

Matematičko modeliranje biokemijskih reakcija

Fabek, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:753201>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO–MATEMATIČKI FAKULTET
MATEMATIČKI ODSJEK

Katarina Fabek

MATEMATIČKO MODELIRANJE
BIOKEMIJSKIH REAKCIJA

Diplomski rad

Voditelj rada:
prof. dr. sc. Josip Tambača

Zagreb, travanj, 2023.

Ovaj diplomski rad obranjen je dana _____ pred ispitnim povjerenstvom u sastavu:

1. _____, predsjednik
2. _____, član
3. _____, član

Povjerenstvo je rad ocijenilo ocjenom _____.

Potpisi članova povjerenstva:

1. _____
2. _____
3. _____

Sadržaj

Sadržaj	iii
Uvod	1
1 Zakon očuvanja mase	2
2 Zakon djelovanja mase	4
3 Osnovne enzimске reakcije	7
3.1 Michaelis-Mentenova kinetika	7
3.2 Bisupstratni enzimi	16
4 Singularne perturbacije	19
4.1 Vanjsko (nesingularno) rješenje	19
4.2 Unutarnje (singularno) rješenje	21
4.3 Uniformna aproksimacija	23
5 Suicidna inhibicija	29
5.1 Procjene vremenskih skala	31
5.2 Bezdimezionalizacija	33
5.3 Unutarnje (singularno) rješenje	36
5.4 Vanjsko (nesingularno) rješenje	40
5.5 Uniformna aproksimacija	46
Bibliografija	49

Uvod

Enzimi su biološki katalizatori, tvari koje ubrzavaju biokemijske procese u živim organizmima, snižavajući energiju aktiviranja reakcije. U reakcijama se druge molekule, koje se nazivaju supstrati, pretvaraju u produkte, ali se sami enzimi pritom ne mijenjaju. Enzimi obično kataliziraju reakciju samo jednog određenog supstrata, što omogućuje da se važni biološki procesi, poput sinteze velikih molekula bjelančevina ili nukleinskih kiselina, odvijaju gotovo bez greške. Sam enzim ima jedno ili više aktivnih mjesta na koja se njegovi supstrati mogu vezati i time formirati kompleks. Enzimima se aktivnost može regulirati tvarima koje nisu njihovi supstrati. Inhibitori su molekule koje umanjuju aktivnost enzima, dok su aktivatori molekule koje povećavaju aktivnost enzima. Suicidni inhibitori, kojima se bavimo u zadnjem poglavlju, su inhibitori koji zauvijek inaktiviraju enzim.

U ovom radu dajemo uvod u kinetiku enzima, koja proučava brzinu kemijskih reakcija kataliziranih enzimima. Detaljnije se bavimo Michaelis-Mentenovom kinetikom, najjednostavnijim slučajem enzimске kinetike. Proučavamo enzimsku reakciju pretvaranja supstrata, pomoću enzimskog katalizatora, u krajnji produkt. U analizi pripadnog sustava, od velike važnosti će nam biti pretpostavka kvazistacionarnog stanja, koju iznosimo u ovom radu.

Na kraju se bavimo metodom singularnih perturbacija, koja se bavi proučavanjem problema koji ovise o malom parametru na takav način da se rješenja ponašaju neuniformno kako parametar teži prema nekoj vrijednosti od interesa. Tehnikom singularnih perturbacija naposljetku dobivamo vrlo točno asimptotsko rješenje i kod Michaelis-Mentenove kinetike i kod suicidalne inhibicije.

Poglavlje 1

Zakon očuvanja mase

U ovome radu analiziramo enzimске reakcije. Svakoј od njih pridružujemo odgovarajući sustav običnih diferencijalnih јednadžbi na kojem provodimo daljnju analizu. U ovom poglavlju predstaviti ćemo јedan od dva bitna zakona koja ćemo koristiti u tom postupku, prateći [5].

Zakon očuvanja mase, matematički zapisan kao:

$$\frac{dx}{dt} = v_+ - v_-, \quad (1.1)$$

kaže da je brzina promjene mase iznosa x u vremenu јednaka ulaznoj brzini v_+ kojoj je oduzeta izlazna brzina v_- (vidi [5, str. 11]).

Primjer 1.0.1. Promatraјmo јednostavni sustav, gdje je ulazna brzina $v_+ = 0$, a izlazna brzina v_- neka je proporcionalna s x . Tada zakon očuvanja mase (1.1) daje:

$$\frac{dx}{dt} = -kx, \quad (1.2)$$

$$x(0) = x_0, \quad (1.3)$$

gdje je k pozitivna konstanta (u nekim slučajevima naziva se i konstanta radioaktivnog raspada), a $x_0 > 0$ početni uvjet. Јednadžba (1.2) se naziva i јednadžba radioaktivnog raspada, a govori da je brzina radioaktivnog raspada elementa proporcionalna trenutnoj količini tog elementa. Dakle, $x(t)$ predstavlja količinu elementa u trenutku t .

Riješimo gornju Cauchyјevu (početnu) zadaću metodom separacije varijabli (vidi [4]). Јednadžbu (1.2) zapišimo kao:

$$\frac{dx}{x} = -kdt,$$

odakle integriranjem dobijemo:

$$\ln x = -kt + C,$$

jer računamo da je $x > 0$. Ovdje je C proizvoljan realan broj pa zbog bijekcije vrijedi $C = \ln C_0$, $C_0 > 0$. Sada se prethodna jednažba može zapisati kao:

$$\ln\left(\frac{x}{C_0}\right) = -kt \quad \Rightarrow \quad \frac{x}{C_0} = e^{-kt}.$$

Uvrštavanjem početnog uvjeta iz (1.3), dobivamo

$$x(t) = x_0 e^{-kt}. \quad (1.4)$$

Odredimo sada vrijeme poluraspada tvari, točnije, vrijeme $t_{1/2}$ takvo da $x(t_{1/2}) = \frac{x_0}{2}$ (tvar se smanji za pola). Iz (1.4) slijedi

$$\frac{x_0}{2} = x_0 e^{-kt_{1/2}},$$

pa je vrijeme poluraspada dano sa

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}. \quad (1.5)$$

Poglavlje 2

Zakon djelovanja mase

U ovom poglavlju bavimo se drugim zakonom, prateći [5], koji će nam, zajedno sa zakonom očuvanja mase, poslužiti prilikom izvođenja jednadžba brzine za tvari koje sudjeluju u kemijskoj reakciji.

Neka je dana jednadžba kemijske reakcije:

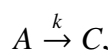


s reaktantima A i B , i produktima C i D . Dalje, a, b, c, d su stehiometrijski koeficijenti uravnotežene reakcije, a k_+ i k_- pozitivne konstante povezane s brzinom reakcije, koje se nazivaju *konstantama brzine*. *Brzina reakcije* je definirana kao brzina promjene koncentracije reaktanta ili produkta s obzirom na promjenu u vremenu. Dakle, dana je derivacijama.

U gornjoj reakciji, simbol \rightleftharpoons ukazuje na reverzibilnu reakciju, dok bi simbol \rightarrow predstavljao reakciju u jednom smjeru.

Zakon djelovanja mase kaže da je brzina reakcije proporcionalna umnošku koncentracija molekula koje sudjeluju u reakciji, odnosno, reaktanata (vidi [5, str. 12]). Ovo je zasnovano na vjerojatnosti susreta dviju molekula koja je proporcionalna produktu koncentracija. Koncentracija (množinska ili molarna koncentracija) označava množinu tvari u volumenu, gdje je množina tvari dana kao omjer broja molekula i Avogadrove konstante $N_A = 6,02214076 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ (vidi [2, str. 387-389]). Mjerna jedinica za koncentraciju je najčešće $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($= \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), iako je SI jedinica $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$ (vidi [2, str. 389]). Tada brzina reakcije ima jedinicu mol/L/s .

Sljedeći korak je primijeniti zakon djelovanja mase na jednadžbu kemijske reakcije (2.1). Promotrimo najprije nekoliko jednostavnijih primjera. Za reakciju



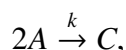
brzina reakcije je dana kao

$$v = \frac{d[C]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt},$$

gdje je [] oznaka za koncentraciju. Ovdje negativni predznak dolazi zbog smanjenja koncentracije reaktanta A . Ako se brzina reakcije izrazi preko nastajanja produkta C , njena vrijednost je pozitivna, jer se koncentracija produkta C povećava. Iz zakona djelovanja mase slijedi

$$v = k[A].$$

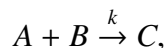
Promotrimo sada sljedeću reakciju:



koja se može zapisati i kao $A + A \xrightarrow{k} C$. Zakon djelovanja mase kaže da je brzina reakcije v dana kao

$$v = k[A][A] = k[A]^2.$$

Navedimo još jedan jednostavni primjer:



gdje su A i B reaktanti, C je produkt, a k je, kao i ranije, konstanta brzine. Primijenimo li ponovno zakon djelovanja mase, dobijemo brzinu reakcije:

$$v = k[A][B].$$

Vratimo se sada na jednadžbu kemijske reakcije (2.1). Koristeći gornje primjere, primijenimo li zakon djelovanja mase na (2.1), dobivamo brzinu polazne reakcije v_+ i brzinu povratne reakcije v_- :

$$v_+ = k_+[A]^a[B]^b, \quad v_- = k_-[C]^c[D]^d.$$

EkspONENTE a, b, c i d zovemo *redovima* s obzirom na određenu tvar (npr. reakcija je reda a po tvari A). Redovi su najčešće pozitivni cijeli brojevi, ali mogu biti i negativne cijeli brojevi, nula ili razlomci. *Red reakcije* se definira kao zbroj svih redova. Budući da se eksponenti a, b, c i d mogu se razlikovati od stehiometrijskih koeficijenata uravnotežene reakcije, određuju se eksperimentalno.

Koristeći zakon očuvanja mase, dobivamo jednadžbu brzine

$$\frac{d[C]}{dt} = v_+ - v_- = k_+[A]^a[B]^b - k_-[C]^c[D]^d, \quad (2.2)$$

a budući da se u ekvilibriju koncentracija ne mijenja u vremenu, vrijedi $\frac{d[C]}{dt} = 0$ pa imamo

$$k_+[A]^a[B]^b = k_-[C]^c[D]^d.$$

Iz gornjeg izraza dobijemo *konstantu ravnoteže kemijske reakcije*, definiranu kao

$$K_{eq} = \frac{k_+}{k_-} = \frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b}. \quad (2.3)$$

Na isti način možemo izvesti jednadžbe brzine za druge tvari:

$$\begin{aligned} \frac{d[A]}{dt} &= -k_+[A]^a[B]^b + k_-[C]^c[D]^d, \\ \frac{d[B]}{dt} &= -k_+[A]^a[B]^b + k_-[C]^c[D]^d, \\ \frac{d[D]}{dt} &= k_+[A]^a[B]^b - k_-[C]^c[D]^d. \end{aligned}$$

Napomenuto još sljedeće: budući da vrijedi

$$\begin{aligned} \frac{d[A]}{dt} + \frac{d[C]}{dt} &= 0, & \frac{d[A]}{dt} + \frac{d[D]}{dt} &= 0, \\ \frac{d[B]}{dt} + \frac{d[C]}{dt} &= 0, & \frac{d[B]}{dt} + \frac{d[D]}{dt} &= 0, \end{aligned}$$

veliĉine $[A] + [C]$, $[A] + [D]$, $[B] + [C]$, $[B] + [D]$ su oĉuvane.

Poglavlje 3

Osnovne enzimске reakcije

Prateći analizu iz [5] i [11], promatramo dvije enzimске reakcije, ovisno o broju aktivnih mjesta enzima. Detaljnije analiziramo Michaelis-Mentenovu jednadžbu, koju su prvi predložili Michaelis i Menten 1913. godine.

3.1 Michaelis-Mentenova kinetika

Promatramo sljedeću jednadžbu kemijske reakcije:



Gornjim izrazom je prikazana enzimska reakcija pretvaranja supstrata S preko enzimskog katalizatora E u produkt P . Točnije, supstrat S se veže za enzim E i time formira kompleks enzim-supstrat C . Zatim se kompleks enzim-supstrat pretvara u kompleks enzim-produkt, nakon čega se produkt P oslobađa. Dakle, jedna molekula S zajedno s jednom molekulom E na kraju proizvodi jednu molekulu P i ponovo jednu molekulu E . Ovdje su k_1, k_{-1} i k_2 konstante brzine, dakle pozitivne konstante. Ovo je tipična situacija u kojoj enzim pomaže nutrijentu S da prijeđe staničnu membranu te se otpusti unutar same stanice. Naime, kad je nutrijent topljiv u vodi, a membrana je hidrofobna, nutrijent ne može samostalno prijeći membranu. U tome mu onda pomogne enzim.

Uvedimo sljedeće oznake za koncentracije:

$$s = [S], \quad e = [E], \quad c = [C], \quad p = [P]. \quad (3.2)$$

Sada, primjenom zakona očuvanja mase i zakona djelovanja mase, iz (3.1) dolazimo do sustava običnih diferencijalnih jednadžbi:

$$\frac{ds}{dt} = -k_1es + k_{-1}c, \quad (3.3)$$

$$\frac{de}{dt} = -k_1es + k_{-1}c + k_2c, \quad (3.4)$$

$$\frac{dc}{dt} = k_1es - k_{-1}c - k_2c, \quad (3.5)$$

$$\frac{dp}{dt} = k_2c, \quad (3.6)$$

te uvodimo i početne uvjete:

$$s(0) = s_0, \quad e(0) = e_0, \quad c(0) = 0, \quad p(0) = 0. \quad (3.7)$$

Rješenja gornjeg sustava s pripadnim početnim uvjetima su (nenegativne) koncentracije, čime dobijemo i brzine reakcija, dane kao funkcije u vremenu.

Primjetimo da iz zadnje jednačbe, ukoliko je određen $c(t)$, lako odredimo $p(t)$:

$$p(t) = k_2 \int_0^t c(u)du, \quad (3.8)$$

pa ćemo uzeti u obzir samo prve tri jednačbe. No, promotrimo li drugu i treću jednačbu iz gornjeg sustava, dakle, jednačbu za koncentraciju slobodnog (e), odnosno kombiniranog (c) enzima, vidimo da vrijedi:

$$\frac{de}{dt} + \frac{dc}{dt} = 0, \quad (3.9)$$

te uzimajući u obzir i početni uvjet, slijedi:

$$e(t) + c(t) = e_0. \quad (3.10)$$

Time smo dobili zakon očuvanja za enzime, koji kaže da je ukupna koncentracija katalizatora E , koji samo olakšava reakciju, konstantna.

Dakle, početni sustav običnih diferencijalnih jednačbi se sveo na dvije jednačbe. Uvrstivši $e(t) = e_0 - c(t)$ u jednačbe za s i c , dobivamo:

$$\begin{aligned} \frac{ds}{dt} &= -k_1e_0s + (k_1s + k_{-1})c, \\ \frac{dc}{dt} &= k_1e_0s - (k_1s + k_{-1} + k_2)c, \end{aligned} \quad (3.11)$$

s početnim uvjetima

$$s(0) = s_0, \quad c(0) = 0. \quad (3.12)$$

Pretpostavimo da je početna faza formiranja kompleksa C vrlo brza, nakon čega se nalazi u ravnotežnom stanju. Prisjetimo se, ekvilibrij je rješenje diferencijalne jednadžbe koje se ne mijenja s vremenom. Dakle, u ekvilibriju se koncentracija ne mijenja u vremenu pa je $\frac{dc}{dt} = 0$, tj.

$$k_1 e_0 s - (k_1 s + k_{-1} + k_2) c = 0. \quad (3.13)$$

Ova se pretpostavka naziva *aproksimacija kvazistacionarnog stanja*. Sada lako dobijemo c :

$$c(t) = \frac{e_0 s(t)}{s(t) + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} = \frac{e_0 s(t)}{s(t) + K_m}, \quad (3.14)$$

gdje se $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ naziva *Michaelis-Mentenova konstanta*. Ona je jedinstvena vrijednost za svaki enzim i ne ovisi o koncentraciji enzima, već o supstratu, uvjetima okoliša (pH, temperatura, ionska jakost).

Iz (3.10) dobivamo i

$$e(t) = \frac{e_0 K_m}{s(t) + K_m}, \quad (3.15)$$

a iz početog sustava dobivamo i jednadžbu koja opisuje brzinu reakcije i naziva se *Michaelis-Mentenova jednadžba*:

$$V = \frac{dp}{dt} = k_2 c = \frac{k_2 e_0 s}{s + K_m} = \frac{V_{max} s}{s + K_m}, \quad (3.16)$$

gdje se $V_{max} = k_2 e_0$ naziva *maksimalna brzina*. Iz (3.16) vidimo da je Michaelis-Mentenova konstanta K_m , koja predstavlja afinitet enzima za molekule supstrata, jednaka koncentraciji supstrata pri kojoj brzina reakcije iznosi polovinu maksimalne brzine reakcije, dakle $\frac{1}{2} V_{max}$. Kada je $s \ll K_m$, vrijedi

$$V \approx \frac{k_2 e_0 s}{K_m},$$

gdje je konstanta brzine $\frac{k_2}{K_m}$ mjera efikasnosti katalize, jer uzima u obzir i brzinu katalize s određenim supstratom (k_2) i mjeru interakcije enzima sa supstratom (K_m).

Usporedba nelinearnog i linearnog modela

Koristeći Michaelis-Mentenovu jednadžbu (3.16), odredimo sada parametre K_m i V_{max} . Navedimo najprije podatke koje pritom koristimo.

Primjer 3.1.1. Razgradnju glikogena (supstrat) u glukozu katalizira enzim glikogen fosforilaza. Koristimo podatke iz [5, str. 16]:

Glikogen (mg/mL)	4.82	2.48	1.98	1.50	1.20	1.00
V (mg/mL/min)	0.0714	0.0623	0.0608	0.0568	0.0512	0.0500

Koristeći MATLAB-ovu funkciju 'nlinfit', pronalazimo nelinearnu funkciju u obliku Michaelis-Mentenove jednadžbe (3.16) koja najbolje opisuje gornje podatke. Pritom dobivamo vrijednosti za K_m i V_{max} , kao i vektor reziduala, koristan u usporedbi ovog (nelinearnog) modela i linearnog modela kojeg opisujemo u nastavku. Korisno je ustanoviti i 95% pouzdani interval za svaku od traženih vrijednosti. Služeći se MATLAB-ovom funkcijom 'nlparci', ispisujemo tražene pouzdane intervale i za K_m i za V_{max} . Dobivene vrijednosti i pripadni 95% pouzdani intervale su:

$$K_m = 0.63315 \pm 0.15214 \text{ mg/mL}, \quad V_{max} = 0.079954 \pm (4.987 \cdot 10^{-3}) \text{ mg/mL/min.}$$

Prisjetimo se, ako su $L_n = l_n(X_1, \dots, X_n)$ i $D_n = d_n(X_1, \dots, X_n)$ statistike slučajnog uzorka X_1, \dots, X_n , za $[L_n, D_n]$ kažemo da je $(1 - \alpha) \cdot 100\%$ pouzdani interval za parametar τ ako vrijedi $\mathbb{P}(L_n \leq \tau \leq D_n) \geq 1 - \alpha$, $\alpha \in \langle 0, 1 \rangle$ (vidi [9, str. 87]).

Koristeći gornji primjer 3.1.1, vidimo da se parametri K_m i V_{max} mogu odrediti prilagođavanjem Michaelis-Mentenove jednadžbe (3.16) danim podacima. S obzirom da je Michaelis-Mentenova jednadžba nelinearna funkcija od s , možemo ju linearizirati, imajući na umu da je lakše prilagoditi pravac danim podacima, nego nelinearnu funkciju. Zapišimo (3.16) u recipročnom obliku:

$$\frac{1}{V} = \frac{s + K_m}{V_{max}s} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{s}, \quad (3.17)$$

gdje je sada $\frac{1}{V}$ linearna funkcija od $\frac{1}{s}$.

Graf ove linearne funkcije naziva se *Lineweaver-Burkov dijagram* ili *dvostruki recipročni dijagram* (vidi [5, str. 16]), i prikazan je na slici 3.1.

Lineweaver-Burkov dijagram služi za određivanje parametara K_m i V_{max} ; naime, $\frac{1}{V_{max}}$ jednak je odsječku na y-osi, odsječak na x-osi je jednak $-\frac{1}{K_m}$, dok je $\frac{K_m}{V_{max}}$ nagib pravca (vidi [5, str. 16]).

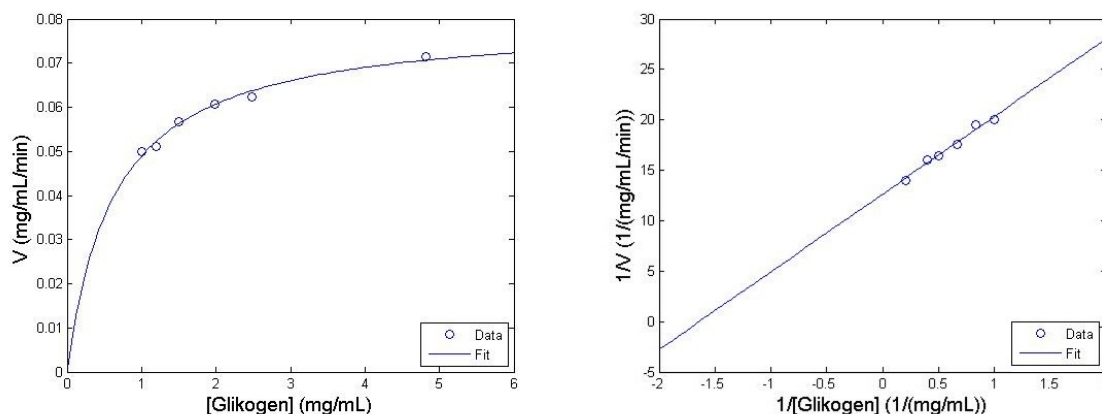
Primjenjujući gornje razmatranje na prethodni primjer, uz promjenu podataka iz s i V u $\frac{1}{s}$ i $\frac{1}{V}$, dobivamo sljedeće rezultate:

$$\frac{1}{V_{max}} = 12.63, \quad \frac{K_m}{V_{max}} = 7.705,$$

pa vrijedi

$$V_{max} = \frac{1}{12.63} = 0.079177, \quad K_m = \frac{7.705}{12.63} = 0.61006,$$

što je blizu rezultatima dobivenima u Primjeru 3.1.1.



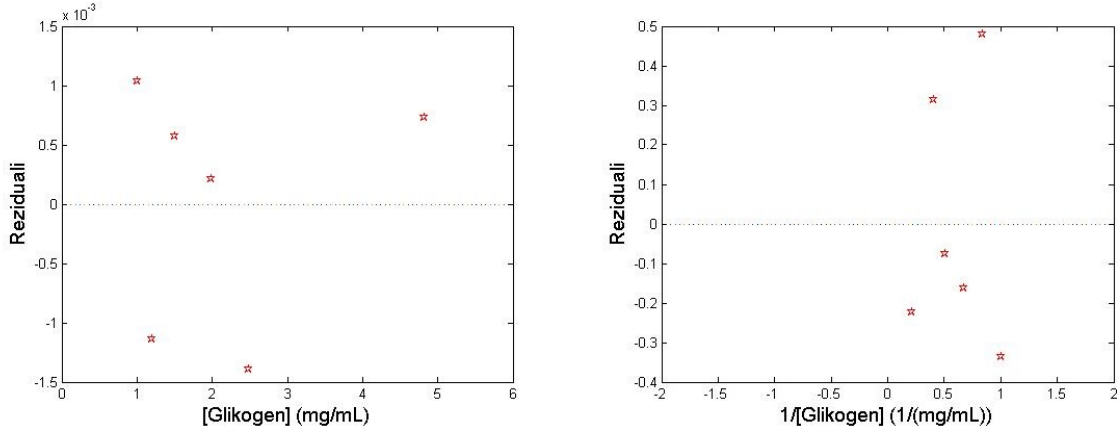
Slika 3.1: *Lijevo*: Michaelis-Menten jednadžba (3.16) prilagođena podacima glikogen fosforilaze. *Desno*: Lineweaver-Burkov dijagram.

Usporedimo nelinearni i linearni model. Promotrit ćemo grafove reziduala i izračunati koeficijente determinacije oba modela te provesti F-test da se vidi koji je model statistički bolji. Uvedimo zato standardne oznake kao u [9]. Neka nam je dano n podataka (x_i, y_i) , $i = 1, \dots, n$, te neka funkcija $f(x) = \hat{y}$ najbolje opisuje dane podatke. Neka su

$$\begin{aligned} \bar{y} &= \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i && \text{Aritmetička sredina vrijednosti } y_i \\ SSE &= \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 && \text{Suma kvadrata reziduala} \\ SST &= \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 && \text{Suma kvadrata odstupanja } y \text{ od } \bar{y} \\ r^2 &= 1 - \frac{SSE}{SST} && \text{Koeficijent determinacije} \end{aligned} \tag{3.18}$$

gdje je $\hat{y}_i = f(x_i)$. Oznake SSE i SST dolaze od engleskih naziva: $SSE =$ Sum of squares error, $SST =$ Sum of squares total.

Promotrimo najprije grafove reziduala oba modela, koji su dani na slici 3.2. Reziduali nelinearnog modela manji su po veličini od reziduala linearnog modela, a i vidimo da su u nelinearnom slučaju reziduali nasumično raštrkani oko nule u većoj mjeri nego u linearnom slučaju, tako da bismo mogli reći da je nelinearni model bolji.



Slika 3.2: *Lijevo*: Graf reziduala nelinearnog modela. *Desno*: Graf reziduala linearnog modela.

Kao mjera kvalitete modela, koristi se i koeficijent determinacije. Koeficijent determinacije, označen sa r^2 , govori o raspršenosti podataka, te opisuje jačinu funkcijske veze između x i y . Vrijednost koeficijenta determinacije kreće se u intervalu $0 \leq r^2 \leq 1$, a model bolje opisuje dane podatke što je r^2 bliže jedinici (vidi [6]).

Koristeći formulu, dobili smo koeficijente determinacije za nelinearni model (r_{nelin}^2) i linearni model (r_{lin}^2):

$$r_{nelin}^2 = 0.98333 \quad \text{i} \quad r_{lin}^2 = 0.97949.$$

Iako je koeficijent determinacije nelinearnog modela malo veći od koeficijenta determinacije linearnog modela, možemo reći da su oba modela dobra.

Provedimo još F-test da se vidi koji je model statistički bolji. F-test je statistički test u kojem testna statistika slijedi F-distribuciju i može se koristiti za usporedbu statističkih modela.

Statistika F-testa ili F-statistika je vrijednost koja se uspoređuje s kritičnom vrijednošću kako bi se provjerilo treba li nultu hipotezu odbaciti ili ne. Izračunava se pomoću jedne od dviju formula, ovisno o broju parametara u danim modelima (vidi [1]). Ako oba modela imaju isti broj parametara, koristimo formulu

$$F = \frac{SSE_1}{SSE_2}, \quad (3.19)$$

gdje SSE_1 i SSE_2 označavaju sumu kvadrata reziduala za prvi (nelinearni), odnosno drugi (linearni) model. Ukoliko modeli imaju različit broj parametara, formula glasi

$$F = \frac{\frac{SSE_1 - SSE_2}{df_1 - df_2}}{\frac{SSE_2}{df_2}}, \quad (3.20)$$

gdje su df_1 i df_2 stupnjevi slobode svakog modela. Stupanj slobode se računa kao

$$(\text{broj podatkovnih točaka}) - (\text{broj parametara koje treba procijeniti}).$$

F-statistika nam koristi za dobivanje p-vrijednosti, koju ćemo izračunati pomoću MATLAB-ove funkcije 'fcdif'.

S obzirom da naši modeli imaju jednak broj parametara, koristimo (3.19) i dobivamo vrijednost F-statistike. Isto tako, stupnjevi slobode oba modela su $6 - 2 = 4$, jer imamo 6 podatkovnih točaka i procjenjujemo 2 parametra u oba modela. Pomoću tih podataka dobivamo p-vrijednost:

$$p = 0.99999999969913.$$

Recimo da želimo utvrditi je li na nivou značajnosti od 5% ($\alpha = 0.05$) prvi model bolji od drugog. Ukoliko je p-vrijednost veća od α , tada je prvi model statistički bolji od drugog.

Budući da je dobivena p-vrijednost veća od $\alpha = 0.05$, zaključujemo da nultu hipotezu (prvi model je bolji) ne odbacujemo, dakle, nelinearni model je statistički bolji od linearnog modela.

Bezdimenzionalizacija

Vratimo se na (3.14) i uvrstimo ju u prvu od jednažbi iz (3.11), čime dobivamo:

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{k_2 e_0 s}{s + K_m}. \quad (3.21)$$

Budući da se smatra da je enzim prisutan u malim količinama u odnosu na supstrat, pretpostavka je da se tijekom početne prijelazne faze troši zanemariva količina supstrata, dakle koncentracija supstrata se tijekom te faze ne mijenja. Stoga se (3.21), jednažba koja vrijedi nakon početne prijelazne faze, može riješiti s početnim uvjetom $s = s_0$. Ova pretpostavka naziva se *pretpostavka kvazistacionarnog stanja* ili skraćeno QSSA (iz eng. *quasi-steady-state assumption*). QSSA se bavi kinetikom koja je opisana sustavima običnih diferencijalnih jednažbi u kojima se nakon početnog brzog prijelaza, jedna ili više zavisnih varijabli smatraju stabilnima u odnosu na trenutne vrijednosti drugih zavisnih varijabli (vidi [13])

Riješimo (3.21) metodom separacije varijabli (vidi [4]). Zapišimo (3.21) u obliku:

$$\frac{s + K_m}{s} ds = -k_2 e_0 dt,$$

odakle integriranjem dobivamo

$$s + K_m \ln s = -k_2 e_0 t + C,$$

za konstantu integracije C . Uvrštavanjem početnog uvjeta $s(0) = s_0$ u gornji izraz, dobivamo

$$C = s_0 + K_m \ln s_0.$$

Rješenje (3.21) je dano u implicitnom obliku:

$$s(t) + K_m \ln s(t) = s_0 + K_m \ln s_0 - k_2 e_0 t. \quad (3.22)$$

Ako gornji rezultat uvrstimo u (3.14), dobivamo rješenje koje ne zadovoljava početni uvjet $c(0) = 0$.

Iako je to razumna aproksimacija za većinu vremena, zapravo postoje dvije vremenske skale u ovom sustavu: prva je početna prijelazna vremenska skala blizu $t = 0$, dok je druga vremenska skala duža. Tada se supstrat značajno mijenja i enzimski kompleks C se može aproksimirati izrazom (3.14) sa $s(t)$ iz (3.22).

Ovo razmišljanje postavlja nekoliko važnih pitanja, no prvi korak je bezdimenzionirati sustav, kako bismo vidjeli što smo zapravo napravili pretpostavivši kvazistacionarnost. To

je moguće učiniti na nekoliko načina. No, budući da gornje pretpostavke ovise o tome koliko je kratko početno prijelazno razdoblje, bezdimenzionalna veličina koju koristimo je vrijeme.

Demonstrirajmo to na sustavu (3.3)-(3.5), točnije na reduciranom sustavu (3.11). Budući da s_0 označava početnu koncentraciju od S , s_0 i s imaju istu mjernu jedinicu, pa je razlomak $u = \frac{s}{s_0}$ bezdimenzionalan. Podijelimo prvu od jednadžbi iz (3.11) sa s_0 , čime dobivamo sljedeće:

$$\begin{aligned}\frac{du}{dt} &= -k_1 e_0 u + \frac{k_1 s + k_{-1}}{s_0} c \\ &= -k_1 e_0 u + k_1 c u + \frac{k_{-1}}{s_0} c.\end{aligned}$$

Kako bismo bezdimenzionirali jednadžbu, podijelimo ju sa $k_1 e_0$:

$$\frac{du}{d(k_1 e_0 t)} = -u + \frac{c}{e_0} u + \frac{k_{-1}}{k_1 s_0} \frac{c}{e_0}. \quad (3.23)$$

Uvedimo sada bezdimenzionalne veličine, čije će definicije biti jasnije u sljedećem koraku:

$$\begin{aligned}\tau &= k_1 e_0 t, & u(\tau) &= \frac{s(t)}{s_0}, & v(\tau) &= \frac{c(t)}{e_0}, \\ \lambda &= \frac{k_2}{k_1 s_0}, & K &= \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 s_0} = \frac{K_m}{s_0}, & \varepsilon &= \frac{e_0}{s_0},\end{aligned} \quad (3.24)$$

što je razumna bezdimenzionalizacija za $\varepsilon \ll 1$. Kao što je napomenuto ranije, koncentracija enzima je najčešće puno manja od koncentracije supstrata, pa je ε obično u rasponu od 10^{-2} do 10^{-7} (vidi [3]).

Posvetimo se sada drugoj od jednadžbi iz (3.11). Podijelimo ju prvo sa s_0 :

$$\frac{dc}{d(s_0 t)} = k_1 e_0 u - k_1 c u - \frac{k_{-1} + k_2}{s_0} c,$$

a zatim sa $k_1 e_0$:

$$\frac{dc}{d(s_0 k_1 e_0 t)} = u - \frac{c}{e_0} u - \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 s_0} \frac{c}{e_0},$$

što se može zapisati i kao

$$\frac{e_0}{s_0} \frac{dv}{d(k_1 e_0 t)} = u - \frac{c}{e_0} u - \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 s_0} \frac{c}{e_0}. \quad (3.25)$$

Uvođenjem bezdimenzionalnih veličina iz (3.24), jednadžbe (3.23) i (3.25), zajedno s početnim uvjetima danim u (3.12), mogu se zapisati kao:

$$\begin{aligned} \frac{du}{d\tau} &= -u + (u + K - \lambda)v, & \varepsilon \frac{dv}{d\tau} &= u - (u + K)v, \\ u(0) &= 1, & v(0) &= 0, \end{aligned} \quad (3.26)$$

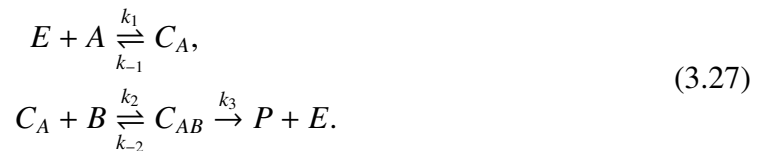
čime smo dobili bezdimenzionalni sustav za aproksimaciju kvazistacionarnog stanja, jer je pretpostavka $\varepsilon = 0$ u gornjoj jednadžbi ekvivalentna pretpostavci kvazistacionarnosti.

Primjetimo da je $K - \lambda > 0$ iz (3.24). Dalje, kad dobijemo rješenja $u(\tau)$ i $v(\tau)$, iz (3.10) i (3.8) dobivamo i i p .

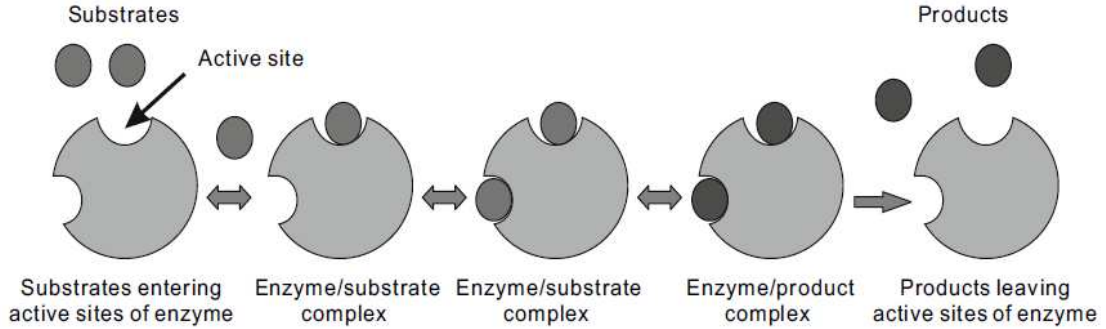
Iz početne reakcije (3.1), gdje se supstrat S pretvara u produkt P , imamo konačno stacionarno stanje $u = 0$ i $v = 0$; drugim riječima, koncentracije i supstrata S i supstrat-enzimskog kompleksa C su jednake nuli. S obzirom da nas ovdje zanima vremenski razvoj reakcije, potrebna su nam rješenja nelinearnog sustava (3.26). Pogledajmo zato kako $u(\tau)$ i $v(\tau)$ izgledaju kvalitativno. Blizu $\tau = 0$, iz (3.26) vidimo da je $\frac{du}{d\tau} < 0$, tako da u pada od $u = 1$. Isto tako, vrijedi da je $\frac{dv}{d\tau} > 0$; dakle v raste od $v = 0$ do $v = \frac{u}{u+K}$, gdje je $\frac{dv}{d\tau} = 0$. Iz (3.26) slijedi da u toj točki vrijedi $\frac{du}{d\tau} < 0$, dakle u još uvijek pada. Dakle, nakon što je v dosegnuo maksimum $v = \frac{u}{u+K}$, počne padati do nule kao i u , monotono za sve t . Ako gledamo koncentracija enzima E , početna koncentracija je e_0 , pa se $e(t)$ prvo smanjuje od e_0 , a zatim ponovno raste do e_0 za $t \rightarrow \infty$, kako se i dobiva na kraju reakcije (3.1).

3.2 Bisupstratni enzimi

Enzimski reakcija u kojoj se dva supstrata redom vežu na enzim shematski je opisana na slici 3.3 te se može prikazati jednadžbama kemijske reakcije:



Dakle, supstrat A se veže za enzim E formirajući kompleks enzim-supstrat C_A . Zatim se za taj kompleks veže drugi supstrat B , formirajući time kompleks C_{AB} . Taj enzim-supstrat kompleks se pretvara u kompleks enzim-produkt, nakon čega dolazi do oslobađanja produkta P , kako je i prikazano na slici 3.3.



Slika 3.3: Shematski prikaz enzimske reakcije s dva aktivna mjesta, preuzeto iz [5, str. 18].

Uvedimo sljedeće oznake za koncentracije:

$$\begin{aligned} a &= [A], & b &= [B], & e &= [E], \\ c_A &= [C_A], & c_{AB} &= [C_{AB}], & p &= [P]. \end{aligned} \quad (3.28)$$

Primjenom zakona očuvanja mase i zakona djelovanja mase na (3.27), možemo napisati jednačbe brzine za 6 gornjih koncentracija. Međutim, budući da je ukupna koncentracija enzima konstantna, tj.

$$\frac{de}{dt} + \frac{dc_A}{dt} + \frac{dc_{AB}}{dt} = 0, \quad (3.29)$$

zapišimo pet jednačbi za pet koncentracija a, b, c_A, c_{AB} i p . Dobivamo:

$$\frac{da}{dt} = -k_1ea + k_{-1}c_A, \quad (3.30)$$

$$\frac{db}{dt} = -k_2c_Ab + k_{-2}c_{AB}, \quad (3.31)$$

$$\frac{dc_A}{dt} = k_1ea - k_{-1}c_A - k_2c_Ab + k_{-2}c_{AB}, \quad (3.32)$$

$$\frac{dc_{AB}}{dt} = k_2c_Ab - k_{-2}c_{AB} - k_3c_{AB}, \quad (3.33)$$

$$\frac{dp}{dt} = k_3c_{AB}, \quad (3.34)$$

s danim početnim uvjetima

$$\begin{aligned} a(0) &= a_0, & b(0) &= b_0, & e(0) &= e_0, \\ c_A(0) &= 0, & c_{AB}(0) &= 0, & p(0) &= 0. \end{aligned} \quad (3.35)$$

Koristeći aproksimaciju kvazistacionarnog stanja

$$\frac{dc_A}{dt} = \frac{dc_{AB}}{dt} = 0,$$

i zakon očuvanja za enzime (3.29), dobivamo sljedeći sustav:

$$\begin{aligned} k_1ea - k_{-1}c_A - k_2c_Ab + k_{-2}c_{AB} &= 0, \\ k_2c_Ab - k_{-2}c_{AB} - k_3c_{AB} &= 0, \\ e + c_A + c_{AB} &= e_0. \end{aligned}$$

Izrazimo c_{AB} iz gornjeg sustava. Iz zadnje jednadžbe dobivamo:

$$c_{AB} = e_0 - e - c_A, \quad (3.36)$$

dakle, moramo izraziti e i c_A iz preostalih dviju jednadžbi. Iz prve jednadžbe izrazimo e :

$$e = \frac{k_{-1} + k_2b}{k_1a}c_A - \frac{k_{-2}}{k_1a}c_{AB},$$

i uvrstimo u (3.36), čime dobivamo:

$$c_{AB} = \frac{k_1ae_0}{k_1a - k_{-2}} - \frac{k_1a + k_{-1} + k_2b}{k_1a - k_{-2}}c_A. \quad (3.37)$$

Preostaje nam iz druge jednadžbe izraziti c_A . Dakle, izraz

$$c_A = \frac{k_{-2} + k_3}{k_2b}c_{AB},$$

uvrstimo u (3.37):

$$c_{AB} = \frac{k_1ae_0}{k_1a - k_{-2}} - \frac{k_1k_{-2}a + k_{-2}k_{-1} + k_2k_{-2}b + k_1k_3a + k_3k_{-1} + k_2k_3b}{k_1k_2ab - k_2k_{-2}b}c_{AB},$$

odakle dobivamo rješenje sustava:

$$c_{AB} = \frac{k_1k_2abe_0}{k_1k_2ab + k_1k_{-2}a + k_{-2}k_{-1} + k_1k_3a + k_3k_{-1} + k_2k_3b}, \quad (3.38)$$

i brzinu

$$\begin{aligned} V &= \frac{dp}{dt} = k_3c_{AB} \\ &= \frac{k_1k_2k_3abe_0}{k_1k_2ab + (k_{-2} + k_3)k_1a + (k_{-2} + k_3)k_{-1} + k_2k_3b} \\ &= \frac{K_1V_{max}ab}{K_1ab + K_1K_m a + K_m + K_d b}, \end{aligned} \quad (3.39)$$

gdje su

$$K_m = \frac{k_{-2} + k_3}{k_2}, \quad V_{max} = k_3e_0, \quad K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}}, \quad K_d = \frac{k_3}{k_{-1}}.$$

Poglavlje 4

Singularne perturbacije

U ovom poglavlju provodimo analizu singularnih perturbacija na (3.26), prateći postupak iz [10, str. 138-150] i [11, str. 181-188], čime dobivamo vrlo točno aproksimativno, ili radije asimptotsko, rješenje za $0 < \varepsilon \ll 1$. Tehnika se može koristiti na bilo kojem od mogućih bezdimenzionalnih sustava jednadžbi.

Budući da mali parametar $0 < \varepsilon \ll 1$ množi derivaciju u (3.26), ovo je problem singularne perturbacije, što se prepoznaje i u tome što se red sustava diferencijalnih jednadžbi reducira kada je $\varepsilon = 0$. Tako reducirani sustav ne može općenito zadovoljiti sve početne uvjete, što ćemo vidjeti i u nastavku. Navedimo prvo sljedeću definiciju (vidi [3, str. 19]).

Definicija 4.0.1. *Neka su $f, g : \mathbb{R} \setminus \{0\} \rightarrow \mathbb{R}$ realne funkcije. Kažemo da je $f = O(g)$ kada $x \rightarrow 0$ ako postoje konstante $M, r > 0$ takve da*

$$|f(x)| \leq M|g(x)|, \quad 0 < |x| < r.$$

4.1 Vanjsko (nesingularno) rješenje, $\tau = O(1)$

Promotrimo sustav (3.26). Da bismo dobili aproksimativno rješenje metodom perturbacija, koristimo Taylorov red; naime, ako pretpostavimo da rješenje ovisi analitički o malom parametru ε , gdje je $0 < \varepsilon \ll 1$, tada je rješenje sustava (3.26) moguće prikazati u obliku Taylorovog reda u ε (vidi [10, str. 139]):

$$\begin{aligned} u(\tau; \varepsilon) &= u_0(\tau) + \varepsilon u_1(\tau) + \varepsilon^2 u_2(\tau) + \dots, & \varepsilon \rightarrow 0, \\ v(\tau; \varepsilon) &= v_0(\tau) + \varepsilon v_1(\tau) + \varepsilon^2 v_2(\tau) + \dots, & \varepsilon \rightarrow 0, \end{aligned} \tag{4.1}$$

što je standardni oblik u kojem se traži rješenje ovog problema. Uvrstimo li sada gornje izraze za u i v u (3.26) i izjednačimo potencije od ε , dobijemo niz diferencijalnih jednadžbi

za $u_n(\tau)$ i $v_n(\tau)$. Drugim riječima, pretpostavljamo da su $u(\tau, \varepsilon)$ i $v(\tau, \varepsilon)$ analitičke funkcije od ε . $O(1)$ jednadžbe, jednadžbe koje dobijemo izjednačavajući izraze uz ε^0 , odnosno postavljanjem $\varepsilon = 0$, su:

$$\begin{aligned} \frac{du_0}{d\tau} &= -u_0 + (u_0 + K - \lambda)v_0, & 0 &= u_0 - (u_0 + K)v_0, \\ u_0(0) &= 1, & v_0(0) &= 0, \end{aligned} \quad (4.2)$$

gdje su $u_0(\tau) = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} u(\tau; \varepsilon)$ i $v_0(\tau) = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} v(\tau; \varepsilon)$. Ovdje smo pretpostavili da je $\varepsilon \frac{dv}{d\tau}$ zapravo $O(\varepsilon)$ kako bismo dobili drugu jednadžbu (dakle, $O(1)$ dio je jednak nuli).

Riješimo gornji sustav. Iz druge jednadžbe dobivamo izraz za v_0 :

$$v_0(\tau) = \frac{u_0(\tau)}{u_0(\tau) + K},$$

što uvrstimo u prvu od jednadžbi iz (4.2), iz čega slijedi

$$\frac{du_0}{d\tau} = -u_0 + (u_0 + K - \lambda) \frac{u_0}{u_0 + K} = -\lambda \frac{u_0}{u_0 + K},$$

što rješavamo metodom separacije varijabli (vidi [4]). Gornju jednadžbu zapišemo u obliku:

$$\frac{u_0 + K}{u_0} du_0 = -\lambda d\tau,$$

odakle integriranjem dobivamo

$$u_0 + K \ln u_0 = -\lambda\tau + A,$$

gdje je A konstanta integracije. Uvrstimo li početni uvjet $u_0(0) = 1$, vrijedi da je $A = 1$. Zapišimo rješenje sustava (4.2):

$$u_0(\tau) + K \ln u_0(\tau) = 1 - \lambda\tau, \quad v_0(\tau) = \frac{u_0(\tau)}{u_0(\tau) + K}, \quad (4.3)$$

što je isto kao rješenje (3.14) i (3.22), koje ne zadovoljava početne uvjete sustava. Primijetimo da ni ovdje početni uvjet $v_0(0) = 0$ ne može biti zadovoljen; naime:

$$v_0(0) = \frac{u_0(0)}{u_0(0) + K} = \frac{1}{1 + K} \neq 0.$$

Dakle, ovo rješenje nije uniformno važeće aproksimativno rješenje za sve $\tau \geq 0$, jer je $v_0(0) \neq 0$. To nije iznenađujuće jer (4.2) uključuje samo jednu derivaciju pa takav sustav

jednadžbi ima samo jednu konstantu integracije, onu iz u -jednadžbe. Stoga ne možemo zadovoljiti početne uvjete i na u_0 i na v_0 .

Budući da rješenje (4.3), posebno $v_0(\tau)$, ne zadovoljava početne uvjete, barem jedno od rješenja $u(\tau; \varepsilon)$ i $v(\tau; \varepsilon)$ nije analitička funkcija od ε za $\varepsilon \rightarrow 0$. Kako početni uvjet na v ne može biti zadovoljen jer smo zanemarili $\varepsilon \frac{dv}{d\tau}$, moramo zadržati ovaj izraz, barem u blizini $\tau = 0$, čime ćemo se baviti u sljedećem odjeljku.

Rješenje (4.3) je rješenje regularne perturbacije, dobiveno postavljanjem malog parametra na nulu. To rješenje se naziva *vanjsko* ili *nesingularno rješenje*, važeće za sve τ koji nisu u neposrednoj blizini $\tau = 0$, točnije za $\tau = O(1)$.

4.2 Unutarnje (singularno) rješenje, $\tau = O(\varepsilon)$

S obzirom da želimo zadržati izraz $\varepsilon \frac{dv}{d\tau}$ u blizini $\tau = 0$, uvodimo prikladniju vremensku skalu blizu $\tau = 0$. Imajući na umu da su sada i τ i ε maleni (ali usporedive veličine), definiramo novu $O(1)$ vremensku varijablu $\sigma = \frac{\tau}{\varepsilon}$. Sada je

$$\varepsilon \frac{dv}{d\tau} = \frac{dv}{d\sigma}.$$

Učinak transformacije $\sigma = \frac{\tau}{\varepsilon}$ je povećati okolinu od $\tau = 0$, jer za fiksni $0 < \tau \ll 1$ vrijedi $\sigma \gg 1$ kako $\varepsilon \rightarrow 0$. Dakle, mala okolina od $\tau = 0$ odgovara vrlo velikoj domeni u σ . Služeći se ovime, analizirat ćemo (3.26) u blizini $\tau = 0$. Koristimo sljedeće transformacije:

$$\sigma = \frac{\tau}{\varepsilon}, \quad u(\tau; \varepsilon) = U(\sigma; \varepsilon), \quad v(\tau; \varepsilon) = V(\sigma; \varepsilon), \quad (4.4)$$

te ih uvrštavamo u (3.26). Budući da vrijedi $\varepsilon \frac{du}{d\tau} = \frac{dU}{d\sigma}$ i $\varepsilon \frac{dv}{d\tau} = \frac{dV}{d\sigma}$, dobivamo sljedeći sustav:

$$\begin{aligned} \frac{dU}{d\sigma} &= -\varepsilon U + \varepsilon(U + K - \lambda)V, & \frac{dV}{d\sigma} &= U - (U + K)V, \\ U(0) &= 1, & V(0) &= 0. \end{aligned} \quad (4.5)$$

Rješenje gornjeg sustava ponovno tražimo u obliku reda potencija:

$$\begin{aligned} U(\sigma; \varepsilon) &= U_0(\sigma) + \varepsilon U_1(\sigma) + \varepsilon^2 U_2(\sigma) + \dots, \\ V(\sigma; \varepsilon) &= V_0(\sigma) + \varepsilon V_1(\sigma) + \varepsilon^2 V_2(\sigma) + \dots, \end{aligned} \quad (4.6)$$

što uvrštavamo u (4.5) te postavljanjem $\varepsilon = 0$, dobivamo $O(1)$ jednadžbe:

$$\begin{aligned} \frac{dU_0}{d\sigma} &= 0, & \frac{dV_0}{d\sigma} &= U_0 - (U_0 + K)V_0, \\ U_0(0) &= 1, & V_0(0) &= 0. \end{aligned} \quad (4.7)$$

Primijetimo da smo ovim postupkom dobili sustav koji nije nižeg reda od izvornog sustava (4.5).

Riješimo sustav (4.7). Jedno rješenje je očito:

$$U_0(\sigma) = 1. \quad (4.8)$$

Uvrstimo gonje rješenje u jednadžbu za V_0 :

$$\frac{dV_0}{d\sigma} = 1 - (1 + K)V_0. \quad (4.9)$$

Riješimo gornju jednadžbu metodom separacije varijabli (vidi [4]). Zapišimo gornju jednadžbu u obliku:

$$\frac{dV_0}{1 - (1 + K)V_0} = d\sigma,$$

odakle integriranjem dobivamo:

$$\begin{aligned} -\frac{1}{1 + K} \ln |1 - (1 + K)V_0| &= \sigma + A, \\ \ln |1 - (1 + K)V_0| &= -(1 + K)\sigma + B, \\ 1 - (1 + K)V_0 &= Ce^{-(1+K)\sigma}, \end{aligned}$$

za $C > 0$. Dakle, rješenje V_0 je dano sljedećim izrazom:

$$V_0(\sigma) = \frac{1}{1 + K} - \frac{C}{1 + K} e^{-(1+K)\sigma},$$

Uvrstimo li početni uvjet $V_0(0) = 0$, dobivamo rješenje sustava (4.7):

$$U_0(\sigma) = 1, \quad V_0(\sigma) = \frac{1}{1 + K} \left(1 - e^{-(1+K)\sigma}\right). \quad (4.10)$$

Rješenje V_0 ne vrijedi ta sve $\tau \geq 0$. Naime, iz (4.6), i (4.7) tada bi slijedilo da je

$$\frac{dV}{d\sigma} = \varepsilon \frac{dv}{d\tau},$$

$O(1)$ za sve τ , što nije istina. Isto tako bi vrijedilo da je $u(\tau) = \frac{s(t)}{s_0} = 1$ za sve τ (jer su, kao što je napomenuto i kasnije, doprinosi $O(\varepsilon)$ članova za male ε zanemarivi). Drugim riječima, koncentracija supstrata ostala bi gotovo konstantna tijekom reakcije, što je u suprotnosti s pretpostavkom da se koncentracija supstrata značajno mijenja nakon početne prijelazne faze.

Rješenje (4.10) se naziva *unutarnje* ili *singularno rješenje* za u i v i vrijedi za $0 \leq \tau \ll 1$.

Ako sada pustimo $\varepsilon \rightarrow 0$, tada za fiksni $0 < \tau \ll 1$ vrijedi $\sigma \rightarrow \infty$. Dakle, ukoliko pustimo $\varepsilon \rightarrow 0$, očekujemo da će rješenje (4.3) za $\tau \rightarrow 0$ biti jednako rješenju (4.10) za $\sigma \rightarrow \infty$. Drugim riječima, singularno rješenje kad $\sigma \rightarrow \infty$ odgovara nesingularnom rješenju kad $\tau \rightarrow 0$, što je bit *usklađivanja* (tzv. matching, vidi [11, str. 183]) u teoriji singularnih perturbacija. Iz (4.3) i (4.10) vidimo da vrijedi:

$$\lim_{\tau \rightarrow 0} u_0(\tau) = 1 = \lim_{\sigma \rightarrow \infty} U_0(\sigma), \quad \lim_{\tau \rightarrow 0} v_0(\tau) = \frac{1}{1+K} = \lim_{\sigma \rightarrow \infty} V_0(\sigma).$$

Tanki $O(\varepsilon)$ sloj blizu $\tau = 0$ ponekad se naziva *granični sloj* i to je τ domena u kojoj dolazi do vrlo brzih promjena u rješenju.

4.3 Uniformna aproksimacija

Vratimo se sada vanjskom rješenju bezdimenzionalnog sustava (3.26). Ponovo ga tražimo u obliku Taylorovog reda (4.1). $O(1)$ jednadžbe su dane kao i ranije:

$$\frac{du_0}{d\tau} = -u_0 + (u_0 + K - \lambda)v_0, \quad 0 = u_0 - (u_0 + K)v_0. \quad (4.11)$$

Zapišimo $O(\varepsilon)$ jednadžbe. Uvrštavanjem (4.1) u (3.26), u -jednadžba glasi:

$$\sum_{n=0}^{\infty} \varepsilon^n \frac{du_n}{d\tau} = - \sum_{n=0}^{\infty} \varepsilon^n u_n + \left(\sum_{n=0}^{\infty} \varepsilon^n u_n + K - \lambda \right) \left(\sum_{n=0}^{\infty} \varepsilon^n v_n \right),$$

dok je v -jednadžba

$$\sum_{n=0}^{\infty} \varepsilon^{n+1} \frac{dv_n}{d\tau} = \sum_{n=0}^{\infty} \varepsilon^n u_n - \left(\sum_{n=0}^{\infty} \varepsilon^n u_n + K \right) \left(\sum_{n=0}^{\infty} \varepsilon^n v_n \right).$$

Zapišimo prvo $O(\varepsilon)$ jednadžbu za u . S lijeve strane očito ostaje izraz $\frac{du_1}{d\tau}$, budući da on stoji uz ε^1 . Raspišimo zato desnu stranu:

$$\begin{aligned} & - \left(u_0 + \varepsilon u_1 + O(\varepsilon^2) \right) + \left(u_0 + \varepsilon u_1 + O(\varepsilon^2) + K - \lambda \right) \left(v_0 + \varepsilon v_1 + O(\varepsilon^2) \right) \\ &= -u_0 - \varepsilon u_1 + u_0 v_0 + \varepsilon u_0 v_1 + \varepsilon u_1 v_0 + (K - \lambda) v_0 + \varepsilon (K - \lambda) v_1 + O(\varepsilon^2) \\ &= (-u_0 + u_0 v_0 + (K - \lambda) v_0) + \varepsilon (-u_1 + u_0 v_1 + u_1 v_0 + (K - \lambda) v_1) + O(\varepsilon^2), \end{aligned}$$

odakle dobivamo $O(\varepsilon)$ jednadžbu za u :

$$\frac{du_1}{d\tau} = u_1 (v_0 - 1) + (u_0 + K - \lambda) v_1.$$

Na isti način dobivamo $O(\varepsilon)$ jednadžbu za v . Lijeva strana je ponovo očita; ostaje izraz $\frac{dv_0}{d\tau}$. Desna strana glasi:

$$\begin{aligned} & \left(u_0 + \varepsilon u_1 + O(\varepsilon^2) \right) - \left(u_0 + \varepsilon u_1 + O(\varepsilon^2) + K \right) \left(v_0 + \varepsilon v_1 + O(\varepsilon^2) \right) \\ &= u_0 + \varepsilon u_1 - u_0 v_0 - \varepsilon u_0 v_1 - \varepsilon u_1 v_0 - K v_0 - \varepsilon K v_1 + O(\varepsilon^2) \\ &= (u_0 - u_0 v_0 - K v_0) + \varepsilon (u_1 - u_0 v_1 - u_1 v_0 - K v_1) + O(\varepsilon^2). \end{aligned}$$

Dakle, $O(\varepsilon)$ jednadžbe su

$$\begin{aligned} \frac{du_1}{d\tau} &= u_1 (v_0 - 1) + (u_0 + K - \lambda) v_1, \\ \frac{dv_0}{d\tau} &= u_1 (1 - v_0) - (u_0 + K) v_1. \end{aligned} \tag{4.12}$$

Jednadžbe (4.11) i (4.12) vrijede za $\tau > 0$. Rješenja uključuju neodređene konstante integracije koje se moraju odrediti usklađivanjem ovih rješenja kad $\tau \rightarrow 0$ sa singularnim rješenjima kad $\sigma \rightarrow \infty$.

Promotrimo sada jednadžbe za singularni dio rješenja, koje vrijede za $0 \leq \tau \ll 1$. Uvrstimo (4.6) u (4.5) i izjednačimo potencije od ε . Kao i ranije, $O(1)$ jednadžbe su:

$$\frac{dU_0}{d\sigma} = 0, \quad \frac{dV_0}{d\sigma} = U_0 - (U_0 + K) V_0. \quad (4.13)$$

dok su $O(\varepsilon)$ jednadžbe:

$$\begin{aligned} \frac{dU_1}{d\sigma} &= -U_0 + (U_0 + K - \lambda) V_0, \\ \frac{dV_1}{d\sigma} &= U_1 (1 - V_0) - (U_0 + K) V_1, \end{aligned} \quad (4.14)$$

gdje je $O(\varepsilon)$ jednadžba za U očita, dok je $O(\varepsilon)$ jednadžba za V dobivena istim postupkom kao i $O(\varepsilon)$ jednadžba za v . Istim postupkom bismo došli i do $O(\varepsilon^n)$ jednadžbi, za $n \geq 2$. Rješenja tih jednadžbi moraju zadovoljiti početne uvjete kad je $\sigma = 0$, točnije $\tau = 0$:

$$\begin{aligned} 1 = U(0; \varepsilon) &= \sum_{n=0}^{\infty} \varepsilon^n U_n(0) \quad \Rightarrow \quad U_0(0) = 1, \quad U_{n \geq 1}(0) = 0, \\ 0 = V(0; \varepsilon) &= \sum_{n=0}^{\infty} \varepsilon^n V_n(0) \quad \Rightarrow \quad V_{n \geq 0}(0) = 0. \end{aligned} \quad (4.15)$$

Time su singularna rješenja potpuno određena. Preostaje (potpuno) odrediti vanjska, dakle nesingularna, rješenja, što radimo usklađivanjem. Usklađivanje vanjskih i unutarnjih rješenja zahtijeva odabir neodređenih konstanti integracije u rješenjima jednadžbi (4.11) i (4.12), tako da za sve redove ε vrijedi

$$\lim_{\tau \rightarrow 0} u(\tau; \varepsilon) = \lim_{\sigma \rightarrow \infty} U(\sigma; \varepsilon), \quad \lim_{\tau \rightarrow 0} v(\tau; \varepsilon) = \lim_{\sigma \rightarrow \infty} V(\sigma; \varepsilon). \quad (4.16)$$

Iz (4.11), kao i ranije, dobivamo

$$u_0(\tau) + K \ln u_0(\tau) = A - \lambda \tau, \quad v_0(\tau) = \frac{u_0(\tau)}{u_0(\tau) + K},$$

gdje je A konstanta integracije koju zapravo određujemo usklađivanjem. Rješenje jednadžbi (4.13), s odgovarajućim početnim uvjetima, je dano ranije u (4.10). Dakle, da

dobijemo A , koristimo (4.16) na (4.10) i zadnjim jednadžbama:

$$\begin{aligned}\lim_{\sigma \rightarrow \infty} V_0(\sigma) &= \frac{1}{1+K} = \lim_{\tau \rightarrow 0} v_0(\tau) \\ \Rightarrow v_0(0) &= \frac{1}{1+K} = \frac{u_0(\tau)}{u_0(\tau) + K} \\ \Rightarrow u_0(0) &= 1 \\ \Rightarrow A &= 1.\end{aligned}$$

Time dobivamo uniformno važeće asimptotsko rješenje $O(1)$ jednadžbi za $0 < \varepsilon \ll 1$, izvedeno i ranije, i dano sa (4.3) za $\tau > 0$ i sa (4.10) za $0 \leq \tau \ll 1$.

Sada možemo nastaviti računati $U_1(\sigma)$ i $V_1(\sigma)$ iz (4.14) i $u_1(\tau)$ i $v_1(\tau)$ iz (4.12) i tako redom; rješenja sve dalje postaju sve kompliciranija. Na taj način dobivamo uniformno važeće asimptotsko rješenje sustava (3.26) za $0 < \varepsilon \ll 1$, za sve $\tau \geq 0$ ($t \geq 0$). Dakle, ako gledamo unutarnje rješenje V_0 u vremenskoj varijabli τ :

$$V_0(\tau) = \frac{U_0}{U_0 + K} \left(1 - e^{-(1+K)\frac{\tau}{\varepsilon}}\right), \quad 0 < \tau \ll 1,$$

kako τ postaje veći od reda ε , eksponencijalni dio nestaje pa ostaje samo

$$V_0(\tau) = \frac{U_0}{U_0 + K},$$

što je istog oblika kao i v_0 iz (4.3). Rješenje u_0 iz (4.3) je dobiveno koristeći početni uvjet $u_0(0) = 1$, a budući da se U_0 ne mijenja za mali $\tau = O(\varepsilon)$, dobili smo važeće rješenje za sve $\tau \geq 0$. Ukratko, za mali ε , uniformno važeće asimptotsko rješenje je

$$\begin{aligned}u(\tau; \varepsilon) &= u_0(\tau) + O(\varepsilon), \quad u_0(\tau) + K \ln u_0(\tau) = 1 - \lambda\tau, \quad 0 < \varepsilon \ll \tau; \\ &= U_0(\tau) + O(\varepsilon), \quad U_0(\tau) = 1, \quad 0 < \tau \ll 1; \\ v(\tau; \varepsilon) &= v_0(\tau) + O(\varepsilon), \quad v_0(\tau) = \frac{u_0(\tau)}{u_0(\tau) + K}, \quad 0 < \varepsilon \ll \tau; \\ &= V_0(\tau) + O(\varepsilon), \quad V_0(\tau) = \frac{1}{1+K} \left(1 - e^{-(1+K)\frac{\tau}{\varepsilon}}\right), \quad 0 < \tau \ll 1.\end{aligned}\tag{4.17}$$

Budući da je u većini bioloških primjena $0 < \varepsilon \ll 1$, trebamo samo procijeniti $O(1)$ članove, jer su doprinosi $O(\varepsilon)$ članova zanemarivi.

Završimo analizu početnog problema (3.3)-(3.7). Bezdimenzionirajmo preostale veličine:

$$z(\tau) = \frac{p(t)}{s_0}, \quad w(\tau) = \frac{e(t)}{e_0},$$

te koristeći (4.17) za u i v , iz (3.8), zamjenom varijabli dobivamo

$$\begin{aligned} z(\tau) &= \frac{p(t)}{s_0} = \frac{k_2}{k_1 s_0} k_1 e_0 \int_0^t \frac{c(u)}{e_0} du \\ &= \frac{k_2}{k_1 s_0} k_1 e_0 \int_0^t v(k_1 e_0 u) du \\ &= \left[\begin{array}{ll} \tau' = k_1 e_0 u & d\tau' = k_1 e_0 du \\ 0 \rightarrow 0 & t \rightarrow k_1 e_0 t = \tau \end{array} \right] \\ &= \lambda \int_0^\tau v(\tau') d\tau', \end{aligned}$$

i iz (3.10) dijeleći sa e_0 , dobivamo

$$w(\tau) = 1 - v(\tau).$$

Brza promjena u kompleksu enzim-supstrat $v(\tau; \varepsilon)$ odvija se u bezdimenzionalnom vremenu $\tau = O(\varepsilon)$ koje je vrlo kratko. Ekvivalentno dimenzionalno vrijeme t je također jako kratko, točnije $t = O\left(\frac{\varepsilon}{k_1 e_0}\right) = O\left(\frac{1}{k_1 s_0}\right)$, i za mnoge eksperimentalne situacije nije mjerljivo. Zato se u mnogim eksperimentima nikada ne promatra singularno rješenje za $u(\tau)$ i $v(\tau)$. Dakle, tada je rješenje dano $O(1)$ vanjskim rješenjem $u_0(\tau)$ i $v_0(\tau)$ iz (4.3), dobiveno iz sustava (3.26) postavljanjem $\varepsilon = 0$ i koje zadovoljava samo početni uvjet za $u(\tau)$.

Drugim riječima, kažemo da je dana reakcija u stacionarnom stanju za kompleks enzim-supstrat $v(\tau)$, što znači da je v nepromjenjiv u vremenu, tj. $\varepsilon \frac{dv}{d\tau} \approx 0$. Dakle, v -reakcija je toliko brza da je gotovo uvijek u ravnoteži. Ovo je uobičajena Michaelis-Menten hipoteza kvazistacionarnog stanja.

Spomenimo još i brzinu reakcije (vidi [3, str. 53] i [11, str. 187]), danu kao:

$$r_0 = -\left. \frac{du_0(\tau)}{d\tau} \right|_{\tau=0}.$$

Iz vanjskog rješenja slijedi

$$r_0 = \lambda \frac{u_0(0)}{u_0(0) + K} = \frac{\lambda}{1 + K}. \quad (4.18)$$

Zapišimo i pripadni dimenzionalni oblik. Iz (3.24) slijedi:

$$R_0 = \frac{k_2 e_0 s_0}{s_0 + K_m} = \frac{Q s_0}{s_0 + K_m}, \quad (4.19)$$

gdje je $Q = [R_0]_{max} = k_2 e_0$ maksimalna brzina, a K_m Michaelis-Mentenova konstanta. Gornja brzina, temeljena na kvazistacionarnoj pretpostavci, je ono što se obično želi s biološke točke gledišta. Iz (3.26), točna početna brzina za supstrat u i kompleks v su:

$$\left. \frac{du(\tau)}{d\tau} \right|_{\tau=0} = -1, \quad \left. \frac{dv(\tau)}{d\tau} \right|_{\tau=0} = \frac{1}{\varepsilon}.$$

Brzina reakcije, koja zapravo varira u vremenu, je veličina $\frac{ds}{dt}$ iz vanjskog rješenja $\frac{du_0}{d\tau}$, zapisana u dimenzionalnom obliku. Stoga je (Michaelis-Menten) unos od S reguliran jednadžbom

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{Qs}{s + K_m}. \quad (4.20)$$

U slučaju kada je $s \ll K_m$, vrijedi

$$\frac{ds}{dt} \approx -\frac{Qs}{K_m}, \quad (4.21)$$

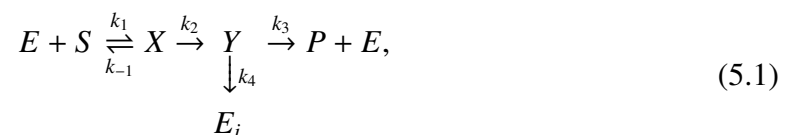
dakle, brzina enzimske reakcije je linearna u s .

Maksimalna brzina Q ovisi o konstanti brzine k_2 , koja se još naziva i *obrtni (prometni) broj*. Obrtni broj predstavlja broj molekula supstrata koje enzim, kada je u potpunosti zasićen supstratom, može pretvoriti u produkt u jedinici vremena (vidi [8]).

Poglavlje 5

Suicidna inhibicija

U ovom odjeljku pratimo analizu danu u [11, str. 188-195]. Promatramo sljedeću jednadžbu kemijske reakcije:



gdje E , S i P redom označavaju enzim, supstrat i produkt, X i Y su enzim-supstrat intermedijeri, E_i neaktivan enzim, a k_i su pozitivne konstante brzine.

U danom sustavu, Y može slijediti jedan od dva nepovratna puta, do $P + E$ ili do E_i . Supstrat S naziva se i *suicidni inhibitor* jer se poput supstrata veže na aktivno mjesto enzima, ali ga enzim pretvara u inhibitor koji nepovratno inaktivira enzim. Drugim riječima, enzim "počini samoubojstvo", budući da sam sebe nepovratno inhibira.

Suicidni inhibitori su posebno korisni u primjeni lijekova. Na primjer, penicilin je antibiotik koji nepovratno inhibira enzim glikopeptid transpeptidazu, enzim odgovoran za sintezu stanične stijenke bakterija čime se sprječava njihova proizvodnja (vidi [7]).

Vratimo se gornjoj jednadžbi kemijske reakcije. Primjenom zakona očuvanja mase i zakona djelovanja mase, iz (5.1) dolazimo do sustava običnih diferencijalnih jednadžbi:

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1 [E] [S] + k_{-1} [X], \quad (5.2)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1 [E] [S] + k_{-1} [X] + k_3 [Y], \quad (5.3)$$

$$\frac{d[X]}{dt} = k_1 [E] [S] - k_{-1} [X] - k_2 [X], \quad (5.4)$$

$$\frac{d[Y]}{dt} = k_2 [X] - k_3 [Y] - k_4 [Y], \quad (5.5)$$

$$\frac{d[E_i]}{dt} = k_4 [Y], \quad (5.6)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_3 [Y], \quad (5.7)$$

gdje je [] oznaka za koncentraciju kao i ranije. Uvedimo i početne uvjete:

$$\begin{aligned} [S](0) &= s_0, & [E](0) &= e_0, \\ [X](0) &= [Y](0) = [E_i](0) = [P](0) = 0. \end{aligned} \quad (5.8)$$

Primjetimo da iz (5.7) integriranjem lako odredimo [P] ukoliko je izračunat [Y], stoga ćemo uzeti u obzir prvih pet jednažbi. No, koristeći zakon očuvanja za enzime, sustav je moguće dodatno reducirati; naime, zbrojivši (5.3)-(5.6), dobivamo

$$\frac{d}{dt} ([E] + [X] + [Y] + [E_i]) = 0, \quad (5.9)$$

te uzimajući u obzir i početni uvjet, slijedi:

$$[E] + [X] + [Y] + [E_i] = e_0. \quad (5.10)$$

Sada pomoću (5.10) eliminiramo [E], čime dobivamo sustav

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1 (e_0 - [X] - [Y] - [E_i]) [S] + k_{-1} [X], \quad (5.11)$$

$$\frac{d[X]}{dt} = k_1 (e_0 - [X] - [Y] - [E_i]) [S] - (k_{-1} + k_2) [X], \quad (5.12)$$

$$\frac{d[Y]}{dt} = k_2 [X] - (k_3 + k_4) [Y], \quad (5.13)$$

$$\frac{d[E_i]}{dt} = k_4 [Y]. \quad (5.14)$$

Sljedeći korak je bezdimenzionirati gornji sustav. Ovdje koristimo pretpostavku da $\frac{e_0}{s_0}$ nije malen. Dakle, provest ćemo analizu singularnih perturbacija na odgovarajućem bezdimenzionalnom sustavu, imajući na umu da je ovdje $\frac{e_0}{s_0}$ reda $O(1)$, dok je $\frac{e_0}{s_0 + K_m}$, za $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$, malo, što ćemo pokazati u nastavku.

5.1 Procjene vremenskih skala

Vratimo se nakratko na sustav (3.11), koji smo bezdimenzionirali koristeći pretpostavku da je $\frac{e_0}{s_0} \ll 1$. Međutim, to nije uvijek istina. Koristeći analizu iz [11, str. 178-180] i [13], uvest ćemo bezdimenzionalizaciju koja pokriva i slučaj kada je $\frac{e_0}{s_0} = O(1)$, kao što vrijedi u sustavu (5.11)-(5.14).

Spomenimo prvo procjene za dvije vremenske skale koje ćemo koristiti kod bezdimenzionalizacije gornjeg sustava: brzu t_c i sporu vremensku skalu t_s . Kod sustava (3.11) smo napomenuli da se tijekom početne prijelazne faze (blizu $t = 0$) ne očekuje značajnija promjena koncentracije supstrata. Dakle, pretpostavljamo da je $\frac{ds}{dt} = 0$, tj. $s(t) = s_0$. Tijekom ove faze $c(t)$ brzo raste pa vrijedi $\frac{dc}{dt} \neq 0$. Stoga se procjena brze vremenske skale dobiva iz druge jednadžbe sustava (3.11) sa $s(t) = s_0$:

$$\frac{dc}{dt} = k_1 e_0 s_0 - (k_1 s_0 + k_{-1} + k_2)c = k_1 e_0 s_0 - k_1 (s_0 + K_m)c,$$

gdje je $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$. Riješimo gornju jednadžbu metodom separacije varijabli (vidi [4]). Dobivamo sljedeće:

$$\begin{aligned} \frac{dc}{k_1 e_0 s_0 - k_1 (s_0 + K_m)c} = dt &\Rightarrow \int \frac{dc}{k_1 e_0 s_0 - k_1 (s_0 + K_m)c} = \int dt, \\ \frac{\ln |k_1 e_0 s_0 - k_1 (s_0 + K_m)c|}{-k_1 (s_0 + K_m)} &= t + A, \\ \ln |k_1 e_0 s_0 - k_1 (s_0 + K_m)c| &= -k_1 (s_0 + K_m)t + B, \\ k_1 e_0 s_0 - k_1 (s_0 + K_m)c &= C e^{-k_1 (s_0 + K_m)t}, \end{aligned}$$

odakle dobivamo izraz za c :

$$c(t) = \frac{e_0 s_0}{s_0 + K_m} - \frac{C}{k_1 (s_0 + K_m)} e^{-k_1 (s_0 + K_m)t},$$

gdje je $C > 0$. Koristeći početni uvjet $c(0) = 0$, slijedi $C = k_1 e_0 s_0$, čime je dobiveno rješenje:

$$c(t) = \frac{e_0 s_0}{s_0 + K_m} \left(1 - e^{-k_1(s_0 + K_m)t}\right).$$

Općenito se vremenska skala za funkciju oblika e^{-kt} uzima kao k^{-1} (vidi [12, str. 56]), pa je brza vremenska skala t_c , u kojoj $c(t)$ brzo raste, dana kao

$$t_c = (k_1(s_0 + K_m))^{-1}. \quad (5.15)$$

Procijenimo sada dugu (supstratnu) vremensku skalu t_s . Tada se koncentracija supstrata $s(t)$ značajno mijenja (dakle, $\frac{ds}{dt} \neq 0$), dok je koncentracija kompleksa u ekvilibriju tj. $\frac{dc}{dt} = 0$. Drugim riječima, vrijede (3.14) i (3.22). Koristimo karakterizaciju iz [12, str. 56]:

$$t_s \approx \frac{s_{max} - s_{min}}{\left|\frac{ds}{dt}\right|_{max}},$$

imajući na umu da gornje vrijednosti tražimo za razdoblje nakon brze početne prijelazne faze. Budući da se u početnoj fazi $s(t)$ ne mijenja, sada vrijedi da je $s \in [0, s_0]$. Kako bismo izračunali nazivnik, koristimo jednadžbu (3.21), koja vrijedi za razdoblje nakon početne prijelazne faze, kada se $s(t)$ mijenja. Budući da $\left|\frac{ds}{dt}\right| = \frac{k_2 e_0 s}{s + K_m}$ postiže maksimum za $s = s_0$, slijedi:

$$t_s \approx \frac{s_0}{\frac{k_2 e_0 s_0}{s_0 + K_m}} = \frac{s_0 + K_m}{k_2 e_0}. \quad (5.16)$$

Pogledajmo sada neke pretpostavke potrebne za valjanost aproksimacije kvazistacionarnog stanja. Jedna pretpostavka je da je kratka početna prijelazna faza doista kratka u usporedbi s vremenom tijekom kojeg se $s(t)$ primjetno mijenja, što znači da je nužno $t_c \ll t_s$. Iz (5.15) i (5.16) slijedi

$$\frac{k_2 e_0}{k_1(s_0 + K_m)^2} \ll 1. \quad (5.17)$$

Drugi zahtjev aproksimacije kvazistacionarnog stanja odnosi se na početni uvjet za $s(t)$, dan kao $s(0) = s_0$. Ovaj uvjet je prikladan ukoliko postoji zanemariva relativna promjena u koncentraciji supstrata tijekom kratkog prijelaznog razdoblja, tj. $\left| \frac{\Delta s}{s_0} \right| \ll 1$. Iz [13] imamo:

$$\left| \frac{\Delta s}{s_0} \right| \approx \frac{1}{s_0} \left| \frac{ds}{dt} \right|_{max} \cdot t_c. \quad (5.18)$$

Kako bismo izračunali $\left| \frac{ds}{dt} \right|_{max}$ tijekom početne prijelazne faze, na samom početku reakcije, koristimo prvu jednadžbu iz (3.11) postavljajući $t = 0$:

$$\frac{ds}{dt} = -k_1 e_0 s_0,$$

koristeći početne uvjete $s(0) = s_0$ i $c(0) = 0$. Sada iz (5.18) slijedi:

$$\left| \frac{\Delta s}{s_0} \right| \approx \frac{e_0}{s_0 + K_m} \ll 1. \quad (5.19)$$

Budući da se (5.17) može zapisati kao

$$\frac{k_2 e_0}{k_1 (s_0 + K_m)^2} = \frac{e_0}{s_0 + K_m} \cdot \frac{k_2}{k_1 (s_0 + K_m)} = \frac{e_0}{s_0 + K_m} \cdot \frac{1}{\frac{k_1 s_0}{k_2} + \frac{k_{-1}}{k_2} + 1} \ll 1, \quad (5.20)$$

vrijedi da je uvjet (5.19) jači od (5.17), tj. (5.19) povlači (5.17). Uvjet (5.20) može biti zadovoljen i za $\frac{e_0}{s_0} = O(1)$, ako je K_m dovoljno velik.

5.2 Bezdimeenzionalizacija

Sada smo spremni bezdimeenzionalirati sustav (5.11)-(5.14). Budući da bezdimeenzionalizacija ovisi o vremenskoj skali na koju se fokusiramo, bismo između dvije vremenske skale, t_c i t_s , ovisno o tome gdje želimo rješenje: s t_c gledamo područje blizu $t = 0$, dok nas s t_s zanima duga vremenska skala tijekom koje se $s(t)$ značajno mijenja. Kao i u prethodnom poglavlju, problem s dvije takve vremenske skale je problem singularne perturbacije.

Uvedimo bezdimeenzionalne veličine:

$$\begin{aligned}
s &= \frac{[S]}{s_0}, & x &= \frac{s_0 + K_m}{e_0 s_0} [X], & y &= \frac{[Y]}{e_0}, & e_i &= \frac{[E_i]}{e_0}, \\
\sigma &= \frac{s_0}{K_m}, & \rho &= \frac{k_{-1}}{k_2}, & \psi &= \frac{k_3 + k_4}{k_{-1} + k_2}, & \phi &= \frac{k_4}{k_{-1} + k_2}, \\
K_m &= \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}, & \varepsilon &= \frac{e_0}{s_0 + K_m}.
\end{aligned} \tag{5.21}$$

Ako koristimo brzu prijelaznu vremensku skalu t_c iz (5.15), uvodimo sljedeće bezdimenzionalno vrijeme:

$$\tau = \frac{t}{t_c} = tk_1(s_0 + K_m), \tag{5.22}$$

dok kod spore vremenske skale t_s iz (5.16), vrijeme bezdimenzioniramo koristeći

$$T = \frac{(1 + \rho)t}{t_s} = \frac{(1 + \rho)k_2 e_0}{s_0 + K_m} t = \varepsilon(1 + \rho)k_2 t, \tag{5.23}$$

Razlog za faktor $(1 + \rho)$ je algebarska jednostavnost.

Koristeći bezdimenzionalne veličine iz (5.21) s bezdimenzionalnim vremenom τ , odredimo bezdimenzionalni sustav sustava (5.11)-(5.14) za početnu prijelaznu fazu. Krenimo s jednadžbom (5.11) i podijelimo ju sa $s_0 k_1$, čime dobivamo:

$$\begin{aligned}
(s_0 + K_m) \frac{ds}{d(tk_1(s_0 + K_m))} &= -(e_0 - [X] - [Y] - [E_i])s + \frac{k_{-1}}{s_0 k_1} [X], \\
(s_0 + K_m) \frac{ds}{d\tau} &= -(e_0 - [X] - [Y] - [E_i])s + \frac{k_{-1}}{s_0 k_1} [X].
\end{aligned}$$

Podijelimo sada gornju jednadžbu sa e_0 :

$$\varepsilon^{-1} \frac{ds}{d\tau} = - \left(1 - \frac{1}{e_0} [X] - y - e_i \right) s + \frac{k_{-1}}{e_0 s_0 k_1} [X],$$

i pomnožimo sa ε te zapišemo koristeći veličine iz (5.21):

$$\begin{aligned}
\frac{ds}{d\tau} &= \varepsilon \left(-s + \frac{1}{e_0} [X] s + sy + se_i + \frac{k_{-1}}{e_0 s_0 k_1} [X] \right) \\
&= \varepsilon \left(-s + \frac{s_0 + K_m}{e_0 s_0} [X] \cdot \frac{s_0}{s_0 + K_m} s + sy + se_i + \frac{s_0 + K_m}{e_0 s_0} [X] \cdot \frac{k_{-1}}{k_1 (s_0 + K_m)} \right) \\
&= \varepsilon \left(-s + \frac{\sigma}{1 + \sigma} sx + sy + se_i + \frac{\rho}{(1 + \rho)(1 + \sigma)} x \right).
\end{aligned}$$

Na isti način bezdimenzioniramo i preostale jednadžbe sustava (5.11)-(5.14), čime dobivamo pripadni bezdimenzionalni sustav za početnu prijelaznu fazu:

$$\frac{ds}{d\tau} = \varepsilon \left(-s + \frac{\sigma}{1 + \sigma} sx + sy + se_i + \frac{\rho}{(1 + \rho)(1 + \sigma)} x \right), \quad (5.24)$$

$$\frac{dx}{d\tau} = s - \frac{\sigma}{1 + \sigma} sx - sy - se_i - \frac{1}{1 + \sigma} x, \quad (5.25)$$

$$\frac{dy}{d\tau} = \frac{\sigma}{(1 + \sigma)^2 (1 + \rho)} x - \frac{\psi}{1 + \sigma} y, \quad (5.26)$$

$$\frac{de_i}{d\tau} = \frac{\phi}{1 + \sigma} y, \quad (5.27)$$

s početnim uvjetima

$$s(0) = 1, \quad x(0) = y(0) = e_i(0) = 0. \quad (5.28)$$

Sustav (5.24)-(5.27), zajedno s početnim uvjetima (5.28), daje singularno ili unutarnje rješenje.

Pronađimo sada bezdimenzionalni sustav reduciranog sustava (5.11)-(5.14) s T kao vremenskom skalom. Krenimo ponovo s prvom jednadžbom (5.11) i pomnožimo ju sa $\frac{s_0 + K_m}{s_0 e_0}$. Dobivamo sljedeće:

$$\frac{ds}{d(\varepsilon t)} = -k_1 (s_0 + K_m) \left(1 - \frac{1}{e_0} [X] - y - e_i \right) s + k_{-1} x.$$

Budući da želimo dobiti izraz za $\frac{ds}{dT}$, gornju jednadžbu trebamo podijeliti sa $k_2(1 + \rho)$. Koristeći $\frac{k_1}{k_2(1 + \rho)} = K_m^{-1}$ i $\frac{k_{-1}}{k_2(1 + \rho)} = \frac{\rho}{1 + \rho}$, slijedi:

$$\begin{aligned}
\frac{ds}{dT} &= -\frac{s_0 + K_m}{K_m} \left(1 - \frac{1}{e_0} [X] - y - e_i \right) s + \frac{\rho}{1 + \rho} x \\
&= -\frac{s_0 + K_m}{K_m} s + \frac{s_0 + K_m}{e_0 s_0} [X] \cdot \frac{s_0}{K_m} s + \frac{s_0 + K_m}{K_m} sy + \frac{s_0 + K_m}{K_m} se_i + \frac{\rho}{1 + \rho} x \\
&= -(1 + \sigma)s + \sigma sx + (1 + \sigma)sy + (1 + \sigma)se_i + \frac{\rho}{1 + \rho} x.
\end{aligned}$$

Preostale jednadžbe sustava (5.11)-(5.14) se bezdimenzioniraju na isti način. Ovime smo dobili bezdimenzionalni sustav:

$$\frac{ds}{dT} = -s((1 + \sigma) - \sigma x - (1 + \sigma)y - (1 + \sigma)e_i) + \frac{\rho}{1 + \rho} x, \quad (5.29)$$

$$\varepsilon \frac{dx}{dT} = s((1 + \sigma) - \sigma x - (1 + \sigma)y - (1 + \sigma)e_i) - x, \quad (5.30)$$

$$\varepsilon \frac{dy}{dT} = \frac{\sigma}{(1 + \sigma)(1 + \rho)} x - \psi y, \quad (5.31)$$

$$\varepsilon \frac{de_i}{dT} = \phi y, \quad (5.32)$$

koji daje nesingularno ili vanjsko rješenje.

Budući da je $0 < \varepsilon \ll 1$, gdje je $\varepsilon = \frac{e_0}{s_0 + K_m}$, dalje provodimo analizu singularnih perturbacija koristeći dobivene bezdimenzionalne sustave.

5.3 Unutarnje (singularno) rješenje

Kako bismo dobili singularno rješenje, koristimo sustav (5.24)-(5.27), s početnim uvjetima (5.28). Kao i u prethodnom poglavlju, i ovdje pretpostavljamo da rješenje ovisi analitički o malom parametru ε , stoga rješenje sustava tražimo u obliku Taylorovog reda u ε (vidi [10, str. 139]):

$$s(\tau; \varepsilon) = s^{(0)}(\tau) + \varepsilon s^{(1)}(\tau) + \varepsilon^2 s^{(2)}(\tau) + \dots, \quad (5.33)$$

za svaku od varijabli s, x, y i e_i . Uvrštavajući te izraze u (5.24)-(5.27) i izjednačavajući potencije od ε , dobivamo niz diferencijalnih jednadžbi.

Primijetimo da vrijedi:

$$\varepsilon = \frac{e_0}{s_0 + K_m} = \frac{e_0}{s_0 \left(1 + \frac{K_m}{s_0} \right)} = \frac{e_0}{s_0} \frac{s_0}{s_0 + K_m} = \frac{e_0}{s_0} \frac{\sigma}{1 + \sigma}, \quad (5.34)$$

iz čega slijedi

$$\sigma = (1 + \sigma) \frac{s_0}{e_0} \varepsilon = \frac{s_0}{e_0} \varepsilon + \frac{s_0}{e_0} \varepsilon \sigma,$$

gdje je

$$\frac{s_0}{e_0} \varepsilon \sigma = \frac{s_0}{e_0} \frac{e_0}{s_0 + K_m} \frac{s_0}{K_m} = \frac{s_0^2}{K_m(s_0 + K_m)} = \varepsilon^2 \cdot \frac{s_0^2}{e_0^2} \cdot \frac{s_0 + K_m}{K_m}.$$

Budući da je $\frac{s_0}{e_0} = O(1)$ i $\frac{s_0 + K_m}{K_m} > 1$, vrijedi

$$\sigma = \frac{s_0}{e_0} \varepsilon + O(\varepsilon^2). \quad (5.35)$$

Ponovno koristeći činjenicu da je $\frac{s_0}{e_0} = O(1)$, slijedi $\sigma = O(\varepsilon)$. Sada σ možemo zapisati kao

$$\sigma = \varepsilon p, \quad (5.36)$$

za konstantu p reda $O(1)$. Izraz (5.36) za σ koristimo kako bismo pronašli $O(1)$ i $O(\varepsilon)$ jednadžbe.

Iz (5.24) vidimo da je $O(1)$ jednadžba za s dana sa

$$\frac{ds^{(0)}}{d\tau} = 0, \quad (5.37)$$

što s početnim uvjetom iz (5.28) daje $s^{(0)}(\tau) = 1$.

Zapišimo $O(1)$ jednadžbu za y . Desna strana jednadžbe (5.26) glasi:

$$\frac{\sigma}{(1 + \sigma)^2(1 + \rho)} (x^{(0)} + \varepsilon x^{(1)} + O(\varepsilon^2)) - \frac{\psi}{1 + \sigma} (y^{(0)} + \varepsilon y^{(1)} + O(\varepsilon^2)),$$

pa množeći sa $(1 + \sigma)^2 = 1 + 2p\varepsilon + p^2\varepsilon^2$ i uvrštavajući (5.36) za σ , dobivamo

$$(-\psi y^{(0)}) + \varepsilon \left(\frac{p}{1 + \rho} x^{(0)} - p\psi y^{(0)} - \psi y^{(1)} \right) + O(\varepsilon^2), \quad (5.38)$$

dok na lijevoj strani jednadžbe (5.26) nakon množenja sa $(1 + \sigma)^2$ ostaje

$$\frac{dy^{(0)}}{d\tau} + \varepsilon \left(2p \frac{dy^{(0)}}{d\tau} + \frac{dy^{(1)}}{d\tau} \right) + O(\varepsilon^2). \quad (5.39)$$

Dakle, $O(1)$ jednadžba za y glasi:

$$\frac{dy^{(0)}}{d\tau} = -\psi y^{(0)}. \quad (5.40)$$

Koristeći početni uvjet iz (5.28), slijedi $y^{(0)}(\tau) = 0$. Na jednak način iz (5.27) dobijemo $O(1)$ jednadžbu za e_i :

$$\frac{de_i^{(0)}}{d\tau} = \phi y^{(0)} = 0, \quad (5.41)$$

pa je i $e_i^{(0)} = 0$, zbog početnog uvjeta danog u (5.28). Preostaje zapisati $O(1)$ jednadžbu za x . Množeci sa $(1 + \sigma)$ i koristeći $y^{(0)} = e_i^{(0)} = 0$, $O(1)$ jednadžba glasi:

$$\frac{dx^{(0)}}{d\tau} = s^{(0)} - x^{(0)} = 1 - x^{(0)}, \quad (5.42)$$

odakle, sa $x^{(0)}(0) = 0$, dobivamo $x^{(0)}(\tau) = 1 - e^{-\tau}$.

Da bismo dobili rješenja za y i e_i koja su različita od nule, trebamo odrediti barem $O(\varepsilon)$ članove, dakle $y^{(1)}(\tau)$ i $e_i^{(1)}(\tau)$. Izjednačavajući izraze uz ε te koristeći dobivena rješenja za $y^{(0)}$ i $x^{(0)}$, iz (5.38) i (5.39) dobivamo

$$\frac{dy^{(1)}}{d\tau} = \frac{P}{1 + \rho} x^{(0)} - \psi y^{(1)} = \frac{P}{1 + \rho} (1 - e^{-\tau}) - \psi y^{(1)}. \quad (5.43)$$

Rješenje homogene jednadžbe:

$$\frac{dy^{(1)}}{d\tau} = -\psi y^{(1)},$$

je dano sa

$$y_H^{(1)}(\tau) = C e^{-\psi\tau},$$

za pozitivnu konstantu C . Da bismo riješili nehomogenu jednadžbu, koristimo metodu varijacije konstanti (vidi [4]). Dakle, rješenje tražimo u obliku:

$$y^{(1)}(\tau) = C(\tau) e^{-\psi\tau}. \quad (5.44)$$

Derivirajmo gornju jednadžbu kako bismo dobili izraz odakle određujemo funkciju C :

$$\frac{dy^{(1)}}{d\tau} = C'(\tau)e^{-\psi\tau} - \psi C(\tau)e^{-\psi\tau} = C'(\tau)e^{-\psi\tau} - \psi y^{(1)}.$$

Koristeći (5.43), dobivamo:

$$\begin{aligned} \frac{dy^{(1)}}{d\tau} + \psi y^{(1)} &= C'(\tau)e^{-\psi\tau}, \\ \frac{p}{1+\rho}(1 - e^{-\tau}) &= C'(\tau)e^{-\psi\tau}, \end{aligned}$$

odakle računamo C . Množenjem sa $e^{\psi\tau}$, a zatim integriranjem, dobivamo:

$$C(\tau) = \frac{p}{1+\rho} \left(\frac{1}{\psi} e^{\psi\tau} - \frac{1}{\psi-1} e^{(\psi-1)\tau} \right) + D,$$

gdje je D konstanta integracije koju određujemo koristeći početni uvjet na $y^{(1)}$. Uvrstimo gornji izraz za C u (5.44), čime dobivamo:

$$y^{(1)}(\tau) = \frac{p}{1+\rho} \left(\frac{1}{\psi} - \frac{1}{\psi-1} e^{-\tau} \right) + D e^{-\psi\tau}.$$

Iz (5.28) dobivamo početni uvjet $y^{(1)}(0) = 0$, iz čega slijedi da je $D = -\frac{p}{1+\rho} \left(\frac{1}{\psi} - \frac{1}{\psi-1} \right)$. Dakle, rješenje $y^{(1)}$ je

$$y^{(1)}(\tau) = \frac{p}{1+\rho} \left(\frac{1 - e^{-\psi\tau}}{\psi} + \frac{e^{-\psi\tau} - e^{-\tau}}{\psi-1} \right). \quad (5.45)$$

Preostaje odrediti $e_i^{(1)}$. Pomnožimo zato (5.27) sa $(1 + \sigma)$. Koristeći $y^{(0)} = e_i^{(0)} = 0$, dobivamo:

$$\varepsilon \frac{de_i^{(1)}}{d\tau} + O(\varepsilon^2) = \phi \varepsilon y^{(1)} + O(\varepsilon^2). \quad (5.46)$$

$O(\varepsilon)$ jednadžba za e_i glasi:

$$\frac{de_i^{(1)}}{d\tau} = \phi y^{(1)} = \frac{\phi p}{1+\rho} \left(\frac{1 - e^{-\psi\tau}}{\psi} + \frac{e^{-\psi\tau} - e^{-\tau}}{\psi - 1} \right). \quad (5.47)$$

Gornju jednadžbu rješavamo metodom separacije varijabli (vidi [4]). Iz

$$de_i^{(1)} = \frac{\phi p}{1+\rho} \left(\frac{1}{\psi} - \frac{e^{-\psi\tau}}{\psi} + \frac{e^{-\psi\tau}}{\psi - 1} - \frac{e^{-\tau}}{\psi - 1} \right) d\tau,$$

integriranjem dobivamo

$$\begin{aligned} e_i^{(1)} &= \frac{\phi p}{1+\rho} \left(\frac{\tau}{\psi} + \frac{e^{-\psi\tau}}{\psi^2} - \frac{e^{-\psi\tau}}{\psi(\psi - 1)} + \frac{e^{-\tau}}{\psi - 1} \right) + D \\ &= \frac{\phi p}{1+\rho} \left(\frac{\tau}{\psi} - \frac{e^{-\psi\tau}}{\psi^2(\psi - 1)} + \frac{e^{-\tau}}{\psi - 1} \right) + D. \end{aligned}$$

Iz $e_i(0) = 0$ slijedi $e_i^{(1)}(0) = 0$, pa je $D = \frac{\phi p}{1+\rho} \left(\frac{1}{\psi^2(\psi - 1)} - \frac{1}{\psi - 1} \right)$. Dakle, rješenje je dano sa

$$e_i^{(1)}(\tau) = \frac{\phi p}{1+\rho} \left(\frac{\tau}{\psi} + \frac{1 - e^{-\psi\tau}}{\psi^2(\psi - 1)} + \frac{e^{-\tau} - 1}{\psi - 1} \right). \quad (5.48)$$

Pri dobivanju $e_i^{(1)}(\tau)$, primijetimo da smo pretpostavili $\phi = O(1)$. Ako je $\phi = O(\varepsilon)$, jednako kao i za σ , ϕ bismo zapisali kao $\phi = \varepsilon q$. Tada bi vrijedilo $e_i^{(1)}(\tau) = 0$, no odgovarajući $e_i^{(2)}(\tau)$ bi bio jednak $e_i^{(1)}(\tau)$ iz (5.48).

Na sličan način možemo pronaći i ostale $O(\varepsilon^n)$, $n \in \mathbb{N}$, članove od s, x, y i e_i .

5.4 Vanjsko (nesingularno) rješenje

Sada tražimo rješenja u dugoj vremenskoj skali koja daje aproksimaciju kvazistacionarnog stanja. Podsjetimo se da ova rješenja općenito neće zadovoljiti početne uvjete. Neodređene konstante integracije dobiju se usklađivanjem vanjskih i unutarnjih rješenja.

Kao i ranije, i ovdje pretpostavljamo da rješenje ovisi analitički o malom parametru ε . Dakle, rješenja sustava (5.29)-(5.32) tražimo u obliku:

$$s(T; \varepsilon) = s_{(0)}(T) + \varepsilon s_{(1)}(T) + \varepsilon^2 s_{(2)}(T) + \dots, \quad (5.49)$$

za svaku od varijabli s, x, y i e_i . Gornje izraze uvrštavamo u (5.29)-(5.32) te izjednačavamo potencije od ε , čime ponovo dobivamo niz diferencijalnih jednažbi.

Ovdje, međutim, moramo izračunati neodređene konstante integracije, usklađivanjem unutarnjih rješenja kad $\tau \rightarrow \infty$ sa vanjskim rješenjima kad $T \rightarrow 0$.

Koristeći σ iz (5.36), iz (5.30) dobivamo $O(1)$ jednažbu za x :

$$0 = s_{(0)}(1 - y_{(0)} - e_{i(0)}) - x_{i(0)} = s_{(0)} - s_{(0)}y_{(0)} - s_{(0)}e_{i(0)} - x_{(0)}. \quad (5.50)$$

Odredimo sada $O(1)$ jednažbu za y . Uz pretpostavku da je $\psi = O(1)$, pomnožimo (5.31) sa $(1 + \sigma)$, čime dobivamo:

$$(1 + p\varepsilon) \left(\varepsilon \frac{dy_{(0)}}{dT} + O(\varepsilon^2) \right) = \frac{p\varepsilon}{1 + \rho} (x_{(0)} + O(\varepsilon)) - \psi(1 + p\varepsilon) (y_{(0)} + \varepsilon y_{(1)} + O(\varepsilon^2)),$$

$$\varepsilon \frac{dy_{(0)}}{dT} + O(\varepsilon^2) = (-\psi y_{(0)}) + \varepsilon \left(\frac{P}{1 + \rho} x_{(0)} - p\psi y_{(0)} - \psi y_{(1)} \right) + O(\varepsilon^2).$$

Dakle, iz $O(1)$ jednažbe

$$0 = -\psi y_{(0)},$$

dobivamo $y_{(0)}(T) = 0$, što zajedno sa (5.50) daje

$$x_{(0)} = s_{(0)}(1 - e_{i(0)}). \quad (5.51)$$

Da bismo dobili rješenje za y različito od nule, trebamo izračunati $y_{(1)}(T)$. Odredimo zato $O(\varepsilon)$ jednažbu za y . Imajući na umu da je $y_{(0)}(T) = 0$, iz gornjeg raspisa dobivamo $O(\varepsilon)$ jednažbu:

$$0 = \frac{P}{1 + \rho} x_{(0)} - \psi y_{(1)},$$

odakle izrazimo $y_{(1)}$:

$$y_{(1)} = \frac{P}{\psi(1 + \rho)} x_{(0)} = \frac{P}{\psi(1 + \rho)} s_{(0)}(1 - e_{i(0)}). \quad (5.52)$$

Da bismo dalje izjednačili koeficijente, moramo odrediti red veličine svakog od članova. Eksperimentalno, znamo da postoje dva bitno različita ishoda: ili je sav supstrat iscrpljen, dakle, $\psi = O(1)$ sa $\phi = O(\varepsilon)$ ili je sav enzim inaktiviran, što odgovara slučaju kad je $\phi = O(1)$ sa $\psi = O(1)$. Riješimo jednažbe za oba slučaja.

Prvi slučaj: $\rho = O(1)$, $\phi = O(1)$, $\psi = O(1)$

Ovo je slučaj kada su sve konstante brzine istog reda veličine. Krenimo sa jednažbom (5.29) za s . Zajedno sa (5.36), (5.49) i (5.51), dobivamo $O(1)$ jednažbu za s :

$$\begin{aligned} \frac{ds_{(0)}}{dT} &= -s_{(0)}(1 - e_{i(0)}) + \frac{\rho}{1 + \rho}x_{(0)} \\ &= -s_{(0)}(1 - e_{i(0)}) + \frac{\rho}{1 + \rho}s_{(0)}(1 - e_{i(0)}) \\ &= -\frac{1}{1 + \rho}s_{(0)}(1 - e_{i(0)}), \end{aligned} \quad (5.53)$$

gdje smo koristili $y_{(0)}(T) = 0$.

Da odredimo $e_{i(0)}$ iz (5.32), trebamo pronaći $O(\varepsilon)$ jednažbu za e_i . Pretpostavljajući $\phi = O(1)$, zajedno sa (5.49) i $y_{(0)}(T) = 0$, iz (5.32) slijedi:

$$\varepsilon \frac{de_{i(0)}}{dT} + O(\varepsilon^2) = \phi(\varepsilon y_{(1)} + O(\varepsilon^2)).$$

Sada koristeći (5.51) i (5.52), $O(\varepsilon)$ jednažba za e_i se može zapisati kao:

$$\frac{de_{i(0)}}{dT} = \phi y_{(1)} = \frac{\phi p}{\psi(1 + \rho)}s_{(0)}(1 - e_{i(0)}). \quad (5.54)$$

Podijelimo (5.53) sa (5.54), odakle dobivamo

$$\frac{ds_{(0)}}{dT} = -\frac{\psi}{\phi p} \frac{de_{i(0)}}{dT}.$$

Integriranjem slijedi

$$s_{(0)}(T) = -\frac{\psi}{\phi p} e_{i(0)}(T) + B,$$

odakle dobivamo izraz za $e_{i(0)}$:

$$e_{i(0)}(T) = \frac{1}{\beta} (B - s_{(0)}(T)), \quad (5.55)$$

gdje je B konstanta integracije i

$$\beta = \frac{\psi}{\phi p}. \quad (5.56)$$

Konstantu B određujemo usklađivanjem; dakle, $s_{(0)}(T)$, $x_{(0)}(T)$, $y_{(0)}(T)$ i $e_{i(0)}(T)$, kad $T \rightarrow 0$, moraju se redom podudarati sa $s^{(0)}(\tau)$, $x^{(0)}(\tau)$, $y^{(0)}(\tau)$ i $e_i^{(0)}(\tau)$, kad $\tau \rightarrow \infty$. Budući da vrijedi $s^{(0)}(\tau) = 1$, $x^{(0)}(\tau) = 1 - e^{-\tau}$, $y^{(0)}(\tau) = 0$ i $e_i^{(0)}(\tau) = 0$, slijedi:

$$\begin{aligned} \lim_{T \rightarrow 0} s_{(0)}(T) &= \lim_{\tau \rightarrow \infty} s^{(0)}(\tau) = 1, & \lim_{T \rightarrow 0} x_{(0)}(T) &= \lim_{\tau \rightarrow \infty} x^{(0)}(\tau) = 1, \\ \lim_{T \rightarrow 0} y_{(0)}(T) &= \lim_{\tau \rightarrow \infty} y^{(0)}(\tau) = 0, & \lim_{T \rightarrow 0} e_{i(0)}(T) &= \lim_{\tau \rightarrow \infty} e_i^{(0)}(\tau) = 0. \end{aligned} \quad (5.57)$$

Koristeći gornje uvjete, iz (5.55), slijedi $B = 1$. Uvrstimo sada (5.55) i $B = 1$ u (5.53), čime dobivamo:

$$\frac{ds_{(0)}}{dT} = -\frac{1}{1+\rho} s_{(0)} \left(1 - \frac{1}{\beta} (1 - s_{(0)}) \right) = \frac{s_{(0)} (1 - \beta - s_{(0)})}{\beta(1+\rho)}.$$

Kao i ranije, koristimo metodu separacije varijabli (vidi [4]) kako bismo riješili gornju jednadžbu. Budući da vrijedi:

$$\frac{1}{s_{(0)} (1 - \beta - s_{(0)})} = \frac{1}{1 - \beta} \left(\frac{1}{s_{(0)}} + \frac{1}{1 - \beta - s_{(0)}} \right),$$

integriranjem, a zatim množenjem sa $(1 - \beta)$, dobivamo:

$$\int \frac{ds_{(0)}}{s_{(0)}(1-\beta-s_{(0)})} = \int \frac{dT}{\beta(1+\rho)},$$

$$\int \left(\frac{1}{s_{(0)}} + \frac{1}{1-\beta-s_{(0)}} \right) ds = \frac{1-\beta}{\beta(1+\rho)} \int dT,$$

$$\ln|s_{(0)}| - \ln|1-\beta-s_{(0)}| = \frac{1-\beta}{\beta(1+\rho)} T + C,$$

$$\ln \left| \frac{s_{(0)}}{1-\beta-s_{(0)}} \right| = \frac{1-\beta}{\beta(1+\rho)} T + C,$$

$$\frac{s_{(0)}}{1-\beta-s_{(0)}} = C_0 e^{\frac{1-\beta}{\beta(1+\rho)} T},$$

odakle možemo izraziti $s_{(0)}$:

$$s_{(0)} = \frac{(1-\beta)C_0 e^{\frac{1-\beta}{\beta(1+\rho)} T}}{1 + C_0 e^{\frac{1-\beta}{\beta(1+\rho)} T}} = \frac{1-\beta}{A e^{\frac{\beta-1}{\beta(1+\rho)} T} + 1}.$$

Konstantu integracije A određujemo koristeći uvjet za $s_{(0)}(T)$ kad $T \rightarrow 0$ iz (5.57). Dobivamo $A = -\beta$. Dakle, rješenja $s_{(0)}(T)$ i $e_{i(0)}(T)$ su:

$$s_{(0)}(T) = \frac{1-\beta}{1 - \beta e^{\frac{\beta-1}{\beta(1+\rho)} T}}, \quad e_{i(0)}(T) = \frac{1-s_{(0)}(T)}{\beta}. \quad (5.58)$$

Drugi slučaj: $\rho = O(1)$, $\phi = O(\varepsilon)$, $\psi = O(1)$

Koristeći pretpostavku $\phi = O(\varepsilon)$, zapišimo ϕ kao

$$\phi = \varepsilon q, \quad (5.59)$$

gdje je q konstanta reda $O(1)$.

Odredimo prvo $e_{i(0)}$ iz (5.32). Dakle, potrebno je pronaći $O(\varepsilon)$ jednadžbu za e_i . Koristeći (5.49), (5.59) i $y_{(0)}(T) = 0$, iz (5.32) slijedi:

$$\varepsilon \frac{de_{i(0)}}{dT} + \varepsilon^2 \frac{de_{i(1)}}{dT} + O(\varepsilon^3) = \phi (\varepsilon y_{(1)} + O(\varepsilon^2)) = \varepsilon^2 q y_{(1)} + O(\varepsilon^3).$$

Dakle, $O(\varepsilon)$ jednažba za e_i je:

$$\frac{de_{i(0)}}{dT} = 0 \quad \Rightarrow \quad e_{i(0)}(T) = C,$$

za konstantu integracije C koju određujemo iz uvjeta (5.57). Dobivamo

$$e_{i(0)}(T) = 0. \quad (5.60)$$

Kako bismo dobili rješenje različito od nule za e_i , odredimo $e_{i(1)}$, za što nam je potrebna $O(\varepsilon^2)$ jednažba. Iz gornjeg raspisa, uvrštavajući (5.51), (5.52) i (5.60), slijedi:

$$\frac{de_{i(1)}}{dT} = qy_{(1)} = \frac{pq}{\psi(1+\rho)} s_{(0)}. \quad (5.61)$$

Izračunajmo sada $O(1)$ jednažbu za s . Račun je neovisan o ϕ , stoga ponovno dobivamo (5.53). Koristeći $e_{i(0)} = 0$, vrijedi:

$$\frac{ds_{(0)}}{dT} = -\frac{1}{1+\rho} s_{(0)} \quad \Rightarrow \quad s_{(0)}(T) = C_0 e^{-\frac{T}{1+\rho}}.$$

Ponovno koristimo (5.57) kako bismo odredili konstantu integracije C_0 . Slijedi:

$$s_{(0)}(T) = e^{-\frac{T}{1+\rho}}. \quad (5.62)$$

Uvrstimo sada gornji rezultat u (5.61):

$$\frac{de_{i(1)}}{dT} = \frac{pq}{\psi(1+\rho)} e^{-\frac{T}{1+\rho}},$$

odakle integriranjem dobivamo:

$$e_{i(1)}(T) = -\frac{pq}{\psi} e^{-\frac{T}{1+\rho}} + A.$$

Konstantu A određujemo usklađivanjem. Prisjetimo se, ako je $\phi = O(\varepsilon)$, tada je $e_i^{(1)}(\tau) = 0$, što smo i napomenuli u prethodnom potpoglavlju. Dakle, iz

$$\lim_{T \rightarrow 0} e_{i(1)}(T) = \lim_{\tau \rightarrow \infty} e_i^{(1)}(\tau) = 0, \quad (5.63)$$

slijedi $A = \frac{pq}{\psi}$. Rješenje je dano sa

$$e_{i(1)}(T) = \frac{pq}{\psi} \left(1 - e^{-\frac{T}{1+p}}\right), \quad (5.64)$$

ili, ako koristimo (5.56):

$$\varepsilon e_{i(1)}(T) = \frac{1}{\beta} \left(1 - e^{-\frac{T}{1+p}}\right). \quad (5.65)$$

Na jednak način bismo došli i do ostalih $O(\varepsilon^n)$ članova u (5.33) i (5.49), no najčešće su prvi članovi različiti od nule dovoljno točni.

5.5 Uniformna aproksimacija

Sada kada imamo unutarnja i vanjska rješenja, možemo dobiti kompozitna rješenja koja vrijede za sve $t \geq 0$, metodom opisanom u [10, str. 149]. Zbrojimo član unutarnjeg rješenja s odgovarajućim članom vanjskog rješenja i oduzmemo njihovu preklapajuću vrijednost, tj. limes unutarnjeg rješenja kad $\tau \rightarrow \infty$, što je isto kao i limes vanjskih rješenja kad $T \rightarrow 0$.

Na primjer, unutarnje rješenje za s je $s^{(0)}(\tau) = 1$. Vanjsko rješenje u slučaju $\phi = O(\varepsilon)$ je $s_{(0)}(T) = e^{-\frac{T}{1+p}}$. Budući da je preklapajuća vrijednost jednaka:

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} s^{(0)}(\tau) = 1 = \lim_{T \rightarrow 0} s_{(0)}(T),$$

kompozitno rješenje je dano sa:

$$s_{\text{comp}}^0(t) = s^{(0)}(\tau) + s_{(0)}(T) - 1 = e^{-\frac{T}{1+p}} = e^{-\frac{t}{1+p}}, \quad (5.66)$$

kada je $\phi = O(\varepsilon)$, gdje smo koristili (5.23).

Čineći isto za ostala rješenja, dobivamo dva skupa kompozitnih rješenja, jedan za prvi i jedan za drugi slučaj, koja vrijede za sve $t \geq 0$.

Koristeći tablicu 5.1, za prvi slučaj dobivamo sljedeća rješenja:

Prvi slučaj			
	Unutarnje rješenje u τ	Vanjsko rješenje u T	Preklapajuća vrijednost
s^0	1	$\frac{1-\beta}{1-\beta e^{\frac{\beta-1}{\beta(1+\rho)}T}}$	1
e_i^0	0	$\frac{1-s_{(0)}(T)}{\beta}$	0
x^0	$1 - e^{-\tau}$	$s_{(0)}(1 - e_{i(0)})$	1
y^0	0	0	0
y^1	$\frac{p}{1+\rho} \left(\frac{1-e^{-\psi\tau}}{\psi} + \frac{e^{-\psi\tau}-e^{-\tau}}{\psi-1} \right)$	$\frac{p}{\psi(1+\rho)} s_{(0)}(1 - e_{i(0)})$	$\frac{p}{\psi(1+\rho)}$

 Tablica 5.1: Rezultati za prvi slučaj ($\rho = O(1)$, $\phi = O(1)$, $\psi = O(1)$).

$$\begin{aligned}
 s_{\text{comp}}^0(t) &= \frac{1-\beta}{1-\beta e^{\frac{\beta-1}{\beta(1+\rho)s}t}}, & e_{i\text{comp}}^0(t) &= \frac{1-s_{\text{comp}}^0}{\beta}, \\
 x_{\text{comp}}^0(t) &= s_{\text{comp}}^0(1 - e_{i\text{comp}}^0) - e^{-\frac{t}{i_c}}, & y_{\text{comp}}^0(t) &= 0, \\
 \varepsilon y_{\text{comp}}^1(t) &= \frac{\sigma}{\psi(1+\rho)} \left(\frac{e^{-\frac{\psi t}{i_c}} - \psi e^{-\frac{t}{i_c}}}{\psi-1} + s_{\text{comp}}^0(1 - e_{i\text{comp}}^0) \right).
 \end{aligned} \tag{5.67}$$

Kako bismo dobili rješenja koja vrijede za sve $t \geq 0$ za drugi slučaj, koristimo podatke sažete u tablici 5.2. Dobivamo:

$$\begin{aligned}
 s_{\text{comp}}^0(t) &= e^{-\frac{t}{i_s}}, & e_{i\text{comp}}^0(t) &= 0, & \varepsilon e_{i\text{comp}}^1(t) &= \frac{1}{\beta} (1 - e^{-\frac{t}{i_s}}), \\
 x_{\text{comp}}^0(t) &= s_{\text{comp}}^0 - e^{-\frac{t}{i_c}}, & y_{\text{comp}}^0(t) &= 0, \\
 \varepsilon y_{\text{comp}}^1(t) &= \frac{\sigma}{\psi(1+\rho)} \left(\frac{e^{-\frac{\psi t}{i_c}} - \psi e^{-\frac{t}{i_c}}}{\psi-1} + s_{\text{comp}}^0 \right).
 \end{aligned} \tag{5.68}$$

Drugi slučaj			
	Unutarnje rješenje u τ	Vanjsko rješenje u T	Preklapajuća vrijednost
s^0	1	$e^{-\frac{T}{1+\rho}}$	1
e_i^0	0	0	0
e_i^1	0	$\frac{pq}{\psi} \left(1 - e^{-\frac{T}{1+\rho}}\right)$	0
x^0	$1 - e^{-\tau}$	$s_{(0)}(1 - e_{i(0)})$	1
y^0	0	0	0
y^1	$\frac{p}{1+\rho} \left(\frac{1-e^{-\psi\tau}}{\psi} + \frac{e^{-\psi\tau}-e^{-\tau}}{\psi-1}\right)$	$\frac{p}{\psi(1+\rho)} s_{(0)}(1 - e_{i(0)})$	$\frac{p}{\psi(1+\rho)}$

 Tablica 5.2: Rezultati za drugi slučaj ($\rho = O(1)$, $\phi = O(\varepsilon)$, $\psi = O(1)$).

Postoje dva načina na koje reakcija dana sa (5.1) može završiti. Obično je sav enzim inaktiviran, a samo dio supstrata pretvoren je u produkt ili je da je sav supstrat potrošen i samo dio enzima je inaktiviran. Važan parametar koji razlikuje prvi od drugog slučaja je $\beta = \frac{\psi}{\phi p}$, faktor koji određuje je li supstrat iscrpljen prije nego što je sav enzim inaktiviran. Kada je $\beta < 1$, vrijedi prvi slučaj ($\rho = O(1)$, $\phi = O(1)$, $\psi = O(1)$), a kada je $\beta > 1$, vrijedi drugi slučaj ($\rho = O(1)$, $\phi = O(\varepsilon)$, $\psi = O(1)$).

Gornji rezultati pokazuju da za $\beta < 1$, iz prvog slučaja (5.67) slijedi $e_i \rightarrow 1$ kad $t \rightarrow \infty$. Dakle, sav enzim je inaktiviran. Slično, kada je $\beta > 1$, koristeći drugi slučaj (5.68), vrijedi $s \rightarrow 0$ kad $t \rightarrow \infty$, točnije, sav supstrat je iscrpljen.

Koristeći (5.21), zapišimo β u terminima originalnih parametara. Slijedi:

$$\beta = \left(1 + \frac{k_3}{k_4}\right) \frac{1}{p},$$

no iz (5.35) zapravo vrijedi

$$\beta = \left(1 + \frac{k_3}{k_4}\right) \frac{e_0}{s_0}, \quad (5.69)$$

gdje je $\frac{k_3}{k_4}$ omjer raspodjele (iz eng. *partition ratio*) između katalitičkog i inaktivacijskog puta. Koristeći činjenicu da je $\frac{e_0}{s_0}$ reda $O(1)$, gornji zaključci imaju smisla.

Bibliografija

- [1] *Using the F-test to Compare Two Models*, <https://sites.duke.edu/bossbackup/files/2013/02/FTestTutorial.pdf>, (ožujak 2023.).
- [2] I. Filipović i S. Lipanović, *Opća i anorganska kemija*, sv. 1, Školska Knjiga, 1988.
- [3] J. K. Hunter, *Asymptotic Analysis and Singular Perturbation Theory*, 2004, <https://www.math.ucdavis.edu/~hunter/notes/asy.pdf>, (travanj 2023.).
- [4] P. Kunštek i M. Radulović, *Obične diferencijalne jednadžbe*, 2023, https://web.math.pmf.unizg.hr/~mradul/Files/ODJ_skripta___vje_be.pdf, (ožujak 2023.).
- [5] W. Liu, *Introduction to Modeling Biological Cellular Control Systems*, Springer, 2012.
- [6] M. Marušić, *Korelacija i regresija*, <https://web.math.pmf.unizg.hr/~rus/nastava/stat/SLAJD/7-korelacija.pdf>, (ožujak 2023.).
- [7] B. Mildner, *Mehanizmi djelovanja enzima i regulacija aktivnosti enzima*, https://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/14obk-p10-mehanizmi_djelovanja_enzima.pdf, (travanj 2023.).
- [8] ———, *Osnove biokemije, Enzimski kinetika*, https://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/14obk-p9-enzimska_kinetika.pdf, (travanj 2023.).
- [9] A. Mimica i M. Ninčević, *Statistika*, 2010, https://web.math.pmf.unizg.hr/nastava/stat/files/vjezbe_novo.pdf, (ožujak 2023.).
- [10] J. D. Murray, *Asymptotic Analysis*, Springer-Verlag, 1984.
- [11] ———, *Mathematical Biology I. An Introduction, Third Edition*, Springer, 2002.
- [12] L. A. Segel, *Modeling Dynamic Phenomena in Molecular and Cellular Biology*, Cambridge University Press, 1984.

- [13] L. A. Segel i Slemrod M., *The Quasi-Steady-State Assumption: A Case Study in Perturbation*, SIAM Review **31** (1989), br. 3, 446–477.

Sažetak

U ovome radu bavimo se enzimskom kinetikom. U prva dva poglavlja opisujemo zakon očuvanja mase i zakon djelovanja mase, dva zakona koja nam služe u izvođenju jednadžba brzine za tvari kemijskih reakcija.

U sljedećem poglavlju detaljno opisujemo Michaelis-Mentenovu kinetiku. Iz jednadžbe kemijske reakcije, primjenom gore spomenutih zakona, dolazimo do sustava običnih diferencijalnih jednadžbi pomoću kojeg vršimo daljne analize. Rješenje pronalazimo koristeći pretpostavku kvazistacionarnog stanja i postojanju dviju vremenskih skala. U nastavku provodimo usporedbu nelinearnog modela, služeći se Michaelis-Mentenovom jednadžbom, i linearnog modela, čiji se graf naziva Lineweaver-Burkov dijagram. Služeći se F-testom, zaključujemo da je nelinearni model statistički bolji od linearnog modela. Analiziramo i enzimsku reakciju koja uključuje enzim s dva aktivna mjesta, ponovno koristeći aproksimaciju kvazistacionarnog stanja.

U zadnja dva poglavlja, bavimo se metodom singularnih perturbacija. Budući da modeli ovise o malom parametru, ideja je doći do vanjskog rješenja (rješenje u vremenu koje nije u neposrednoj blizini nule) i do unutarnjeg rješenja (rješenje blizu nule) te ih uskladiti i time dobiti uniformno važeću aproksimaciju rješenja na cijeloj domeni. Isti postupak provodimo i kod suicidalne inhibicije, gdje je račun malo složeniji i gdje koristimo pretpostavku da početna koncentracija enzima nije malena u odnosu na početnu koncentraciju supstrata. Prije same bezdimenzionalizacije, procjenjujemo dvije vremenske skale koje pritom koristimo. Budući da razlikujemo dva načina na koje reakcija može završiti, očekujemo i dva različita rješenja. Parametar, u tekstu označen sa β , je onaj koji razlikuje dva rješenja: ili je sav enzim inaktiviran ili je sav supstrat potrošen.

Summary

In this paper, we deal with enzyme kinetics. In the first two chapters, we describe the law of mass balance and the law of mass action, two laws that we use in deriving rate equations for substances in chemical reactions.

In the next chapter, we describe Michaelis-Menten kinetics in detail. From the equation of the chemical reaction, by applying the above-mentioned laws, we arrive at a system of ordinary differential equations with which we perform further analyses. We find the solution using the quasi-steady-state assumption and the existence of two timescales. In the following, we compare the nonlinear model, using the Michaelis-Menten equation, and the linear model, whose graph is called the Lineweaver-Burk diagram. Using the F-test, we conclude that the nonlinear model is statistically better than the linear model. We also analyze an enzymatic reaction involving an enzyme with two active sites, again using the quasi-steady-state approximation.

In the last two chapters, we deal with the method of singular perturbations. Since the models depend on a small parameter, the idea is to find an outer solution (a solution in time that is not in the immediate neighbourhood of zero) and an inner solution (a solution near zero) and match them and thereby obtain a uniformly valid approximation of the solution on the entire domain. We carry out the same procedure for suicide inhibition, where the calculation is a little more complex and where we use the assumption that the initial concentration of the enzyme is not small compared to the initial concentration of the substrate. Before the nondimensionalisation, we estimate the two timescales that we use. Since we distinguish two ways in which the reaction can end, we also expect two different solutions. The parameter, denoted by β in the text, is the one that distinguishes two solutions: either all the enzyme is inactivated or all the substrate is exhausted.

Životopis

Rođena sam 28. svibnja 1997. godine u Zagrebu. Obrazovanje započinjem 2004. godine u Osnovnoj školi Bogumila Tonija u Samoboru. Nakon završetka osnovne škole, upisujem V. gimnaziju u Zagrebu. Godine 2016. nastavljam školovanje na preddiplomskom studiju matematike na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, nakon čega upisujem diplomski studij Primijenjena matematika na istom fakultetu.