

А.С. СВЕРСТЮК

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського

В.М. АРХИПОВА, К.В. СТЕПУРСЬКА

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України

В.П. МАРЦЕНЮК

Університет в Бельсько-Бялій, Польща

І.В. БОЙКО

Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя

С.В. ДЗЯДЕВИЧ

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України

РОЗРОБКА ТА ВЕРИФІКАЦІЯ МАТЕМАТИЧНОЇ МОДЕЛІ ПОТЕНЦІОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРУ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ α -ЧАКОНІНУ

Стаття присвячена проблемі розробки нових математичних і обчислювальних засобів для отримання та аналізу результатів чисельного моделювання під час проектування біосенсорів. У роботі розроблено математичну модель потенціометричного біосенсору на основі зворотного інгібування бутирихолінестерази для визначення α -чаконіну. Математична модель досліджуваного біосенсору представлена системою семи лінійних диференціальних рівнянь, які описують динаміку біохімічних реакцій під час повного циклу вимірювання концентрації α -чаконіну. При цьому кожне із диференціальних рівнянь описує концентрації ферменту, субстрату, інгібітору, продукту, фермент-субстратного, фермент-інгібіторного, фермент-субстрат-інгібіторного комплексів залежно від часу. Математична модель біосенсору для визначення α -чаконіну розв'язана чисельно за допомогою програмного забезпечення Wolfram Mathematica. Вхідними параметрами системи є початкові концентрації ферменту, субстрату та інгібітору ($5,8 \times 10^{-4}$ М бутирихолінестерази, 1×10^{-3} М бутирихолін хлориду та 1×10^{-6} ; 2×10^{-6} ; 5×10^{-6} ; 10×10^{-6} М α -чаконіну відповідно), які є експериментально розрахованими. Для верифікації моделі та порівняння з експериментальним відгуком використано існуючий потенціометричний біосенсор на основі іммобілізованої бутирихолінестерази. Прямі та зворотні константи швидкостей ферментативних реакцій підібрані таким чином, щоб результат чисельного моделювання максимально відповідав експериментальному відгуку досліджуваного біосенсору. За результатами порівняльного аналізу встановлено залежність відхилення змодельованого та експериментального відгуків біосенсору для визначення α -чаконіну. Встановлено, що абсолютна похибка не перевищує 0,045 ум. од. На основі отриманих результатів чисельного моделювання зроблено висновок, що розроблена кінетична модель потенціометричного біосенсору дає змогу адекватно визначати усі основні складові компартментних компонентів біохімічних реакцій при вимірюванні концентрації α -чаконіну.

Ключові слова: математична модель, біосенсор, α -чаконін, чисельне моделювання

A.S. Sverstiuk

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University

V.M. ARKHYPOVA, K.V. STEPURSKA

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine

V.P. Martseniuk

University of Bielsko-Biala, Poland

I.V. Boyko

Ternopil Ivan Puluj National Technical University

S.V. Dzyadevych

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine

DEVELOPMENT AND VERIFICATION OF THE MATHEMATICAL MODEL OF THE POTENTIOMETRIC BIOSENSOR FOR DETERMINATION OF α -CHACONINE

The article is devoted to the problem of developing new mathematical and computational tools for obtaining and analyzing the results of numerical simulation in the design of biosensors. A mathematical model of a potentiometric biosensor based on the reverse inhibition of butyrylcholinesterase to determine α -chaconine is developed. The mathematical model of the biosensor under study is represented by a system of seven linear differential equations that describe the dynamics of biochemical reactions during a complete cycle of measurement of α -chaconine concentration. In this case, each of the differential equations describes the concentration of enzyme, substrate, inhibitor, product, enzyme-substrate, enzyme-inhibitory, enzyme-substrate-inhibitory complexes depending on time. A mathematical model of the biosensor for the determination of α -chaconine is numerically solved using Wolfram Mathematic software. The initial parameters of the system are the initial concentrations of the enzyme, substrate and inhibitor (5.8×10^{-4} M butyrylcholinesterase, 1×10^{-3} M butyrylcholine chloride and 1×10^{-6} ; 2×10^{-6} ; 5×10^{-6} ; 10×10^{-6} M α -chaconine, respectively), which are experimentally calculated. An existing potentiometric biosensor based on immobilized butyrylcholinesterase was used to verify the model and compare it with the experimental response. The forward and reverse rate constants of the enzymatic reactions are chosen so that the result of the numerical simulation is as consistent as possible with the experimental response of the biosensor under study. According to the results of the comparative analysis, the dependence of the deviation of the simulated and experimental responses of the biosensor to determine α -chaconine is established. It is found that the absolute error does not exceed 0.045 rel. units. Based on the results of numerical simulation, it is concluded that the developed kinetic model of the potentiometric biosensor allows to adequately determine all the main components of the compartment components of biochemical reactions when measuring the concentration of α -chaconine.

Key words: mathematical model, biosensor, α -chaconine, numerical modelling.

Вступ. Невпинний науковий прогрес в найбільш важливих напрямках розвитку та збереження земної цивілізації сприяє вирішенню багатьох завдань, що постають перед суспільством в третьому тисячолітті. Людство повсякчас відкриває для себе нові можливості, але також зустрічається і з новими викликами, серед яких вирізняються проблеми в боротьбі з новими видами захворювань, в збереженні довкілля та в протистоянні терористичним загрозам. В цьому розумінні значний науковий та практичний інтерес становлять дослідження в біосенсоріці. Серед сучасних наукових методик особливе місце займають біосенсори, що пропонують величезний потенціал для виявлення широкого спектру аналітів у медичній галузі, харчовій промисловості, моніторинзі навколишнього середовища, безпеці та обороні.

Біосенсор – це компактний аналітичний пристрій, що містить біологічно чутливий елемент, інтегрований у фізико-хімічний перетворювач, завданням якого є отримання оптичних або електронних сигналів, що відповідають концентрації аналізованої проби. Вплив на суспільство внаслідок наявності таких систем є величезним, тому вивчення будь-якої стратегії, яка могла б скоротити час розробки й витрат, та розкрити альтернативні конструкції, є надзвичайно важливим. Зокрема, математичне моделювання є потужним інструментом для наукового аналізу і прогнозування.

Основні компоненти біосенсорів базуються на добре зрозумілих фізичних процесах (таких як дифузія, конвективний потік, енергія та масообмін), а також на основі хімічних та біологічних реакцій, які піддаються математичному моделюванню з використанням звичайних диференціальних рівнянь та диференціальних рівнянь в частинних похідних.

Метою даної роботи є розробка, дослідження стійкості та проведення верифікації математичної моделі потенціометричного біосенсора на основі зворотного інгібування бутирихолінестерази для визначення α -чаконіну.

Аналіз останніх досліджень. Останнім часом велика увага дослідників привернута питанням розробки та використання біосенсорів [1–10]. У [5–10] сформульовано основні задачі, які пов'язані з дослідженням стійкості в біосенсорах. Починаючи з сімдесятих років та до сьогодні, різні математичні моделі були розроблені та успішно застосовані для оптимізації роботи біосенсорів [11–13]. Протягом останніх десяти років використовуються математичні моделі для амперометричного електрода з іммобілізованим ферментом на основі нелінійних диференціальних рівнянь, які описують кінетику Міхаеліса-Ментена та дифузії [14, 15], а також математичну модель амперометричного та потенціометричного біосенсорів [16]. В цих моделях використовують метод гомотопічних збурень для вирішення системи рівнянь в умовах стаціонарності. У роботах [17, 18] описано математичні моделі амперометричних біосенсорів, в яких змінюючи вхідні параметри (такі як концентрація реагентів, кінетичні константи та товщина мембрани), покращена чутливість розроблених біосенсорів. В цих моделях для вирішення системи рівнянь використовували метод кінцевих різниць при стаціонарних та нестаціонарних умовах. Переважна більшість розроблених математичних моделей описують ферментні біосенсори для прямого визначення субстрату. На ряду з цим, останні роки спостерігається тенденція збільшення розробок біосенсорів на основі інгібіторного аналізу [19, 20]. Більшою мірою такі біосенсори використовуються в екологічному моніторингу для детектування токсичних речовин, таких як пестициди, іони важких металів, афлатоксини тощо [21, 22]. На сьогодні розроблено зовсім незначну кількість математичних моделей роботи біосенсорів такого типу. З них можна виділити математичну модель роботи глюкозооксидазного біосенсора для визначення іонів ртуті [23]. В цій моделі система рівнянь, що описує дифузію та ферментативні нелінійні реакції зв'язані з кінетикою Міхаеліса-Ментена, модифікована з урахуванням незворотного інгібування.

Дана робота присвячена розробці математичної моделі розробленого раніше бутирихолінестеразного біосенсора на основі іон-селективних польових транзисторах (ІСПТ) для інгібіторного визначення α -чаконіну – глікоалкалоїду картоплі [24]. Питання є вкрай актуальним, з огляду на те що α -чаконін разом з іншим глікоалкалоїдом α -соланіном є дуже цікавими об'єктами з біологічної точки зору завдяки їхньої токсичності та знаходженні у картоплі, як продукті харчування, через що картопля набуває гіркої присмаку. Вимірювання вмісту α -чаконіну та α -соланіну в картоплі проводять при виведенні нових сортів картоплі. Протягом останніх років проводяться наукові дослідження, за результатами яких можна зробити висновок, що від рівня глікоалкалоїдів залежать механізми опірності картоплі до хвороб та дії комах. Серед інших чинників, які впливають на рівень глікоалкалоїдів та можуть спричинити суттєве підвищення первинної його концентрації, слід зазначити кліматичні зміни, дію світла, механічні пошкодження під час збирання та зберігання картоплі [25]. Розроблені на сьогодні методи для визначення загального вмісту глікоалкалоїдів базуються на використанні колориметрії, високоефективної рідинної хроматографії, тонкошарової та газової хроматографії, радіоімунологічного аналізу. Перерахованим методам притаманні висока вартість, довготривалість та складність методик підготовки проб. З метою оптимізації та модифікації існуючих методів аналізу шкідливих речовин в картоплі, є доцільним створення простих, дешевих, високочутливих методів визначення глікоалкалоїдів на основі біосенсорів. При цьому, з метою економії часових та сировинних ресурсів (ферментів, субстратів та інгібіторів) доцільним та економічно вигідним є створення і дослідження адекватних математичних моделей біосенсорів для визначення глікоалкалоїдів (α -чаконіну, наприклад) з можливістю верифікації змодельованого відгуку, а також оцінювання величини похибки, відносно експериментальних даних.

Застосування математичного моделювання для оптимізації аналітичних характеристик біосенсору для визначення α -чаконіну в подальшому дасть змогу звести до мінімуму проведення лабораторних

експериментів із токсичними та дороговартісними речовинами для підбору оптимальних концентрацій компонентів.

Матеріали і методи. Потенціометричний біосенсор на основі бутирилхолінестерази.

Для виготовлення біоселективної мембрани використовували фермент бутирилхолінестераза (БуХЕ) сироватки крові коня з активністю 13 од. акт/мг фірми Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина), сироватковий альбумін бика (БСА, фракція V) (Sigma-Aldrich Chemie, Німеччина), 50% водний розчин глутарового альдегіду (ГА) («ч.д.а.»Sigma-Aldrich Chemie, Німеччина), гліцерол (чистота 99%, Sigma-Aldrich Chemie, Німеччина).

Як субстрат використовували бутирилхолін хлорид (БуХ, чистота 99%) фірми Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина). В якості інгібітора використовувався кристалічний глікоалкалоїд α -чаконін (95 % чистоти), виробництва фірми "Sigma-Aldrich Chemie GmbH" (Steinheim, Germany).

Фосфатний буфер був виготовлений з дідіортофосфату калію (K_2HPO_4) (чистота 98.5%, Helicon) та гідроксиду натрію (NaOH) (чистота 99%, Helicon).

Потенціометричні перетворювачі були вироблені в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України. Датчик складається з двох ідентичних пар транзисторів р-канального типу ($\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$ -ISFETs), розташованих на монокристалічній кремнієвій підкладці загальною площею 8×8 мм. Один транзистор є робочим електродом, а другий використовується як електрод порівняння. Сенсорні елементи, що використовувались в роботі, демонстрували рН-чутливість приблизно 40 мВ/рН, забезпечуючи тим самим рН-чутливість струму в каналі транзистора приблизно 15–20 мкА/рН. Гранична напруга рН-ІПТ складала близько 2,5 В. Виміри проводилися з початкової величини струму в каналі близько 500 мкА, напруга витік-стік складала приблизно 2 В.

Виміри проводилися за допомогою портативного пристрою, розробленого та виготовленого в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН. Пристрій працює шляхом вимірювання поверхневого потенціалу на затворі транзистора з використанням вимірювальної схеми з негативним зворотнім зв'язком, що підтримує постійну величину струму в каналі польового транзистора 0,3 мА при постійній напрузі витік-стік близько 2 В. Вихідний сигнал відповідає потенціалу затвора. Інформація від датчиків імпортується в комп'ютер та обробляється за допомогою програмного забезпечення MSW_32 (Інститут фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України).

Потенціометричні вимірювання проводилися після розміщення перетворювачів у вимірювальній комірці, заповненої 5мМ фосфатним буфером, рН 7,0. Розчин постійно перемішувався. Всі експерименти проводилися в двох або трьох серіях повторів. Неспецифічні зміни в вихідному сигналі, пов'язані з коливаннями температури, рН середовища та іншими факторами були усунені за рахунок використання диференціального режиму вимірювання.

Після стабілізації диференціального вихідного сигналу в вимірювальну комірку додавали певну аліквоту концентрованого розчину субстрату, а після стабілізації відгуку на субстрат, вводили необхідні обсяги концентрованих розчинів α -чаконіну та вимірювали рівень інгібування.

В якості потенціометричних перетворювачів використовували пару ідентичних іон-селективних польових транзисторів р-типу з чутливістю 35–40 мкА / рН, розміщених на одному кристалі.

2.2. Математичне моделювання біосенсора для визначення α -чаконіну.

Система диференціальних рівнянь, яка описує математичну модель функціонування розробленого біосенсора для визначення α -чаконіну, розв'язувалась чисельно за допомогою програмного забезпечення Wolfram Mathematica 10. Також у цій програмі були побудовані модельні відгуки біосенсора, які порівняно із експериментальними даними.

При інгібіторному визначенні α -чаконіну за допомогою БуХЕ-біосенсора на основі іон-селективних польових транзисторів функціонування біосенсора умовно можна поділити на наступні етапи (рис. 1): отримання базової лінії (0), відгук на робочу концентрацію БуХ як субстрату (I), та відгук на α -чаконін, як інгібітор (II).

Функціонування БуХЕ-біосенсора ґрунтується на ферментативній реакції, яка відбувається у біоселективній мембрані.

Під час біохімічної реакції генеруються протони, що призводить до зміни рН всередині мембрани, тому доцільним є використання потенціометричного біосенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів.

На нульовому етапі, коли біоселективна мембрана знаходиться в контакті тільки з робочим буфером, в мембрані не відбувається ніяких реакцій, а сигнал біосенсора відображає «базову лінію» (рис. 1, етап 0). На першому етапі відбувається ферментативна реакція за участю субстрату, який додають у робочу комірку. В результаті цієї реакції утворюється продукт (протон), в результаті чого змінюється локальна концентрація іонів в приелектродній області, що реєструється потенціометричним перетворювачем. Ця зміна візуалізується у вигляді відгуку на субстрат (рис.1, етап I). На другому етапі роботи біосенсора, при додаванні у вимірювальну комірку α -чаконіну, який є зворотнім інгібітором БуХЕ, відбувається реакція

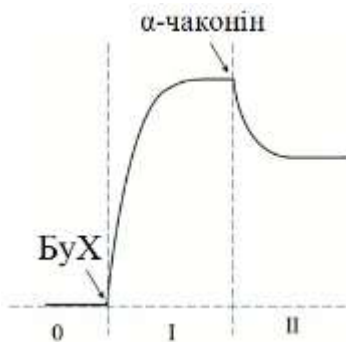


Рис. 1. Схематичне зображення роботи БуХЕ-біосенсору на основі ІСПТ при інгібіторному визначенні α -чаконіну

інгібування ферменту. За літературними даними [25] механізм інгібування БуХЕ α -чаконіном відносять до змішаного типу інгібування, який можна схематично зобразити на рис. 2:

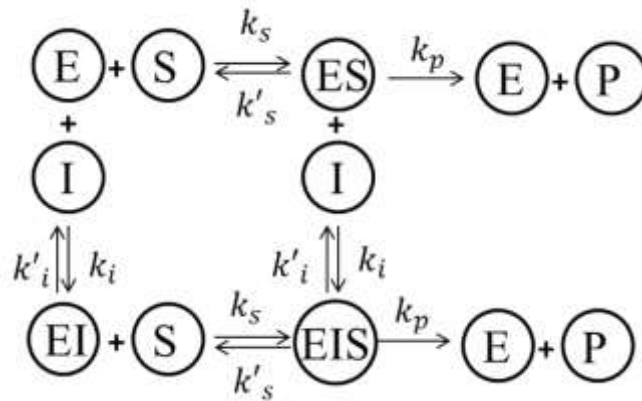


Рис. 2. Схематичне зображення ферментативної реакції у потенціометричному біосенсорі на основі БуХЕ-ІСПТ при інгібіторному визначенні α -чаконіну (E – фермент, S – субстрат, I – інгібітор)

На рис. 2 k_s та k'_s – константи швидкостей прямої та зворотної реакції утворення комплексу (ES), k_p – константа швидкості U_p утворення продукту (P), а k_i та k'_i – константи швидкостей прямої та зворотної реакції утворення комплексу (EI).

Математичну модель ферментативної реакції у потенціометричному біосенсорі на основі БуХЕ-ІСПТ при інгібіторному визначенні α -чаконіну можна описати наступною системою диференціальних рівнянь:

$$\frac{dn_e(t)}{dt} = -k_s n_e(t) n_s(t) - k_i n_e(t) n_i(t) + k'_s n_{es}(t) + k'_i n_{ei}(t) + k_p n_{es}(t) \quad (1)$$

$$\frac{dn_s(t)}{dt} = -k_s n_e(t) n_s(t) - \alpha k_s n_{ei}(t) n_s(t) + k'_s n_{es}(t) + \alpha k'_s n_{esi}(t) \quad (2)$$

$$\frac{dn_{es}(t)}{dt} = k_s n_e(t) n_s(t) - k'_s n_{es}(t) - \alpha k_i n_{es}(t) n_i(t) + \alpha k'_i n_{esi}(t) - k_p n_{es}(t) \quad (3)$$

$$\frac{dn_i(t)}{dt} = -k_i n_e(t) n_i(t) - \alpha k_i n_{es}(t) n_i(t) + k'_i n_{ei}(t) + \alpha k'_i n_{esi}(t) \quad (4)$$

$$\frac{dn_{ei}(t)}{dt} = k_i n_e(t) n_i(t) - k'_i n_{ei}(t) - \alpha k_s n_{ei}(t) n_s(t) + \alpha k'_s n_{esi}(t) \quad (5)$$

$$\frac{dn_{esi}(t)}{dt} = \alpha k_i n_{es}(t) n_i(t) - \alpha k'_i n_{esi}(t) + \alpha k_s n_{ei}(t) n_s(t) - \alpha k'_s n_{esi}(t) \quad (6)$$

$$\frac{dn_p(t)}{dt} = k_p n_{es}(t) - k_w n_p(t) \quad (7)$$

де k_s , k'_s , k_i , k'_i , k_p – відповідні константи швидкості реакцій утворення комплексів; k_w – константа вимивання; α – константа, чисельне значення якої визначає інгібування або активування ензиму; $n_e(t)$, $n_s(t)$, $n_i(t)$, $n_p(t)$, $n_{es}(t)$, $n_{ei}(t)$, $n_{esi}(t)$ – концентрації ензиму, субстрату, інгібітору, продукту, а також ензим-субстратного, ензим-інгібіторного та ензим-субстрат-інгібіторного комплексів відповідно, які змінюються з часом. Зміна в часі концентрації продукту

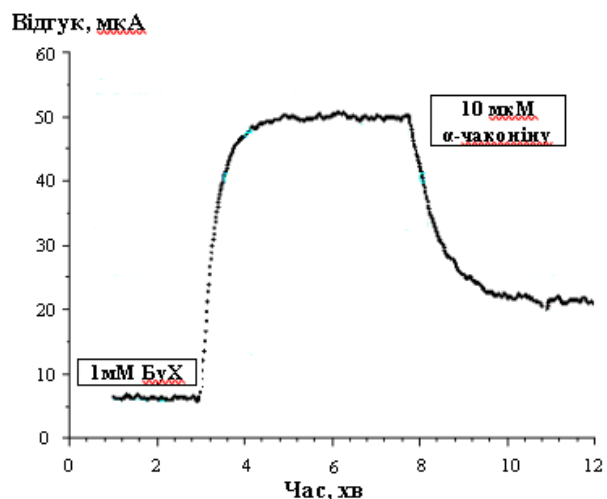


Рис. 3. Експериментальний відгук потенціометричного біосенсора на додавання в експериментальну комірку бутирилхолін хлориду та подальше додавання α -чаконіну

$n_p(t)$ прямо пропорційна відгуку біосенсора.

Враховується також, що в системі зберігається постійна загальна концентрація ферменту E_0 , таким чином в будь-який момент часу сума концентрацій вільного (E) та зв'язаного (ES), (EI), (ESI) ферменту дорівнює $(E) + (ES) + (EI) + (ESI) = E_0$.

Результати та обговорення. Спочатку за результатами експерименту було отримано відгук бутирилхолінестеразного біосенсора на додавання в комірку субстрату бутирилхолін хлориду та подальше додавання α -чаконіну, який наведений на рис. 3. Даний експериментальний відгук отриманий при концентраціях ензиму $5,8 \times 10^{-4}$ моль/л, субстрату 1×10^{-3} моль/л, інгібітору 10×10^{-6} моль/л.

Для моделювання роботи біосенсора, система (1–7) була розв'язана за допомогою програмного забезпечення Wolfram Mathematica та вбудованого NDSolve алгоритму.

На нульовому етапі моделювання задаються наступні початкові умови $n_s(0) = n_i(0) = n_{es}(0) = n_{ei}(0) = n_{esi}(0) = n_p(0) = 0$, тобто коли в системі немає субстрату та інгібітору, а лише вводиться початкова концентрація ензиму у робочій мембрані біосенсора. При заданих початкових умовах та заданих параметрах знаходяться розв'язки системи.

На першому етапі система розв'язується при початкових умовах, які задаються розв'язками системи нульового етапу, а також задається початкова концентрація субстрату, що додається у робочу комірку.

У таблиці 1 наведено параметри математичної моделі біосенсора для визначення α -чаконіну, які були використані при чисельному моделюванні, використовуючи систему диференціальних рівнянь (1–7).

Таблиця 1

Параметри математичної моделі біосенсора для визначення α -чаконіну, які були використані для її чисельного моделювання

Позначення	Числові значення	Одиниці вимірювання
n_e n_e	$5,8 \times 10^{-4}$	моль/л
n_s n_s	1×10^{-3}	моль/л
n_{i_1}	1×10^{-6}	моль/л
n_{i_2}	2×10^{-6}	моль/л
n_{i_3}	5×10^{-6}	моль/л
n_{i_4}	10×10^{-6}	моль/л
k_s k_s	600	л/(моль*с)
k_i	1.3×10^2	л/(моль*с)
k'_s k'_s	20.23	1/с
k'_i k'_i	0.0167	1/с
k_p	0.05	1/с
k_w	0.168	1/с
α	0.3	-

Для дослідження стійкості системи (1–7) потрібно визначити стани рівноваги моделі біосенсора для визначення α -чаконіну у вигляді розв'язку наступної системи алгебраїчних рівнянь.

$$-k_s n_e^* n_s^* - k_i n_e^* n_i^* + k'_s n_{es}^* + k'_i n_{ei}^* + k_p n_{es}^* = 0 \tag{8}$$

$$-k_s n_e^* n_s^* - \alpha k_s n_{ei}^* n_s^* + k'_s n_{es}^* + \alpha k'_s n_{esi}^* = 0 \tag{9}$$

$$k_s n_e^* n_s^* - k'_s n_{es}^* - \alpha k_i n_{es}^* n_i^* + \alpha k'_i n_{esi}^* - k_p n_{es}^* = 0 \tag{10}$$

$$-k_i n_e^* n_i^* - \alpha k_i n_{es}^* n_i^* + k'_i n_{ei}^* + \alpha k'_i n_{esi}^* = 0 \tag{11}$$

$$k_i n_e^* n_i^* - k'_i n_{ei}^* - \alpha k_s n_{ei}^* n_s^* + \alpha k'_s n_{esi}^* = 0 \tag{12}$$

$$\alpha k_i n_{es}^* n_i^* - \alpha k'_i n_{esi}^* + \alpha k_s n_{ei}^* n_s^* - \alpha k'_s n_{esi}^* = 0 \tag{13}$$

$$k_p n_{es}^* - k_w n_p^* = 0 \tag{14}$$

Зрозуміло, що система (8–14) має тривіальний розв’язок. Нетривіальні розв’язки можна обчислити чисельно. Для значень параметрів таблиці 1 отримуємо стаціонарний стан моделі (1–7), яка представлена у вигляді таблиці 2.

Таблиця 2

Значення параметрів стаціонарного стану моделі біосенсора для визначення α -чаконіну

Позначення	Числові значення	Одиниці вимірювання
n_e^*	$1,415 \cdot 10^{-7}$	моль/л
n_s^*	$4 \cdot 10^{-3}$	моль/л
n_{es}^*	$1,129 \cdot 10^{-6}$	моль/л
n_i^*	$1,27 \cdot 10^{-6}$	моль/л
n_{ei}^*	$2,146 \cdot 10^{-7}$	моль/л
n_{esi}^*	$1,715 \cdot 10^{-6}$	моль/л
n_p^*	$3,977 \cdot 10^{-8}$	моль/л

Дослідження стійкості виконується на основі лінійної моделі

$$\frac{dx(t)}{dt} = J(x(t))|_{x(t)=n^*} x(t), \quad x(t) \in R^7, \quad t \geq 0,$$

де $J(x(t))$ є Якобіаном системи (1)–(7), який можна записати у вигляді:

$$J(n(t)) = \begin{bmatrix} -k_s n_s(t) - k_i n_i(t) & -k_s n_e(t) & k'_s + k_p & -k_i n_e(t) & k'_i & 0 & 0 \\ -k_s n_s(t) & -k_s n_e(t) - a k_s n_{ei}(t) & k'_s & 0 & -a k_s n_s(t) & a k'_s & 0 \\ k_s n_s(t) & k_s n_e(t) & -k'_s - a k_i n_i(t) - k_p & a k_i n_{es}(t) & 0 & a k'_i & 0 \\ -k_i n_i(t) & 0 & -a k_i n_i(t) & -k_i n_e(t) - a k_i n_{es}(t) & k'_i & a k'_i & 0 \\ k_i n_i(t) & -a k_s n_{ei}(t) & 0 & k_i n_e(t) & -k'_i - a k_s n_s(t) & a k'_s & 0 \\ 0 & a k_s n_{ei}(t) & a k_i n_i(t) & a k_i n_{es}(t) & a k_s n_s(t) & -a k'_i - a k'_s & 0 \\ 0 & 0 & k_p & 0 & 0 & 0 & -k_w \end{bmatrix}$$

Для значень параметрів таблиці 1 проведено наступні обчислення

$$J(n(t))|_{n(t)=n^*} = \begin{bmatrix} -1.507978e + 02 & -0.12077307 4 & 2.505000e + 01 & -0.04830923 & 0.01670 & 0.00000 & 0.000 \\ -1.507948e + 02 & -0.12510957 0 & 2.500000e + 01 & 0.00000000 & -30.15896 & 5.00000 & 0.000 \\ 1.507948e + 02 & 0.12077307 4 & -2.505060e + 01 & 0.05816714 & 0.00000 & 0.00334 & 0.000 \\ -3.001462e - 03 & 0.00000000 0 & -6.002924e - 04 & -0.10647636 & 0.01670 & 0.00334 & 0.000 \\ 3.001462e - 03 & -0.00433649 6 & 0.000000e + 00 & 0.04830923 & -30.17566 & 5.00000 & 0.000 \\ 0.000000e + 00 & 0.00433649 6 & 6.002924e - 04 & 0.05816714 & 30.15896 & -5.00334 & 0.000 \\ 0.000000e + 00 & 0.00000000 0 & 5.000000e - 02 & 0.00000000 & 0.00000 & 0.00000 & -0.142 \end{bmatrix}$$

Отримано всі власні значення $J(n(t))|_{n(t)=n^*}$ з від’ємною дійсною частиною, а саме: $\lambda_1 = -1.759682e + 02$, $\lambda_2 = -3.517811e + 01$, $\lambda_3 = -1.420000e - 01$, $\lambda_4 = -1.116629e - 01$, $\lambda_5 = -9.815916e - 04$, $\lambda_6 = -3.437626e - 05$, $\lambda_7 = -3.865944e - 15$.

Отже, використовуючи теорему Гробмана-Хартмана [26], можна зробити висновок, що стаціонарний стан n^* системи (8)–(14) при значеннях параметрів з таблиці 1 є локально асимптотично стійкий.

На другому етапі моделюється відгук на інгібітор, при підстановці попередніх розв’язків та початкових концентрацій інгібітору $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $2 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $10 \cdot 10^{-6}$ моль/л, які відомі за умовами експерименту на основі параметрів таблиці 1 при різних концентрацій інгібітору, які зображені на рис. 4.

Аналізуючи результати чисельного моделювання,

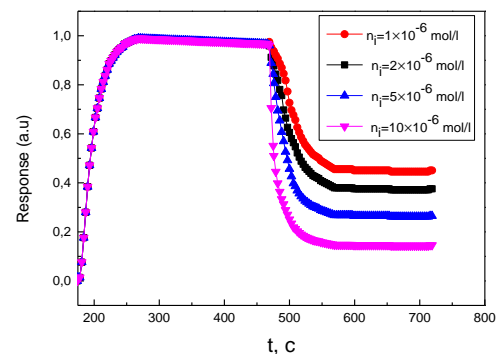


Рис. 4. Результати чисельного моделювання відгуку біосенсора для визначення α -чаконіну

отримані на рис. 4, можна зробити висновок, що чим вище концентрація інгібітора, тим менша амплітуда відгуку моделі досліджуваного біосенсора. Модельовані реакції біосенсора при різних концентраціях інгібітора повністю відповідають принципу інгібування.

Верифікація математичної моделі біосенсора для визначення α -чаконіну. Біохімічні константи швидкості реакції k важко отримати прямо з експерименту. В даному дослідженні ці константи були підібрані таким чином, щоб змодельований відгук співпадав із експериментальними відгуками. Встановлено, що стабільна робота біосенсора (при заданих концентрація ензиму, субстрату та інгібітору, згідно таблиці 1) досягається при обмеженому балансі між параметрами k . В нашому випадку взаємодія інгібітору з ензимом сильніша, ніж взаємодія субстрату з ензимом приблизно в 100 раз ($k_i = 100k_s$). Швидкість дисоціації комплексів (EI) і (ES) набагато менша, ніж швидкість їх формування ($k'_i = 10^{-4}k_i, k'_s = 0.1k_s$).

За результатами детального дослідження вхідних параметрів системи, було проведено їх підбір таким чином, щоб змодельований відгук досліджуваного біосенсора максимально співпадав із експериментальним. Числові значення такого моделювання наведено в таблиці 1, а результат верифікації математичної моделі біосенсора для визначення α -чаконіну та похибки моделювання наведено на рис. 5.

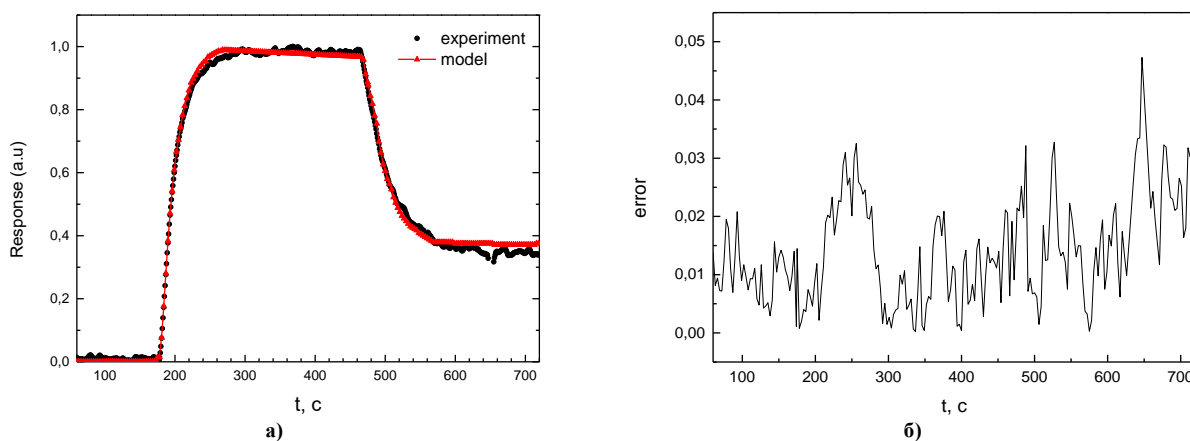


Рис. 5. Результат порівняння змодельованого та експериментального відгуків біосенсора для визначення α -чаконіну (а) та абсолютної похибки моделювання (б)

За результатом верифікації результатів змодельованого та експериментального відгуків (рис. 5) отримано залежність зміни абсолютної похибки на етапах наявності ензиму ($t=0\dots180$ с), субстрату ($t=180\dots460$ с) та інгібітору ($t=460\dots700$ с). Максимальна похибка при наявності ензиму та субстрату становить 0,03 ум. од., що відповідає 3%. Максимальна похибка верифікації проявляється на ділянці стабілізації відгуку біосенсора на дію інгібітору та не перевищує 0,045 ум. од., що відповідає 4,5%. Формування максимальної похибки моделі в порівнянні з експериментальною кривою у вказаній області пояснюється особливостями роботи біосенсора при стабілізації його відгуку на дію інгібітору.

Висновки. Розроблено математичну модель роботи потенціометричного біосенсора на основі бутирилхолінестераза для інгібіторного визначення α -чаконіну. Встановлено аналітичні аспекти інгібування іммобілізованої бутирилхолінестерази α -чаконіном. Використовуючи новий підхід «метод ступеню інгібування», експериментально було встановлено тип інгібування іммобілізованого ензиму при аналізі α -чаконіну. Створена модель описує біохімічні реакції, що відбуваються в мембрані біосенсора під час вимірювання α -чаконіну у вигляді системи диференціальних рівнянь, яка чисельно розв'язана, використовуючи програмне забезпечення Wolfram Mathematica. Чисельне моделювання проводилося при початкових концентраціях ензиму, субстрату та інгібітору, які використовувалися при експериментальних дослідженнях. Фізичний зміст констант швидкостей формування комплексів був вивчений, ґрунтуючись на цьому були підібрані відповідні константи таким чином, щоб змодельований відгук максимально співпадав із експериментальним відгуком біосенсора. Підібрані константи були використанні для моделювання відгуків біосенсора на додавання субстратів та інгібіторів. Отримані результати чисельного моделювання є особливо актуальними при розробці нових біосенсорів та при роботі із токсичними речовинами.

Література

1. Mosinska L., Fabisiak K., Paprocki K., Kowalska M., Popielarski P., Szybowicz M., Stasiak A. Diamond as a transducer material for the production of biosensors. *Przemysl Chemiczny*. 2013. Vol. 92. No. 6. P. 919–923.
2. Adley C. Past, present and future of sensors in food production. *Foods*. 2014. Vol. 3. No. 3. P. 491–510, Aug. doi: 10.3390/foods3030491. URL: <https://doi.org/10.3390/foods3030491>.
3. Martsenyuk V.P., Klos-Witkowska A., Sverstiuk A.S. Study of classification of immunosensors from

viewpoint of medical tasks. *Medical informatics and engineering*. 2018. № 1(41). P. 13–19.

4. Martsenyuk V.P., Klos-Witkowska A., Sverstiuk A.S., Bihunyak T.V. On principles, methods and areas of medical and biological application of optical immunosensors. *Medical informatics and engineering*. 2018. № 2 (42). P. 28–36.

5. Martsenyuk V., Klos-Witkowska A., Sverstiuk A. Stability, bifurcation and transition to chaos in a model of immunosensor based on lattice differential equations with delay. *Electronic Journal of Qualitative Theory of Differential Equations*: No. 2018(27). P. 1–31.

6. Martsenyuk V.P., Andrushchak I.Ye., Zinko P.M., Sverstiuk A.S. On Application of Latticed Differential Equations with a Delay for Immunosensor Modeling. *Journal of Automation and Information Sciences*. 2018. Vol. 50(6). P. 55–65.

7. Martsenyuk V.P., Sverstiuk A.S., Andrushchak I.Ye. Approach to the Study of Global Asymptotic Stability of Lattice Differential Equations with Delay for Modeling of Immunosensors. *Journal of Automation and Information Sciences*. 2019. Vol. 48(8). P. 58–71.

8. Martsenyuk V., Sverstiuk A., Gvozdetska I. Using Differential Equations with Time Delay on a Hexagonal Lattice for Modeling Immunosensors. *Cybernetics and Systems Analysis*. 2019. Vol. 55 (4). P. 625–636.

9. Martsenyuk V.P., Klos-Witkowska A., Sverstiuk A.S. Stability, bifurcation and transition to chaos in a model of immunosensor based on lattice differential equations with delay. *Electronic Journal of Qualitative Theory of Differential Equations*. No. 2018(27). P. 1–31.

10. Martsenyuk V.P., Andrushchak I.Ye., Zinko P.M., Sverstiuk A.S. On Application of Latticed Differential Equations with a Delay for Immunosensor Modeling. *Journal of Automation and Information Sciences*. Vol. 50(6). 2018. P. 55–65.

11. Mell L.D., Maloy J.T. A model for the amperometric enzyme electrode obtained through digital simulation and applied to the immobilized glucose oxidase system. *Anal. Chem.* 1975. Vol. 47. No. 2. P. 299–307.

12. Gajovic N., Warsinke A., Huang T., Schulmeister T., Scheller F.W. Characterization and Mathematical Modeling of a Bionzyme Electrode for L-Malate with Cofactor Recycling. *Analytical Chemistry*. 1999. Vol. 71. No. 20. P. 4657–4662.

13. Romero M.R., Baruzzi A.M., Garay F. Mathematical modeling and experimental results of a sandwich-type amperometric biosensor. *Sensors Actuators, B Chemistry*. 2012. Vol. 162. No. 1. P. 284–291.

14. Loghambal S., Rajendran L. Mathematical modeling of diffusion and kinetics in amperometric immobilized enzyme electrodes. *Electrochimica Acta*. Vol. 55. No. 18. 2010. P. 5230–5238.

15. Loghambal S., Rajendran L. Mathematical modeling in amperometric oxidase enzyme-membrane electrodes. *Journal of Membrane Science*. 2011. Vol. 373. No. 1–2. P. 20–28.

16. Meena A., Rajendran L. Mathematical modeling of amperometric and potentiometric biosensors and system of non-linear equations. Homotopy perturbation approach. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Vol. 644. No. 1. 2010. P. 50–59.

17. Ašeris V., Gaidamauskaitė E., Kulys J., Baronas R. Modelling glucose dehydrogenase-based amperometric biosensor utilizing synergistic substrates conversion. *Electrochimica Acta*. 2014. Vol. 146, P. 752–758.

18. Ašeris V., Baronas R., Kulys J. Modelling the biosensor utilizing parallel substrates conversion. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2012. Vol. 685. P. 63–71.

19. Arduini F., Amine A. Biosensors Based on Enzyme Inhibition. *Advances in Biochemical Engineering*. 2014. Vol. 140. P. 299–326.

20. Upadhyay L.S., Verma N. Enzyme Inhibition Based Biosensors: A Review. *Analytical Letters*. Vol. 46. 2012. P. 225–241.

21. Stepurska K. V., Soldatkin O.O., Kucherenko I.S., Arkhypova V.M., Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P. Feasibility of application of conductometric biosensor based on acetylcholinesterase for the inhibitory analysis of toxic compounds of different nature. *Analytica Chimica Acta*. 2015. Vol. 854. P. 161–168.

22. Dhull V., Gahlaut A., Dilbaghi N., Hooda V. Acetylcholinesterase biosensors for electrochemical detection of organophosphorus compounds: A review. *Biochemistry Research International*. Vol. 2013. P. 1–18.

23. Achi F., Bourouina-Bacha S., Bourouina M., Amine A. Mathematical model and numerical simulation of inhibition based biosensor for the detection of Hg(II). *Sensors & Actuators, B: Chemical*. 2015. Vol. 207. P. 413–423.

24. Arkhypova V.N., Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P., El'skaya A.V., Martelet C., Jaffrezic-Renault N. Development and optimisation of biosensors based on pH-sensitive field effect transistor and cholinesterase for sensitive detection of solanaceous glycoalkaloids. *Biosensors & Bioelectronics*. 2003. 18. P. 1047–1053.

25. Arkhypova V.N., Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P., Korpan Y.I., El'skaya A.V., Gravoueuille J.-M., Martelet C., Jaffrezic-Renault N. Application of enzyme field effect transistors for fast detection of total glycoalkaloids content in potatoes. *Sensors and Actuators B*. 2004. Vol. 103. P. 416–422.

26. Arrowsmith D.K., Place C.M. The Linearization Theorem. *Dynamical Systems: Differential Equations, Maps, and Chaotic Behaviour*. London: Chapman & Hall. 1992. P. 77–81.