

ПРИБЛИЖЕННОЕ АНАЛИТИЧЕСКОЕ РЕШЕНИЕ ПРОСТЕЙШЕЙ СИСТЕМЫ КИНЕТИЧЕСКИХ УРАВНЕНИЙ, ОПИСЫВАЮЩИХ ПРОЦЕСС ФЕРМЕНТАТИВНОГО СИНТЕЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

© 2016 г. А. А. Федоров^{1,*}, А. С. Бердников¹, Д. Г. Сочивко², Д. А. Варламов³,
В. Е. Курочкин¹, академик РАН Р. В. Петров⁴

Поступило 17.06.2016 г.

Модели макроскопического кинетического описания процесса полимеразной цепной реакции (ПЦР) на данный момент решаются исключительно численными методами, что затрудняет разработку эффективных программных алгоритмов обработки результатов реакции. В работе рассматривается применение метода гомотопического возмущения для получения приближенного аналитического решения простейшей системы уравнений ферментативной кинетики, описывающей синтез молекул нуклеиновых кислот в процессе ПЦР. Полученное приближенное аналитическое решение с высокой точностью воспроизводит результат численного решения системы в широком диапазоне соотношения концентраций фермента и субстрата: как для случая значительного превышения концентрации субстрата над ферментом, так и наоборот.

DOI: 10.7868/S0869565216300265

Большинство химических реакций, происходящих в живых организмах, протекают при участии ферментов. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), основанный на ферментативной цепной реакции синтеза нуклеиновых кислот, является на сегодняшний день одним из основных диагностических инструментов в генетических исследованиях. С помощью модификации данного метода — метода ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводят количественный анализ специфических фрагментов ДНК или РНК. В ходе ПЦР, при участии фермента ДНК-полимеразы, происходит циклическое копирование целевого фрагмента молекулы нуклеиновой кислоты (НК) с пропорциональным накоплением сигнала, генерируемого флуоресцентными зондами при синтезе комплементарных цепей НК. Регистрация флуоресцентного сигнала данного процесса в режиме online дает характерные S-образные кривые, называемые кривыми ПЦР-РВ, по которым определяется начальное количество целевого фрагмента генома.

Ключевым моментом современных программных алгоритмов обработки данных приборов ПЦР-РВ является аппроксимация получаемых кривых ПЦР-РВ некоторыми “искусственными” функциями с последующим определением условных интегральных параметров данных функций, наиболее распространенным среди которых является так называемый пороговый цикл. В ряде случаев подобные алгоритмы обработки данных ПЦР-РВ приводят к значительным ошибкам в определении количества искомого фрагмента НК в пробе. Разработка алгоритмов обработки данных ПЦР-РВ на основе аналитических математических моделей ПЦР, очевидно, является наиболее эффективным путем совершенствования подобных алгоритмов.

Количественное описание процесса синтеза НК, как и всей ПЦР, может быть получено с помощью дифференциальных уравнений ферментативной кинетики [1–4]. В рамках данного подхода было предложено достаточно много моделей, нацеленных на исследование различных аспектов процесса [1–4]. Однако все без исключения модели, способные хотя бы в грубом приближении описать процесс ПЦР, решаются исключительно численными методами.

Получить приближенные аналитические решения простых ферментативных моделей позволил метод гомотопического возмущения. Так, в работах [5, 6] получены весьма точные аналитические выражения временной динамики компонент классической системы Михаэлиса–Ментен.

¹ Институт аналитического приборостроения
Российской Академии наук, Санкт-Петербург

² ЗАО “Синтол”, Москва

³ Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии, Москва

⁴ Государственный научный центр
“Институт иммунологии” ФМБА России, Москва

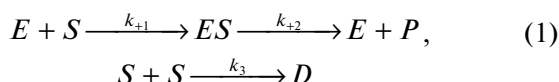
* E-mail: faa@bk.ru

В работах [7, 8] получено решение для более сложных случаев обратимости конечной стадии реакции, случая инактивации фермента, а также случая положительной обратной связи, приводящей к появлению периодических решений.

Однако, как показал анализ результатов данных работ, точность получаемых аналитических решений определяется комбинацией параметров системы: в определенных диапазонах значений параметров ошибка аналитического приближения может составлять доли процента, в других – может не только заметно отличаться по значению, но и иметь характер, не совпадающий с результатом численного решения.

Цель настоящей работы – построение с помощью метода гомотопического возмущения приближенного аналитического решения простейшей системы уравнений ферментативной кинетики, которую можно рассматривать как упрощенную модель полимеразной цепной реакции.

В данной модели ограничимся рассмотрением двух основных процессов, происходящих в течение цикла ПЦР – синтез и гибридизация НК. Считая, что диссоциация субстрат-ферментного комплекса пренебрежимо мала, можно записать следующую схему реакций модели:



где S – одиночная цепь НК, E – фермент, ES – комплекс S и фермента, P – двойная цепь НК, синтезированная в ходе цикла ПЦР (продукт), D – двойная цепь НК, образованная в результате гибридизации исходных (дуплекс). Введем обозначения: $s(t)$ – концентрация молекул НК S , $e(t)$ – концентрация свободных молекул фермента E , $c(t)$ – концентрация комплекса ES , $v(t)$ – концентрация конечного продукта P , $w(t)$ – концентрация дуплекса, k_{+1} – константа скорости реакции образования ES , k_{+2} – константа скорости реакции образования P , k_3 – константа скорости образования дуплекса. В данных обозначениях рассматриваемый процесс можно описать следующей системой дифференциальных уравнений ферментативной кинетики:

$$\begin{aligned} \frac{ds(t)}{dt} &= -k_{+1}s(t)e(t) - k_3s(t)^2, \\ \frac{de(t)}{dt} &= -k_{+1}s(t)e(t) + k_{+2}c(t), \\ \frac{dc(t)}{dt} &= k_{+1}e(t)s(t) - k_{+2}c(t), \\ \frac{dw(t)}{dt} &= k_3s(t)^2, \quad \frac{dv(t)}{dt} = k_{+2}c(t). \end{aligned} \quad (2)$$

Функции $v(t)$ и $w(t)$ могут быть получены простым интегрированием из последних двух уравне-

ний системы (2), а потому рассматриваться далее не будут. Поскольку концентрация свободного фермента может быть элементарно определена путем вычитания из исходной концентрации фермента текущей концентрации промежуточного комплекса и продукта, то фактически остается решить систему двух дифференциальных уравнений относительно функций $s(t)$ и $c(t)$. Выполнив переход к безразмерным концентрациям $c(t) = x(\tau)/e(0)$, $s(t) = y(\tau)/e(0)$ и времени $t = \tau/(k_{+1}e(0))$, где $e(0)$ – исходная концентрация молекул фермента, можно получить следующую систему уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{dy(\tau)}{d\tau} &= -y(\tau)[1 - x(\tau)] - \delta y^2(\tau), \\ \frac{dx(\tau)}{d\tau} &= y(\tau)[1 - x(\tau)] - \mu \cdot x(\tau), \\ y(0) &= \varepsilon, \quad x(0) = 0, \end{aligned} \quad (3)$$

где $\mu = k_{+2}/(k_{+1}e(0))$, $\varepsilon = s(0)/e(0)$, $\delta = k_3/k_{+1}$. Более детальное описание процедуры перехода к безразмерным величинам можно найти в [9].

Далее приведем краткое описание алгоритма поиска решения методом гомотопического возмущения, опуская обоснования и комментарии, которые можно найти в приведенных ссылках. Согласно методу гомотопического возмущения [10] прежде всего из исходного нелинейного уравнения (системы) $M[f] = 0$ относительно функции f необходимо выделить базовое уравнение $L[f] = 0$, в некотором смысле оптимальным образом аппроксимирующее уравнение $M[f] = 0$. Существенным требованием является то, что для уравнения $L[f] = 0$ должно иметься простое аналитическое решение (как правило, в качестве $L[f]$ берется та или иная линейная аппроксимация дифференциального оператора $M[f]$, для которой аналитическое решение имеется всегда). Далее необходимо сконструировать уравнение $N[f, p] = 0$, включающее дополнительный параметр p и имеющее вид $N[f, p] = (1 - p)L[f] + pM[f] = 0$. При $p = 0$ уравнение $N[f, p] = 0$ совпадает с уравнением $L[f] = 0$, для которого имеется известное аналитическое решение (тем самым поиск решения для $N[f, p] = 0$ в виде ряда по параметру p оказывается рутинной процедурой). При $p = 1$ уравнение $N[f, p] = 0$ совпадает с уравнением $M[f] = 0$, так что точное/приближенное решение уравнения $N[f, p] = 0$ после подстановки в него значения $p = 1$ оказывается точным/приближенным решением исходного уравнения $M[f] = 0$. Решение же уравнения $N[f, p] = 0$ можно искать в виде степенного ряда по параметру p : $f = f_0 + \sum p^k f_k$, где зачастую оказывается доста-

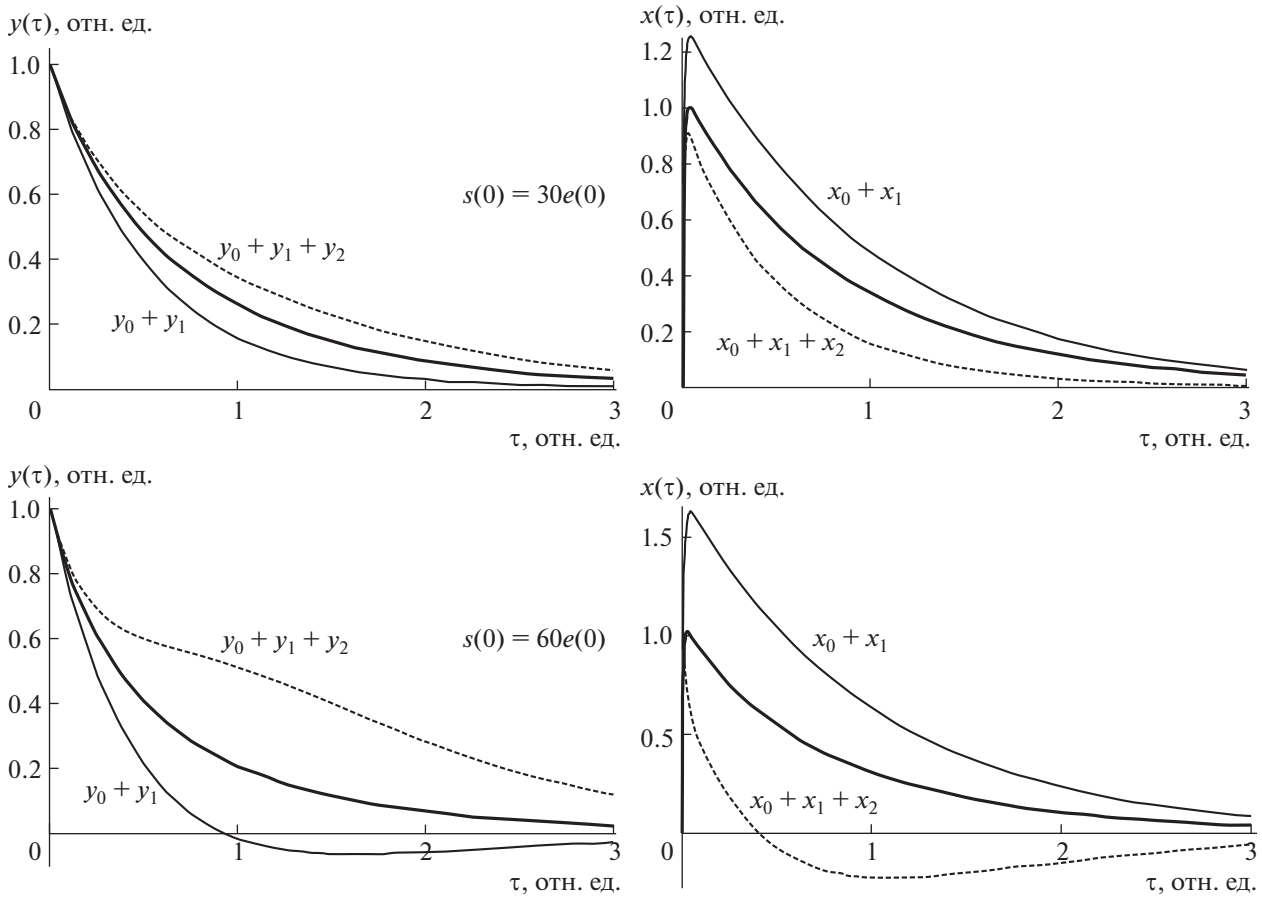


Рис. 1. Численное решение системы (1) и его аналитическая аппроксимация различным количеством слагаемых. Между графиками указана начальная концентрация молекул НК $s(0)$. Сплошная полуужирная линия – численное решение. Функции нормированы на максимальные значения, полученные численным решением.

точным учет лишь нескольких первых членов. При этом задача определения неизвестных членов ряда сводится к последовательности рекуррентных уравнений, в которых каждый последующий член ряда f_k без труда находится с помощью предыдущих f_{k-1}, f_{k-2} и т. д.

По аналогии с [5–7], в качестве базового линейного приближения $L[f] = 0$ выберем наиболее простой вариант:

$$\begin{aligned} \frac{dy(\tau)}{d\tau} + y(\tau) &= 0, \\ \frac{dx(\tau)}{d\tau} + \mu x(\tau) &= 0. \end{aligned} \quad (4)$$

Далее согласно алгоритму метода составляем уравнение $N[f, p] = 0$, представляем решение в виде суммы первых трех слагаемых ряда $y(\tau) = y_0(\tau) + p y_1(\tau) + p^2 y_2(\tau)$, $x(\tau) = x_0(\tau) + p x_1(\tau) + p^2 x_2(\tau)$ и подставляем в $N[f, p] = 0$. Раскрывая скобки, выполняем необходимые преобразова-

ния, и, выделяя коэффициенты при одинаковых степенях параметра p , получаем уравнения для нахождения функций $y_i(\tau)$ и $x_i(\tau)$. Решая данные уравнения, получаем ответ:

$$\begin{aligned} y_0(\tau) &= \varepsilon e^{-\tau}, & x_0(\tau) &= 0 \\ y_1(\tau) &= -\delta \varepsilon^2 e^{-\tau} + \delta \varepsilon^2 e^{-2\tau}, & x_1(\tau) &= \frac{\varepsilon}{\mu - 1} (e^{-\tau} - e^{-\mu\tau}) \\ y_2(\tau) &= \frac{\varepsilon^2(1 + \delta^2 \varepsilon \mu)}{\mu} e^{-\tau} - \frac{\varepsilon^2(1 + 2\delta^2 \varepsilon(\mu - 1))}{\mu - 1} e^{-2\tau} + \\ &+ \delta^2 \varepsilon^3 e^{-3\tau} + \frac{\varepsilon^2}{\mu(\mu - 1)} e^{\tau - (2+\mu)\tau} \\ x_2(\tau) &= \frac{\delta \varepsilon^2}{1 - \mu} e^{-\tau} + \frac{\varepsilon^2(\delta(\mu - 1) - 1)}{2 - 3\mu + \mu^2} e^{-2\tau} + \\ &+ \frac{\varepsilon^2(\mu - 1 - \delta)}{2 - 3\mu + \mu^2} e^{-\mu\tau} - \frac{\varepsilon^2}{(\mu - 1)} e^{-(\mu+1)\tau} \end{aligned} \quad (5)$$

Характерные значения параметров системы (2) для ПЦР, которые были использованы в численных расчетах следующие: $k_{+1} \sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $k_{+3} \sim$

$\sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [11]. Соответствующие безразмерные параметры системы принимают следующие значения: $\mu = 100$, а $\delta = 0.03$. Отметим, что при таких значениях параметров полученные приближенные аналитические решения (5) можно представить в более простом компактном виде. Начальная концентрация фермента $e(0) = 10^{-9} \text{ M}$, начальная концентрация НК $s(0)$ находится в интервале 10^{-19} – 10^{-6} M .

Анализ результатов моделирования показывает, что точность аппроксимации определяется начальной концентрацией НК $s(0)$, а точнее ее соотношением с начальной концентрацией фермента $e(0)$. В связи с этим начальная концентрация НК $s(0)$ далее приводится в отношении к $e(0)$.

Характер временной динамики решений исходной системы (5) практически не зависит от начальной концентрации НК. При малых концентрациях НК, т. е. при $s(0) \ll e(0)$, приближенные аналитические и численное решение практически не отличаются. Точность аппроксимации уменьшается по мере увеличения $s(0)$, визуальное различие графиков численного и приближенного решений начинает появляться при $s(0) = 10 \cdot e(0)$. Рисунок 1 иллюстрирует динамику компонентов реакции, рассчитанную численным и приближенным аналитическим методом при $s(0) > 10 \cdot e(0)$. Как видно из рис. 1, ошибка аппроксимации численного решения как суммой трех, так и двух слагаемых приблизительно одинакова, в связи с чем, приближенное аналитическое решение исходной системы можно ограничить первыми двумя слагаемыми ряда.

Таким образом, результаты работы свидетельствуют об эффективности использования метода гомотопического возмущения для получения приближенного аналитического решения макроскопических моделей ПЦР.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (уникальный идентификационный номер ПНИЭР RFMEFI60714X0095).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gevertz J.L., Dunn S.M., Roth C.M.* // *Biotechnol. and Bioeng.* 2005. V. 92. № 3. P. 346–355.
2. *Lee J.Y., Lim H.W., Yoo S.I., Zhang B.T., Park T.H.* // *Biochem. Eng. J.* 2006. V. 29. № 1. P. 109–118.
3. *Smith M.V., Miller C.R., Kohn M., Walker N.J., Portier C.J.* // *BMC Bioinform.* 2007. V. 8. № 1. P. 409.
4. *Cobbs G.* // *BMC Bioinform.* 2012. V. 13. № 1. P. 203.
5. *Uma Maheswari M., Rajendran L.* // *J. Math. Chem.* 2011. V. 49. № 8. P. 1713–1726.
6. *Varadharajan G., Rajendran L.* // *Nat. Sci.* 2011. V. 3. № 6. P. 459–465.
7. *Sarbaz Khoshnaw H.A.* // *Nat. Sci.* 2013. V. 5. № 6. P. 740–755.
8. *Varadharajan G., Rajendran L.* // *Appl. Math.* 2011. V. 2. № 9. P. 1140–1147.
9. *Бердников А.С., Федоров А.А., Сочивко Д.Г., Курочкин В.Е.* // *Науч. приборостроение.* 2014. Т. 24. № 2. С. 33–42.
10. *He J.H.* // *Comput. Methods Appl. Mech. Eng.* 1999. V. 178. № 3. P. 257–262.
11. *Mehra S., Hu W.S.* // *Biotechnol. Bioeng.* 2005. V. 91. № 7. P. 848–860.