

AMPERMETRINIO BIOJUTIKLIO SU ALOSTERINIO FERMENTO SLUOKSNIU KOMPIUTERINIS MODELIAVIMAS

Liutauras Ričkus

Vilnius University, Faculty of Mathematics and Informatics
liutauras.rickus@mif.vu.lt

Anotacija. Darbe atiekamas ampermetrinio biojutiklio su alosteriniu fermentu veikimo matematinis modeliavimas. Matematinio modelio pagrindą sudaro reakcijos-difuzijos lygtys su netiesiniais nariais. Dėl netiesiškumo modelis analiziškai sprendžiamas tik konkrečioms parametru reikšmėms, o bendrai naudojami skaitiniai metodai. Matematinis modelis aprašo biojutiklio veikimą vienmatėje erdvėje, sudarytoje iš fermento ir išorinės difuzijos sluoksnių. Šio darbo tikslas – nustatyti, kokiomis savybėmis pasižymi biojutiklis su alosterinio fermento sluoksniu ir kaip kinta atsako priklausomybė nuo kooperavimo (Hill) koeficiento reikšmės, substrato koncentracijos bei difuzijos sluoksnio storio.

Pagrindiniai žodžiai: biojutiklis, alosterinis fermentas, matematinis modeliavimas, kooperavimo koeficientas.

Įvadas

Biojutikliai yra matavimo įrenginiai skirti aptikti tiriamajai medžiagai tirpale arba jos koncentracijai nustatyti (Sheller, Schubert, 1992). Biojutikliai plačiai taikomi medicinoje, aplinkosaugoje ir maisto pramonėje (Sheller, Schubert, 1992). Veikiant biojutikliui tiriamoji medžiaga, substratas, fermentinės reakcijos metu reaguoja su fermentu (Baronas ir kt., 2010). Ampermetrinų biojutiklių atveju biojutiklio atsakas yra matuojamas kaip anodinė ar katodinė srovė ant elektrodo paviršiaus, proporcinga reakcijos produkto koncentracijai (Baronas ir kt., 2010; Sheller, Schubert, 1992). Matematinuose biojutiklių veikimo modeliuose fermentinė reakcija dažniausiai aprašoma naudojant netiesinius narius (Baronas ir kt., 2010; Britz, 2005). Tokiais atvejais analiziniai sprendiniai egzistuoja tik esant labai konkrečioms modelio parametru reikšmėms (Baronas ir kt., 2010). Biojutiklis su alosterinio fermento sluoksniu aprašomas naudojant netiesinius reakcijos narius (Trat, 2008; Yang ir kt., 2004).

Nagrinėjamas matematinis modelis biojutiklio veikimą aprašo vienmatėje erdvėje, sudarytoje iš trijų sričių. Fermentinį sluoksnį sudaro alosterinis fermentas sugebantys vienu metu jungti kelias substrato molekules (Kuhert ir kt., 2010), kuriame vyksta fermentinė reakcija ir medžiagų difuzija. Difuzijos sluoksnyje medžiagos tik difunduoja, difuzijos procesai matematiškai aprašomi taikant Fiko dėsnį.

Kuriant biojutiklius, labai svarbu perprasti juose vykstančius reiškinius. Kad pavyktų sukurti efektyvų ir patikimą biojutiklį, reikia sukurti biojutiklio modelį (Corcuera ir kt., 2004; Ferreira ir kt., 2003). Nuo 1970 metų, kai buvo pradėti biojutiklių tyrimai, sukurta nemažai matematinių biojutiklių modelių, modeliuojančių konkrečių biojutiklių veikimą

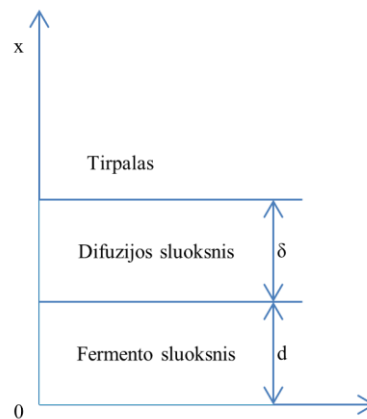
(Mell, Maloy, 1975; Kernevez, 1980; Kulys, 1981; Bartlett, Whitaker, 1987). Išsami biojutiklių modelių apžvalga pateikta R. Barono ir kt. knygoje (2010). Alosterionius fermentus ir jų straipsnių apžvalga aprašyta keliose straipsniuose (Kuhert ir kt., 2011; Yang ir kt., 2005). Biojutiklių modeliuose nebuvo atsižvelgiama į išorinį difuzijos sluoksnį. Medžiagų išorinės difuzijos svarba ampermetrinio biojutiklio atsakui jau buvo tirta (Šimelevičius, Baronas, 2011). Taikant skaitinį modeliavimą buvo iširta išorinės difuzijos sluoksnio storio įtaka biojutikliams su sinerginių substratų stiprinimu. Difuzijos sluoksnio įtaka biojutikliams su alosteriniu fermentu nebuvo tirta, iki šiol šiems biojutikliams nėra paskelbta matematinio modelio, aprašančio substrato ir reakcijos produkto koncentracijų dinamiką, atsižvelgiant į vidinę ir išorinę medžiagų difuziją.

Šio darbo tikslas yra sukurti dinaminį biojutiklio modelį, kuris užtikrintu alosterinio fermento pagrindu veikiančio biojutiklio kompiuterinį modeliavimą ir kurį būtų galima taikyti biojutiklio parametrų įtakai iširti. Matematinis modelis susideda iš dviejų sričių, atitinkančių tris biojutiklio fizinius sluoksnius.

1. Matematinis modelis

1.1 Biojutiklio struktūra

Matematiniam modelyje laikome, kad biojutiklis yra elektrodas, kurio paviršius yra padengtas plonu alosterinio fermento sluoksniu. Modeliuojami trys biojutiklio sritys: fermento sluoksnis, kuriame vyksta visos biocheminės reakcijos ir medžiagų difuzija, difuzijos sluoksnis, kuriame vyksta tik difuzija ir buferinis tirpalas, kuriame palaikoma vienoda medžiagų koncentracija. Biojutiklio struktūra pavaizduota 1 pav.



1 pav. Biojutiklio struktūra.

Apibrėžkime, kad nuo 0 iki d yra fermento sluoksnis, o nuo d iki $d + \delta$ yra difuzijos sluoksnis. Taip pat laikoma, kad už šio sluoksnio ribos medžiagų koncentracija yra vienoda kiekviename taške ir laikui bėgant nekinta.

1.2. Biojutiklio veikimas

Darbe nagrinėjamas biojutiklis yra sudarytas iš alosterinio fermento sluoksnio (Kuhert ir kt., 2010). Substratas (S) jungiasi su alosteriniu (n) fermentu (E) virsta junginiu (ES_n) junginys skyla į produktą (P) ir atlaisvinamas fermentas. Ši reakcijas aprašoma (Duane, 2010):



Apibendrinant schemą galima teigti (Duane, 2010), kad biojutikliuose substratas reaguodamas su fermentu gamina produktą greičiu:

$$V = \frac{V_{\max} S^h}{S^h + K_m^h}, \quad (2)$$

čia V – reakcijos greitis, V_{\max} yra Michaelio konstanta, h – kooperavimo (Hill) koeficientas, S – substrato koncentracija.

1.3. Pagrindinės lygtys

Medžiagų koncentracijų pokyčius fermento sluoksnyje galima aprašyti Hillo lygtimi (Varies, 2013),

$$\begin{aligned} \frac{\partial S_e}{\partial t} &= D_{S_e} \frac{\partial^2 S_e}{\partial x^2} - \frac{V_{\max} S_e^h}{K_M^h + S_e^h}, \\ \frac{\partial P_e}{\partial t} &= D_{P_e} \frac{\partial^2 P_e}{\partial x^2} + \frac{V_{\max} S_e^h}{K_M^h + S_e^h}, \\ x &\in (0, d), h > 0, t > 0, \end{aligned} \quad (3)$$

čia t – laikas, x – atstumas nuo elektrodo, $S_e(x, t)$ ir $P_e(x, t)$ yra substrato ir produkto koncentracijos fermento sluoksnyje, d – fermento sluoksnio storis, D_{S_e} ir D_{P_e} yra difuzijos koeficientai fermento sluoksnyje.

Koncentracijos pokyčius dėl difuzijos galima aprašyti remiantis Fiko dėsniumi. Gauname tokias lygtis:

$$\begin{aligned} \frac{\partial S_b}{\partial t} &= D_{S_b} \frac{\partial^2 S_b}{\partial x^2}, \\ \frac{\partial P_b}{\partial t} &= D_{P_b} \frac{\partial^2 P_b}{\partial x^2}, \\ x &\in (d, d + \delta), \quad t > 0, \end{aligned} \quad (4)$$

čia δ – difuzijos sluoksnio storis, $S_b(x, t)$ ir $P_b(x, t)$ yra substrato ir produkto koncentracijos difuzijos sluoksnyje, atitinkamai D_{S_b} ir D_{P_b} difuzijos koeficientai šiame sluoksnyje.

1.4. Pradinės sąlygos

Pradiniu laiko momentu ($t = 0$), visų medžiagų koncentracijos visuose sluoksniuose yra nulinės, išskyrus pirmo substrato koncentracija S_0 :

$$S_e(x, 0) = 0, \quad P_e(x, 0) = 0, \quad x \in [0, d], \quad (5)$$

$$\begin{aligned} S_b(x, 0) &= 0, P_b(x, 0) = 0, \\ x &\in [d, d + \delta), \\ S_b(d + \delta, 0) &= S_0, P_b(d + \delta, 0) = 0, \end{aligned}$$

1.5. Kraštinės sąlygos

Biojutikliui veikiant ($t > 0$) medžiagoms taikoma nepralaidumo sąlyga ant elektrodo paviršiaus. Tirpale medžiagų koncentracija išlieka pastovios, o difuzijos sluoksnis δ išlieka nekintanti:

$$\begin{aligned} S_b(d + \delta, t) &= S_0, P_b(d + \delta, t) = 0, \\ P_e(0, t) &= 0, \\ D_{S_e} \frac{\partial S_e}{\partial x} \Big|_{x=0} &= 0, t > 0. \end{aligned} \tag{6}$$

1.6. Derinimo sąlygos

Skirtingi biojutiklio sluoksniai turi skirtingus difuzijos koeficientus, todėl šių sluoksnių sandūroms aprašyti reikalingos derinimo sąlygos ($t > 0$):

$$\begin{aligned} D_{S_e} \frac{\partial S_e}{\partial x} \Big|_{x=d} &= D_{S_b} \frac{\partial S_b}{\partial x} \Big|_{x=d}, \\ S_e(d, t) &= S_b(d, t), \\ D_{P_e} \frac{\partial P_e}{\partial x} \Big|_{x=d} &= D_{P_b} \frac{\partial P_b}{\partial x} \Big|_{x=d}, \\ P_e(d, t) &= P_b(d, t), \end{aligned} \tag{7}$$

1.7. Biojutiklio atsakas

Ampermetrinio biojutiklio atsakas yra elektros srovės stipris, kuris yra tiesiogiai proporcingas produkto P1 koncentracijos srautui elektrodo paviršiuje (Scheller, Schubert, 1992; Turner ir kt., 1987). Srovė taip pat yra tiesiogiai proporcinga elektrodo paviršiaus plotui. Elektrodo paviršiaus plotas nėra svarbus biojutiklio parametras, todėl į jį neatsižvelgsime ir vietoje srovės naudosisime srovės tankį. Biojutiklio srovės tankį galime apskaičiuoti remdamiesi Faradėjaus ir Fiko dėsniais:

$$i(t) = n_e F D_{P_e} \frac{\partial P_e}{\partial x} \Big|_{x=0}, \tag{8}$$

čia n_e yra krūvio mainuose elektrodo paviršiuje dalyvaujančių elektronų skaičius, F yra Faradėjaus konstanta $F = 96486 \text{C/mol}$. Laikome, kad sistema pasiekia pusiausvyrą, kai $t \rightarrow \infty$

$$I = \lim_{t \rightarrow \infty} i(t), \tag{9}$$

čia I žymi pusiausvyros biojutiklio srovės tankį.

Šiame straipsnyje nagrinėsime biojutiklio atsako priklausomybę nuo sluoksnių storių. Tokiems skaičiavimams plačiai naudojamas Biot skaičius Bi , kuris nusako nedimensinį santykį tarp vidinio ir išorinio sluoksnių (Aris, 1975),

$$Bi = \frac{d/D_{S_e}}{\delta/D_{S_b}} = \frac{D_{S_b}d}{D_{S_e}\delta} \quad (10)$$

1.8. Skaitinis modeliavimas

Analiziniai sprendiniai dažniausiai negalimi sprendžiant netiesines diferencialines lygtis dalinėmis išvestinėmis (Kernevez, 1980; Schulmeister, 1990; Britz, 2010). Biojutiklio modeliavimo uždavinys buvo išspręstas skaitiniu baigtinių skirtumų metodu (Britz, 2010; Samarskii, 2001). Buvo sudaryta išreikštinė baigtinių skirtumų schema naudojanti tolygųjų diskretųjų tinklą su 200 tinklo mazgų kiekviename biojutiklio sluoksnyje. Skaitinį modelį sprendžianti programinė įranga buvo realizuota Java programavimo kalba. Simuliacijos laiku buvo pasirinktas momentas, kai biojutiklio srovės pokytis pasidaro nykstamai mažas, tarp dviejų gretimų atsako reikšmių tampa mažesnis nei norimas dydis ϵ . Toks atsakas pasiekiamas per laiką T :

$$T = \min_{i(t)>0} \left\{ t: \frac{t}{i(t)} \left| \frac{di(t)}{dt} \right| < \epsilon \right\} \quad (11)$$

Skaičiavimuose naudojome $\epsilon = 10^{-2}$.

Dvisluoksniams matematiniam modeliui analizinis sprendinys žinomas, kai substrato koncentracija yra $S_0 \ll K_M$ ir kai $S_0 \gg K_M$. Modelio adekvatumu įsitikinta didinant parametro K_M reikšmę reakcijos greitis artėja prie 0, o didinant koncentraciją S_0 reikšmę reakcijos greitis artėja prie V_{max} (Baronas ir kt., 2010). Santykinis skirtumas tarp skaitinio ir analizinio sprendinių artėjo į nulį. Šios modelio parametrų vertės nekito visuose skaitiniuose eksperimentuose:

$$\begin{aligned} D_{S_e} = D_{P_e} = 300 \mu\text{m}^2/\text{s}, \quad n_e = 2, \quad D_{S_e} = D_{P_e} = \\ 600 \mu\text{m}^2/\text{s} \\ K_M = 100 \mu\text{M}, \quad V_{max} = 100 \mu\text{M}/\text{s}, \\ d = 100 \mu\text{m}, \quad \delta = 200 \mu\text{m}. \end{aligned} \quad (12)$$

Dvisluoksnių biojutiklio veikimo modelio atsako priklausomybė nuo laiko, esant skirtingiems kooperavimo koeficientams pateikta 2 pav. Skaičiavimuose naudotos (12) modelio parametrų reikšmės. Kooperavimo koeficientui įgyjant reikšmes: 1 (1), 1,2 (2), 1,4 (3), 2 (4) 2,5 (5).

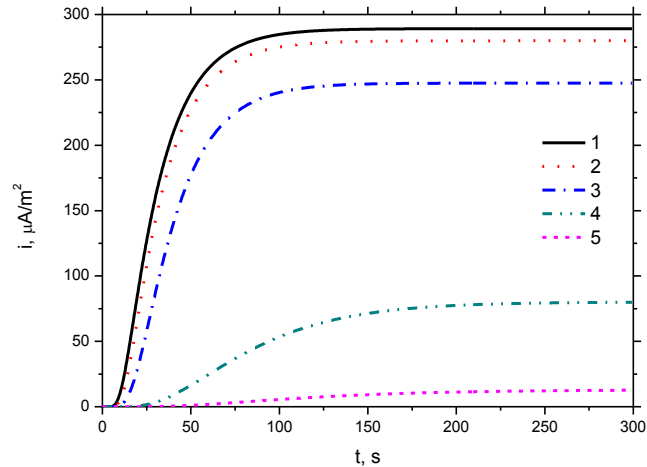
Kaip matyti iš 2 pav., reakcijos atsako srovė mažėja taikant didesniais kooperavimo koeficiento reikšmėmis.

2. Rezultatai

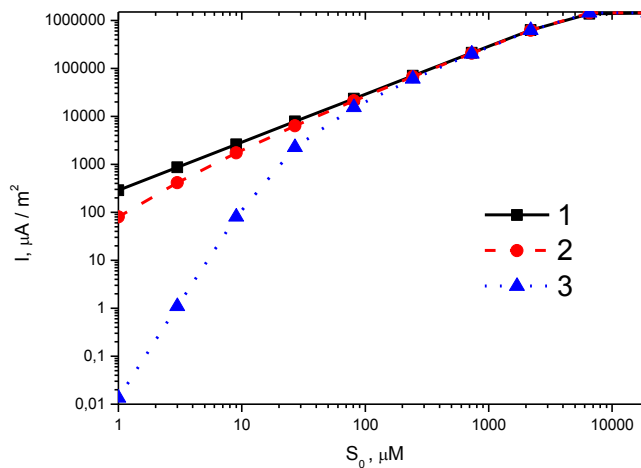
2.1. Biojutiklio atsako priklausomybė nuo substrato koncentracijos

Buvo tirta biojutiklio atsako priklausomybė nuo substrato koncentracijos esant skirtingoms kooperavimo koeficiento reikšmėms. Rezultatai pateikiami 3 pav.

Rezultatuose pastebima priklausomybė nuo substrato koncentracijos. Didėjant koncentracijai atsakas stabilizuojasi ir nebeprisiklauso nuo kooperavimo koeficiento. Didelei substrato koncentracijos kooperavimo koeficientas įtakos nebeturi. Skaitinis sprendinys sutampa su analiziniu sprendiniu $S_0 \gg K_M$ ir sutampa su gautais modelio stebėjimais.



2 pav. Biojutiklio atsakas skirtingoms kooperacijos koeficiento reikšmėms h : 1 (1), 1.2 (2), 1.4 (3), 2 (4), 2.5 (5); $S_0 = 1 \mu\text{M}$.



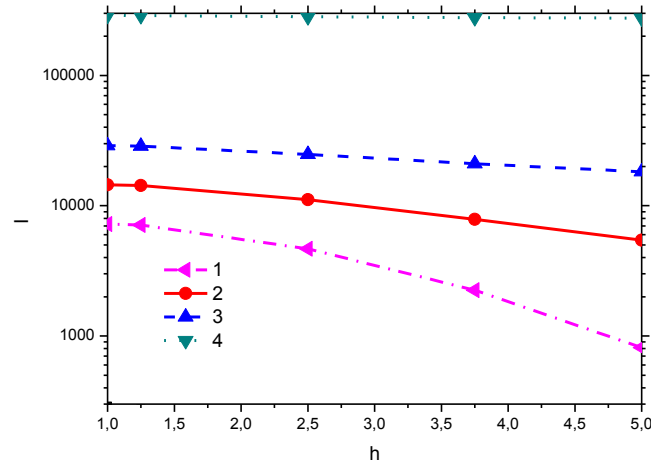
3 pav. Biojutiklio atsako priklausomybė nuo substrato koncentracijos esant skirtingoms kooperavimo koeficiento reikšmėms h : 1 (1), 2 (2), 4 (3).

Biojutiklio atsako priklausomybė nuo substrato koncentracijos buvo tirta esant kooperacijos koeficientų reikšmėms $h = 1$ (1), 2 (2), 4 (3).

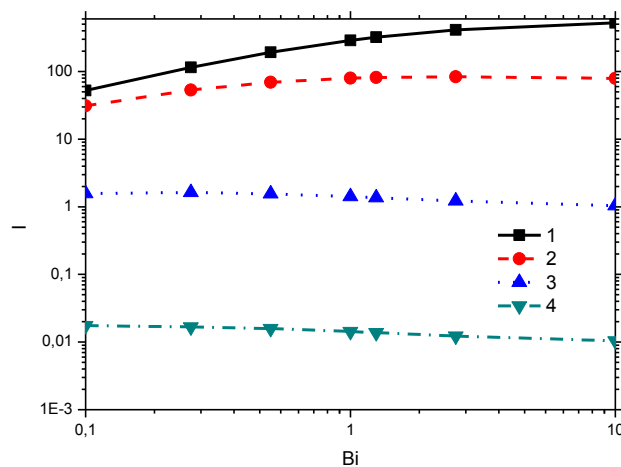
Iš 3 pav. taip pat matome, jog mažoje substrato koncentracijoje kooperavimo koeficientas keičia atsako stiprumą, kuo didesnė h reikšmė tuo mažesnis atsakas prie tokių pačių koncentracijų. Nealosterinis fermentas $h = 1$ (1) priklausomybė nuo koncentracijos yra tiesiška, o alosterinio fermento priklausomybė kinta eksponentiškai.

2.2. Biojutiklio atsako priklausomybė nuo kooperavimo koeficiento

Biojutiklio atsako priklausomybę nuo kooperavimo koeficiento buvo tirta esant skirtingoms substrato S_0 koncentracijų reikšmėms. Rezultatai pateikiami 4 pav.



4 pav. Biojutiklio atsako priklausomybė nuo kooperavimo koeficiento esant skirtingoms substrato koncentracijoms S_0 : 25 μM (1), 50 μM (2), 100 μM (3), 1000 μM (4).



5 pav. Biojutiklio atsako priklausomybė nuo Bi esant skirtingoms kooperacijos koeficiento reikšmėms h : 1 (1), 2 (2), 3 (3), 4 (4); $S_0 = 1 \mu\text{M}$.

Iš grafiko matome, jog esant santykinai didelei koncentracijai biojutiklio atsako kooperavimo koeficientas didelės reikšmės neturi. Tačiau esant mažai substrato koncentracijai didėjant kooperavimo reikšmei atsakas silpnėja.

Galime daryti išvadą, kad jei gauname atsaką silpnesnį nei apskaičiuotas teorinis, tai visai tikėtina, jog fermentas yra alosterinis ir vėliau į tai reikėtų atsižvelgti.

2.3. Biojutiklio atsako priklausomybė nuo sluoksnių santykio

Biojutiklio atsako priklausomybė nuo sluoksnių santykio pasinaudojant Biot skaičių buvo tirta esant parametrą kaip aprašyta (12), tik kito δ reikšmė. Rezultatai pateikiami 5 pav.

Kaip matome iš grafiko esančio 5 pav., didėjant kooperavimo koeficiento reikšmei biojutiklio atsakas nuo difuzijos storio nepriklauso. Artėjant kooperavimo koeficiento reikšmei prie vieneto (nealosterinio fermento) difuzijos sluoksnio storis daro įtaką atsakui.

Galime daryti išvada, kad kuo didesnė h reikšmė tuo mažiau atsakas priklauso nuo sluoksnių storių ir atsakas tampa nejautrus maišymo intensyvumui.

Išvados

Matematinis modelis (3)–(7) gali būti sėkmingai taikomas biojutiklių su alosteriniu fermentų sluoksniu veiksenos dėsninimumams tyrinėti. Modelis gali būti naudojamas kaip biojutiklio parametrų optimizavimo įrankis dar prieš gaminant fizinį biojutiklį. Juo taip pat galima patikrinti ar esančiame biojutiklyje fermento sluoksnis yra alosterinis.

Skaitinio modeliavimo rezultatai parodė, kad esant dideliai substrato koncentracijai kooperavimo koeficientas įtakos neturi ir galima naudoti nealosterinio fermento modelius. Esant mažai koncentracijai kooperavimo koeficientas mažina atsako reikšmę ir prailgina reakcijos laiką.

Alosterinis fermentas gali būti naudojamas tais atvejais, kai difuzijos sluoksnis yra kintamas, nes prie didelės kooperavimo koeficiento reikšmės biojutiklio atsakas nuo sluoksnių storių mažai priklauso. Tai labai gera savybė, tačiau reikia nepamiršti, kad atsako srovė mažėja.

Literatūra

- Aris, R. (1975). *The Mathematical Theory of Diffusion and Reaction in Permeable Catalysts: The theory of the steady state*. Clarendon: Oxford University Press.
- Baronas, R., Ivanauskas, F., Kulys, J. (2010). *Mathematical Modeling of Biosensors*. Dordrecht: Springer.
- Bartlett, P. N., Whitaker, R. G. (1987). Electrochemical immobilisation of enzymes. Part I: Theory. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, Volume 224, Issue 1–2, 27–35.
- Britz, D. (2010). *Digital Simulation in Electrochemistry*, 3rd Edition. Berlin: Springer Berlin Heidelberg New York.
- Corcuera, J. I. R. D., Cavalieri, R. P., Powers, J. R., Tang, J. (2004). Amperometric enzyme biosensor optimization using mathematical modeling. In *Proceedings of the 2004 ASAE/Csae Annual International Meeting*.
- Duane, W. S. (2010). Enzyme Kinetics. <http://mcdwebarchive.mcdb.ucsb.edu/sears/biochemistry/tw-kin/enzymekinetcs.htm>
- Ferreira, L. S., Souza, M. B. D., Trierweiler, J. O., Broxtermann, O., Folly, R. O. M., Hitzmann, B. (2003). „Aspects concerning the use of biosensors for process control: experimental and simulation investigations“ *Computers and Chemical Engineering*, Volume 27, Issue 8–9, 1165–1173.

- Yang, C. R., Shapiro, B. E., Mjolsness, E. D.; Hatfield, G. W. (2005). „An enzyme mechanism language for the mathematical modeling of metabolic pathways“ *Bioinformatics* 21: 774-780.
- Kernevez, J. P. (1980). *Enzyme Mathematics: Studies in Mathematics and its Applications*. Amsterdam: North-Holland Publishing Company.
- Kuhert, N., Daiposh, F., Jaiswal, R, Matei, M., Deshpande, S., Golon, A., Nous, H., Karaköse, H., Hourani N. (2011). „Hill coefficients of dietary polyphenolic enzyme inhibitors: can beneficial health effects of dietary polyphenols be explained by allosteric enzyme denaturing?“ *Chem Biol* 4: 109-116.
- Kulys, J. (1981). „The development of new analytical systems based on biocatalysts“ *Analytical Letters*, Volume 14, Issue. 6, 377–397.
- Mell, L.D., Maloy, J.T. (1975). „A model for the amperometric enzyme electrode obtained through digital simulation and applied to the immobilized glucose oxidase system“ *Analytical Chemistry* Volume 47 Issue 2, 299–307.
- Samarskii, A. A. (2001). *The Theory of Difference Schemes*. New York: Marcel Dekker.
- Scheller, F., Schubert, F. (1992). *Biosensors*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.
- Schulmeister, T. (1990). „Mathematical modelling of the dynamic behaviour of amperometric enzyme electrodes“ *Selective Electrode Reviews* 12: 203–260.
- Šimelevičius, D., Baronas, R. (2011). „Amperometrinių biojutiklių su sinerginių substratų stiprinimu kompiuterinis modeliavimas“ *Informacijos mokslai* 56: 174-181.
- Traut, T. (2008). *Allosteric Regulatory Enzyme*. New York: Springer Science+Business Media.
- Tuner, A. P. F., Karube, I., Wilson, G. S. (1987). *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford: Oxford University Press.
- Varies, S. Allosteric enzymes. <http://biochemistry.wur.nl/CellCycle/CCAllostericKinetics.html>

L. Ričkus yra Vilniaus universiteto doktorantas, baigęs magistrą 2004 metais, besidomintis biojutiklių modeliavimu ir internetinėmis technologijomis.

MODELING AMPEROMETRIC BIOSENSORS BASED ON ALLOSTERIC ENZYMES

Liutauras Ričkus

Summary

Computational modeling of a biosensor with allosteric enzyme layer was investigated in this study. The operation of the biosensor is modeled using non-stationary reaction-diffusion equations. The model involves three regions: the allosteric enzyme layer where the allosteric enzyme reactions as well as then mass transport by diffusion take place, the diffusion region where the mass transport by diffusion and non-enzymatic reactions take place and the convective region in which the analyte concentration is maintained constant. The biosensor response on dependency substrate concentration, cooperativity coefficient and the diffusion layer thickness on the same parameters have been studied.

Key words: biosensor, allosteric enzyme, mathematical modeling, Hill coefficient.