План занятия

I. Теория. Рассказать об иерархии времен и сформулировать условия теоремы Тихонова.

II. Практическое занятие. На примере ферментативных реакций показать существование иерархии времен в конкретной системе и применение теоремы Тихонова.

1. ***Работа с размерной системой.***

1.1. Вывести по кинетической схеме <u>полную</u> систему дифференциальных уравнений (для субстрата ***S***, продукта ***P***, фермента ***E***, фермент-субстратного комплекса ***C***).

1.2. Построить кинетические кривые для <u>полной</u> системы.

1.3. Упростить систему, оставляя только <u>независимые</u> переменные (для субстрата ***S*** и фермент-субстратного комплекса ***C***).

1.4. Построить кинетические кривые для <u>независимых</u> переменных.

2. ***Работа с безразмерной системой.***

2.1. Обезразмерить систему. Выделить малый параметр. Записать в безразмерных переменных.

2.2. Построить <u>кинетические кривые</u> для «медленной» ***x*** и «быстрой» ***y*** переменных при $\boldsymbol{\varepsilon} = \mathbf{0.1}$ и $\boldsymbol{\varepsilon} = \mathbf{0.01}$.

2.3. Проверить выполнимость условий теоремы Тихонова. Получить вырожденную систему.

2.4. Построить <u>фазовый портрет</u> для полной системы при $\boldsymbol{\varepsilon} = \mathbf{0.01}$. Сравнить с кривой квази-стационарных состояний в вырожденной системе.

2.5. Сравнить <u>кинетические кривые</u> для полной и вырожденной систем при $\boldsymbol{\varepsilon} = \mathbf{0.01}$.

I. Теоретический материал (из лекции)

Математически строгое обоснование применения метода квазистационарных концентраций (редукции системы в соответствии с иерархией времен) и формулировка условий его применимости дана в работе А.Н. Тихонова (1952).

Рассмотрим простейший случай двух дифференциальных уравнений

$$\frac{dx}{dt} = \varphi(x,y), \quad \frac{dy}{dt} = G(x,y) \quad . \qquad (6.1)$$

Пусть y - медленная, а x - быстрая переменная. Это означает, что отношение приращений Δy и Δx за короткий промежуток времени Δt много меньше единицы:

$$\Delta y/\Delta x << 1.$$

Скорость изменения x значительно превосходит скорость изменения y, поэтому правую часть первого уравнения можно записать в виде:

$\varphi(x,y)=AF(x,y)$, *где* $A>>1$.

Первое уравнение системы можно представить в виде:

$$\frac{dx}{dt} = AF(x,y).$$

Разделив левую и правую часть уравнения на A и обозначив $\varepsilon=1/A$, получим *полную* систему уравнений, тождественную исходной:

$$\varepsilon\frac{dx}{dt} = F(x,y), \frac{dy}{dt} = G(x,y), \qquad (6.2)$$

где $\varepsilon<<1$ - *малый параметр.*

Если характер решения не изменится при устремлении малого параметра ε к нулю (условия этого обстоятельства и составляют содержание теоремы Тихонова), можно устремить ε к нулю и получить для «быстрой» переменной x вместо дифференциального уравнения — алгебраическое.

$$F(x,y) = 0, \quad \frac{dy}{dt} = G(x,y). \qquad (6.3)$$

В отличие от полной такая система называется *вырожденной*. Фазовый портрет такой системы представлен на рис. 6.2.

Фазовые траектории в любой точке фазовой плоскости за исключением ε–окрестности кривой $F(x,y)=0$ имеют наклон, определяемый уравнением:

$$\frac{dy}{dx} = \varepsilon\frac{G(x,y)}{F(x,y)} \approx \varepsilon << 1,$$

т.е. расположены почти горизонтально. Это области быстрых движений, при которых вдоль фазовой траектории $y=const$, а x быстро меняется. Достигнув по одной из таких горизонталей ε–окрестности кривой $F(x,y)=0$, изображающая точка потом будет двигаться по этой кривой.

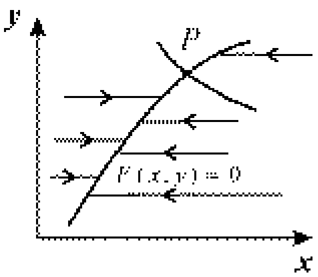


Рис. 6.2
Фазовый портрет системы 6.3.

Скорость движения по горизонтальным участкам траектории $dx/dt \approx 1/\varepsilon = A$, т.е. очень велика по сравнению со скоростью движения в окрестности кривой $F(x,y)=0$. Поэтому общее время достижения некоего состояния на кривой $F(x,y)$ определяется лишь характером движения вдоль этой кривой, т.е. зависит лишь от начальных значений медленной переменной y и не зависит от начальных значений быстрой переменной x.

Отметим, что квазистационарные значения быстрых переменных являются функциями не окончательных стационарных значений медленных переменных, а лишь их мгновенных значений. В этом смысле говорят о том, что быстрая переменная «подчинена» медленной.

Теорема Тихонова устанавливает условия редукции системы дифференциальных уравнений с малым параметром (условия замены дифференциальных уравнений для быстрых переменных - алгебраическими).

Запишем систему N уравнений, часть из которых содержит малый параметр ε перед производной.

$$\varepsilon \frac{dx_p}{dt} = F_p(x_1, x_2, \ldots, x_r, x_{r+1}, \ldots, x_N), \qquad (6.4)$$

$$\frac{dx_q}{dt} = F_q(x_1, x_2, \ldots, x_r, x_{r+1}, \ldots, x_N). \qquad (6.5)$$

Назовем систему (6.4) *присоединенной*, а систему (6.5) - *вырожденной*.

Решение *полной* системы (6.4 - 6.5) стремится к решению *вырожденной* системы (6.5) при $\varepsilon \to 0$, если выполняются следующие условия:

а) решение полной и присоединенной системы единственно, а правые части непрерывны;

б) решение $x_1 = \varphi_1(x_1, x_2, \ldots, x_N), \ldots, x_r = \varphi_r(x_1, x_2, \ldots, x_N)$

представляет собой изолированный корень алгебраической системы

$$F_p(x_1, x_2, \ldots, x_r, x_{r+1}, \ldots, x_N) = 0, \; p = 1, \ldots, r$$

(в окрестности этого корня нет других корней);

в) решение $x_1, x_2, \ldots, x_r$ — устойчивая изолированная особая точка присоединенной системы (6.4) при всех значениях $x_{r+1}, x_{r+2}, \ldots, x_N$;

г) начальные условия $x_1^0, x_2^0, \ldots, x_r^0$ попадают в область влияния устойчивой особой точки присоединенной системы.

Число начальных условий вырожденной системы меньше, чем полной: начальные значения быстрых переменных не используются в вырожденной системе. Согласно теореме Тихонова, если выполняется условие в), результат не зависит от начальных условий для переменных присоединенной системы.

Таким образом, необходимым условием редукции является наличие малого параметра в уравнениях (6.4).

Теорема Тихонова явно или неявно применяется при исследовании практически любых моделей биологических систем.

II. ***Практическое занятие***

1. ***Работа с размерной системой.***

1.1. ***Вывод системы дифференциальных уравнений по кинетической схеме.***

Рассмотрим базовую модель ферментативной реакции, предложенной Михаэлисом и Ментеном. Цель исследования — определить скорость реакции, катализируемой ферментом.

Схема реакции: $E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftarrows}} ES \overset{k_{+2}}{\rightarrow} E + P$.

Субстрат S образует с ферментом E фермент-субстратный комплекс ES (эта реакция обратимая); затем этот комплекс распадается на фермент и продукт P (реакция необратимая).

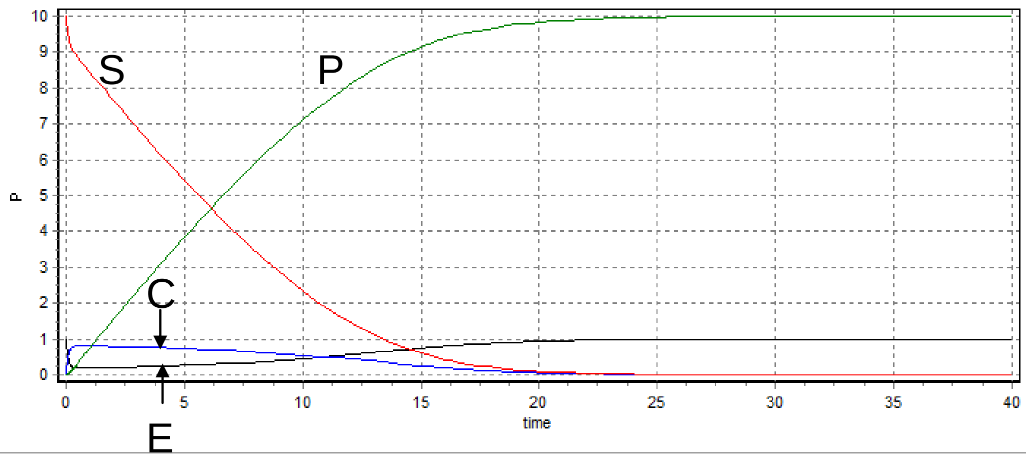
k_{+1}, k_{-1}, k_{+2} — константы скоростей реакций.

Пусть s — концентрация субстрата, e — концентрация фермента, c — концентрация фермент-субстратного комплекса, p — концентрация продукта. Изменение во времени каждой из компоненты схемы реакции описывается следующими уравнениями:

$$\begin{cases} \dfrac{ds}{dt} = -k_{+1}es + k_{-1}c, \\ \dfrac{de}{dt} = -k_{+1}es + k_{-1}c + k_{+2}c, \\ \dfrac{dc}{dt} = k_{+1}es - (k_{-1} + k_{+2})c, \\ \dfrac{dp}{dt} = k_{+2}c. \end{cases} \qquad \text{Начальные условия: } \begin{cases} s(0) = s_0, \\ e(0) = e_0, \\ c(0) = 0, \\ p(0) = 0. \end{cases}$$

1.2. ***Построение кинетических кривых для <u>полной</u> системы: S(t), E(t), C(t), P(t).***

Начальные значения концентраций: $S = 10$, $E = 1$, $C = 0$, $P = 0$.
Значения констант: $k_{+1} = 1$, $k_{-1} = 1$, $k_{+2} = 1$.



Обратить внимание на разный масштаб изменения субстрата+продукта (от 0 до 10) и фермента+фермент-субстратного комплекса (от 0 до 1). При этом элементарные константы скоростей всех реакций равны между собой.

1.3. ***Упрощение системы.***

(Используя закон сохранения и записывая интеграл для продукта P, оставляем 2 независимые переменные.)

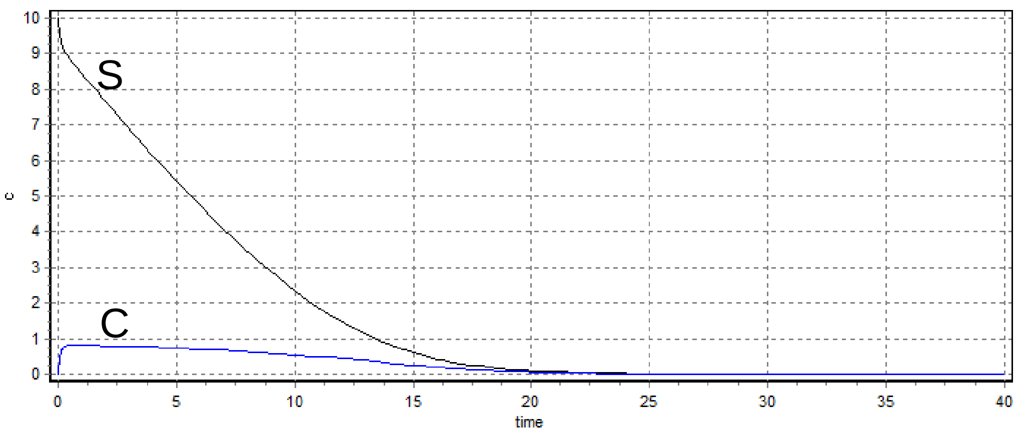
Заметим, что последнее уравнение отделяется от всех остальных: если система трех первых уравнений решена, то концентрация продукта рассчитывается по формуле: $p(t) = k_{+2}\int_0^t c(\tau)d\tau$.

В соответствии со схемой реакции в любой момент времени общее количество фермента (свободного и связанного в комплекс) сохраняется: $e(t)+c(t)=e_0$. Тогда наша система уравнений приводится к следующему виду:

$$\begin{cases} \dfrac{ds}{dt} = -k_{+1}(e_0 - c)s + k_{-1}c, \\ \dfrac{dc}{dt} = k_{+1}(e_0 - c)s - (k_{-1} + k_{+2})c, \\ s(0) = s_0, \quad c(0) = 0 \end{cases}$$

1.4. ***Построение кинетических кривых для независимых переменных S(t), C(t).***

Начальные значения концентраций: $S = 10$, $C = 0$.
Значения констант: $k_{+1} = 1$, $k_{-1} = 1$, $k_{+2} = 1$.



Обратить внимание на разный масштаб изменения субстрата S (от 0 до 10) и фермент-субстратного комплекса C (от 0 до 1). При этом константы скоростей всех реакций равны.

Примечание: Задания 1а и 1б можно объединить в одно и строить кинетику только для независимых переменных, т.е. 1б.

2. *Работа с безразмерной системой.*

2.1. *Обезразмеривание системы. Выделение малого параметра. Построение кинетических кривых.*

Введем новые переменные: $\tau = k_{+1}e_0 t, \quad x = \dfrac{s}{s_0}, \quad y = \dfrac{c}{e_0}$. Тогда $d\tau = k_{+1}e_0 dt, \quad dx = \dfrac{ds}{s_0}, \quad dy = \dfrac{dc}{e_0}$,

а начальные условия записываются как: $x(0) = 1, \quad y(0) = 0$.

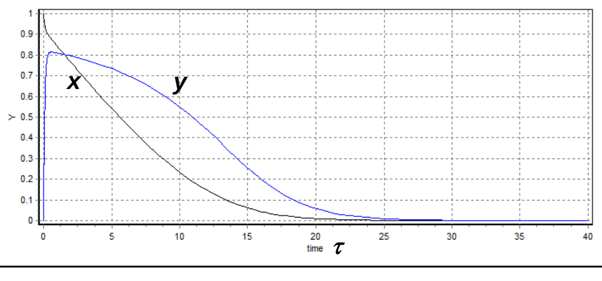
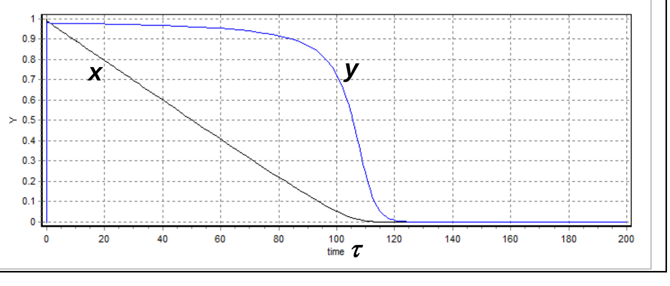
Система принимает вид:

$$\begin{cases} \dfrac{s_0 dx}{d\tau} = -xs_0 + \dfrac{k_{-1} + k_{+1}xs_0}{k_{+1}e_0} ye_0, \\ \dfrac{e_0 dy}{d\tau} = xs_0 - \dfrac{k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}xs_0}{k_{+1}e_0} ye_0, \\ x(0) = 1, \quad y(0) = 0. \end{cases} \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \begin{bmatrix} \dfrac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}s_0} = K \\ \dfrac{k_{+2}}{k_{+1}s_0} = \lambda, \\ \dfrac{e_0}{s_0} = \varepsilon \end{bmatrix} \Leftrightarrow \begin{cases} \dfrac{dx}{d\tau} = -x + (K + x - \lambda)y, \\ \varepsilon \dfrac{dy}{d\tau} = x - (K + x)y. \\ x(0) = 1, \quad y(0) = 0. \end{cases}$$

2.2. *Построение кинетических кривых для безразмерной системы.*

$x(\tau)$ – безразмерная концентрация субстрата («медленная» переменная),
$y(\tau)$ – безразмерная концентрация фермент-субстратного комплекса («быстрая» переменная).

Начальные значения концентраций: $x = 1, y = 0$. Значения элементарных констант: $k_{+1} = 1, k_{-1} = 1, k_{+2} = 1, e_0 = 1, s_0 = 10$. Значения для сочетаний констант: $K = 0.2, \lambda = 0.1, \boldsymbol{\varepsilon = 0.1}$.	Начальные значения концентраций: $x = 1, y = 0$. Значения элементарных констант: $k_{+1} = 1, k_{-1} = 1, k_{+2} = 1, e_0 = 1, s_0 = 100$. Значения для сочетаний констант: $K = 0.02, \lambda = 0.01, \boldsymbol{\varepsilon = 0.01}$.
	

Кривые построены в одном масштабе для безразмерных концентраций.
Обратить внимание на быстрый подъем и медленный спад для фермент-субстратного комплекса, *y*.
На втором графике для ε **= 0.01** хорошо видно, что в интервале времени примерно от 0 до 80-100 концентрация субстрата *x* меняется от своего максимального значения 1 до почти 0. При этом концентрация *y* меняется очень мало (квази-стационарное состояние).
Отметить, что иерархия времен определяется не кинетическими константами, а разницей в концентрациях субстрата и фермента.

Теоретическое обоснование применения теоремы Тихонова.
Отметим, что во втором уравнении полученной системы в левой части присутствует параметр ε. Предположим, что концентрация субстрата значительно превышает концентрацию фермента: $s_0 \gg e_0$. Тогда получаем, что $\varepsilon \ll 1$. В этом случае мы оказываемся в условиях теоремы Тихонова (можно строго показать, что выполнены все необходимые математические условия). Согласно этой теореме, если мы имеем дело с
полной системой уравнений, состоящей из

присоединенной $\varepsilon \dfrac{dx_p}{dt} = F_p(x_1,...,x_N)$ и

вырожденной $\dfrac{dx_q}{dt} = F_q(x_1,...,x_N)$,

то при выполнении ряда условий решение *полной* системы стремится к решению *вырожденной* системы при $\varepsilon \to 0$. Основной смысл состоит в следующем. В уравнениях присоединенной системы величины скоростей $\dfrac{dx_p}{dt}$ очень велики (разделив обе части на близкое к нулю ε, получим, что правая часть стремится к бесконечности), а это значит, что переменные x_p «мгновенно» приходят к своим стационарным значениям. Поэтому дифференциальные уравнения присоединенной системы можно заменить на алгебраические: $F_p(x_1,...,x_N) = 0$.

2.3. *Проверка выполнимости условий теоремы Тихонова. Получение вырожденной системы.*

i) Видно, что правые части системы являются непрерывными функциями, удовлетворяющими условиям задачи Коши, а следовательно решение при заданных начальных условиях единственно.

ii) для присоединенной системы $\varepsilon\, dy/dt=x-(x+K)y$
рассмотрим $x-(x+K)y=0$
решение: $y=x/(x+K)$
Решение изолировано (других решений в окрестности нет)

iii) вычисляем производную правой части, смотрим знак производной.
$d(x-(x+K)y)/dy=-(x+K)$ всегда отрицательно для положительных x и K.
По критерию Ляпунова решение будет устойчивым при любых положительных x и K.

iv) существуют начальные условия, которые попадут в область влияния устойчивой особой точки.

Таким образом, условия теоремы Тихонова выполнены, и мы можем заменить уравнение для быстрой переменной алгебраическим.

$$\begin{cases} \dfrac{dx}{d\tau} = -x + (x + K - \lambda)y, \\ y = \dfrac{x}{x+K}, \\ x(0) = 1 \end{cases}$$

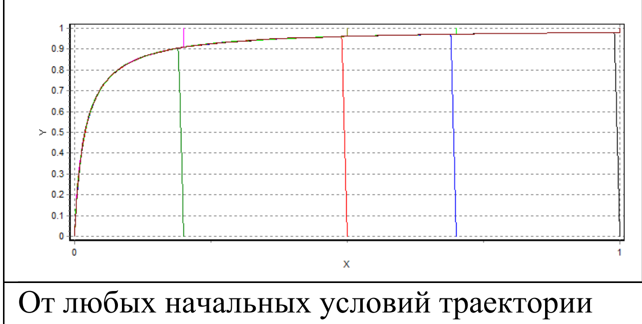
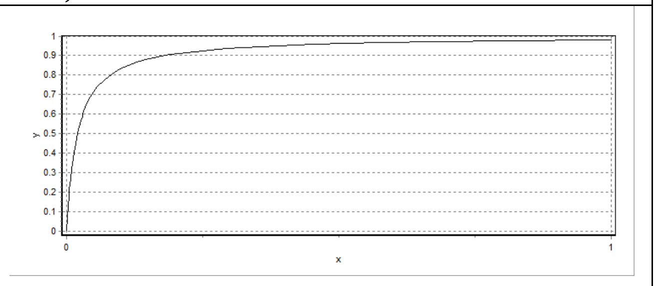
Подставляем выражение для y в дифференциальное уравнение для x и получаем:

$$\frac{dx}{d\tau} = -x + (x + K - \lambda)\frac{x}{x+K} \quad \text{или} \quad \frac{dx}{d\tau} = \frac{-\lambda x}{x+K}, \quad x(0) = 1.$$

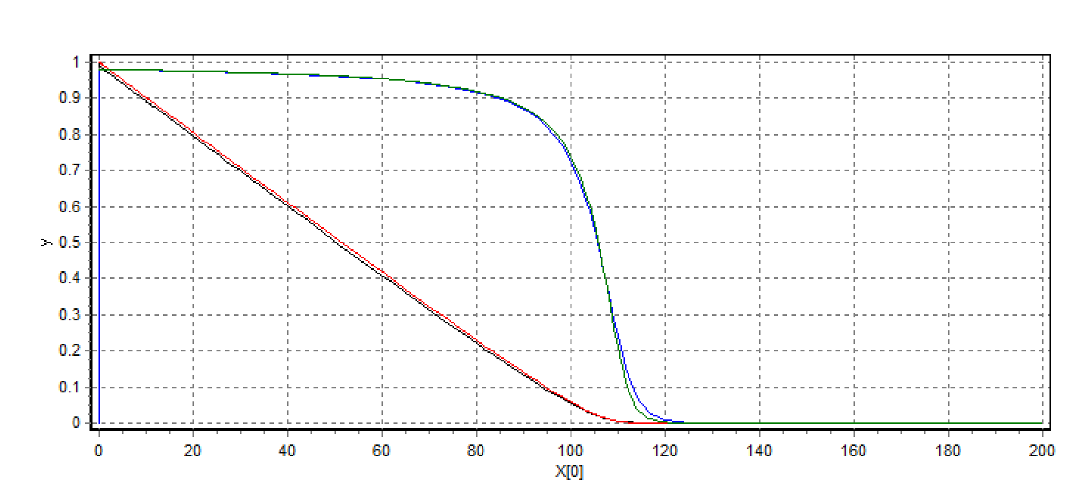
В размерном виде это классическая формула Михаэлиса–Ментен для кинетики изменения субстрата в ферментативной реакции: $\dfrac{ds}{dt} = -\dfrac{Vs}{K_M + s}$.

2.4. ***Построение <u>фазового портрета</u> для полной безразмерной системы (два уравнения для «медленной» и для «быстрой» переменных).***

Сравнение с кривой квази-стационарных состояний в вырожденной системе

<table>
<tr><td>Фазовый портрет системы до применения теоремы Тихонова (для «медленной» и «быстрой» переменных):</td><td>Кривая квазистационарных состояний y = x/(x+K) в вырожденной системе после применения теоремы Тихонова:</td></tr>
<tr><td>$\dfrac{dx}{d\tau} = -x + (K + x - \lambda)y,$
$\varepsilon\dfrac{dy}{d\tau} = x - (K + x)y.$</td><td>y(x) = x/(x+K)</td></tr>
<tr><td>Начальные значения для x и y удобно взять следующие:
$y = 0$, $x = 1$, $x = 0.7$, $x = 0.5$, $x = 0.2$
$y = 1$, $x = 1$, $x = 0.7$, $x = 0.5$, $x = 0.2$</td><td>Кривая y(x) строится при $0 < x < 1$</td></tr>
<tr><td colspan="2">Значения элементарных констант: $k_{+1} = 1$, $k_{-1} = 1$, $k_{+2} = 1$, $e_0 = 1$, $s_0 = 100$.
Значения для сочетаний констант: $K = 0.02$, $\lambda = 0.01$, $\varepsilon = 0.01$.</td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td>От любых начальных условий траектории быстро выходят на кривую y = x/(x+K)
(Можно сравнить с рисунком 6.3 из лекций)</td><td>Отсутствует «быстрый» выход на стационар</td></tr>
<tr><td>Вспоминая только что изученный материал, можно добавить, что особая точка (0;0) – устойчивый узел.</td><td></td></tr>
</table>

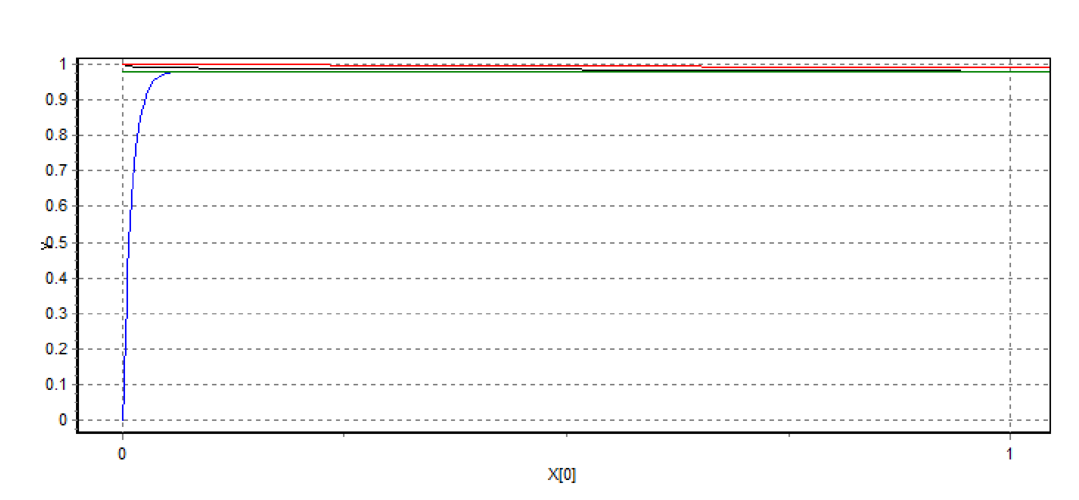
2.5. *Сравнение <u>кинетических кривых</u> для полной и вырожденной систем при ε=0.01.*



Черная кривая - концентрация субстрата, *x*, медленная переменная, в полной системе.
Красная кривая - концентрация субстрата, *x*, медленная переменная, в вырожденной системе.
В полной и вырожденной системах на всем интервале времени кривые практически совпадают.

Синяя кривая - концентрация фермент-субстратного комплекса, *y*, быстрая переменная, в полной системе.
Зеленая кривая - концентрация фермент-субстратного комплекса, *y*, быстрая переменная, в вырожденной системе.
В полной и вырожденной системах кривые совпадают везде за исключением малого (порядка ε) начального интервала времени, где синяя кривая быстро выходит на квази-стационарный уровень.

Можно выделить начальный отрезок времени (0;1), на котором видно, что несовпадение синей и зеленой кривых существует только в начале.



Работа с DBSolve

Уравнения заданы в окошке RHS.
Параметры и начальные условия заданы в окошке Initial values
Запустить счет – в окне ODE нажать Run

При внесении изменений в окне параметров Initial values или в RHS необходимо нажать иконку «сохранить» (окно после этого можно не закрывать).

Чтобы в одном окне нарисовать две кривые, нужно выбрать окно Options, затем внизу, в поле Start chart from serie поставить 1. Вернуться в окно ODE. Чтобы нарисовать следующую кривую при сохранении двух предыдущих – в поле Start chart from serie поставить 2 и т.д.

Нарисовать кинетическую кривую.
В окне ODE в поле для x должно быть X[0] (обозначение времени), в поле для y ввести нужную переменную.
Изменить время счета можно в поле time limit. (для $\varepsilon=0.1$ время ~40, для $\varepsilon=0.01$ время ~200)

Нарисовать фазовый портрет.
В окне ODE в полях для x и y ввести нужные переменные.