E_1]_0 - 2k_{2+}[E_2]_0)} k_{1+} b \varepsilon,$$

$$v_I = \frac{(c+b)(v'-k_{2+}[E_2]_0) - (a+1)(v'-k_{1+}[E_1]_0)}{(c+b)(3v'-3k_{2+}[E_2]_0 - 2k_{1+}b[E_2]_0) + (a+1)(v'-k_{1+}[E_1]_0)} k_{2+} \varepsilon.$$

Здесь $v' = v/\varepsilon$. Далее, деля на $(c+b)$ и подставляя $k_{1-}/k_{1+} = c\varepsilon$, $\bar{k}_{1+}/k_{1+} = b\varepsilon$, $k_{2-}/k_{2+} = a\varepsilon$, $\bar{k}_{2-}/k_{2+} = \varepsilon$, получаем:

$$[SE_1] = \frac{(K_I v - k_{2+}[E_2]_0) - \frac{K_{M,I}}{K_{M,R}} (K_I v - k_{1+}[E_1]_0)}{(K_I v - k_{2+}[E_2]_0) + \frac{K_{M,I}}{K_{M,R}} (K_I v - k_{1+}[E_1]_0 - 2k_{2+}[E_2]_0)},$$

$$[SE_2] = \frac{(K_I v - k_{2+}[E_2]_0) - \frac{K_{M,I}}{K_{M,R}} (K_I v - k_{1+}[E_1]_0)}{(3K_I v - 3k_{2+}[E_2]_0 - 2k_{1+}b[E_2]_0) + \frac{K_{M,I}}{K_{M,R}} (K_I v - k_{1+}[E_1]_0)},$$

$$v_R = \frac{(K_I v - k_{2+}[E_2]_0) - \frac{K_{M,I}}{K_{M,R}} (K_I v - k_{1+}[E_1]_0)}{(K_I v - k_{2+}[E_2]_0) + \frac{K_{M,I}}{K_{M,R}} (K_I v - k_{1+}[E_1]_0 - 2k_{2+}[E_2]_0)} \bar{k}_{1+},$$

$$v_I = \frac{(K_I v - k_{2+}[E_2]_0) - \frac{K_{M,I}}{K_{M,R}} (K_I v - k_{1+}[E_1]_0)}{(3K_I v - 3k_{2+}[E_2]_0 - 2k_{1+}b[E_2]_0) + \frac{K_{M,I}}{K_{M,R}} (K_I v - k_{1+}[E_1]_0)} \bar{k}_{2+},$$

где $K_I = k_{2+}/\bar{k}_{2+}$. Утверждение доказано.

Доказательство утверждения 8. Возьмем $\varepsilon_0 = \min\left(\frac{v}{2k_{2+}[E_2]_0}, \frac{v}{2bk_{1+}[E_1]_0}\right)$,

тогда для любого $\varepsilon < \varepsilon_0$ имеем $v/2 > [E_2]_0 \bar{k}_{2+}$ и $v/2 > [E_1]_0 \bar{k}_{1+}$, и, следовательно, $v > [E_2]_0 \bar{k}_{2+} + [E_1]_0 \bar{k}_{1+}$. Тогда получаем, что система имеет только квазистационарное решение, причем $v_I \rightarrow \bar{k}_{2+}[E_2]_0 = V_{\max,I}$, $v_R \rightarrow \bar{k}_{1+}[E_1]_0 = V_{\max,R}$ при $t \rightarrow \infty$, утверждение доказано.

Материал поступил в редакцию 14 февраля 2006 г., опубликован 9 марта 2006 г.