

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Evelina Gaidamauskaitė

KOMPIUTERINIS DAUGIAPAKOPIŲ REAKCIJŲ KINETIKOS BIOJUTIKLIUOSE
MODELIAVIMAS

Daktaro disertacijos santrauka
Fiziniai mokslai, informatika (09P)

Vilnius, 2011

Disertacija rengta 2006 - 2011 metais Vilniaus universitete.

Mokslinis vadovas:

prof. dr. Romas Baronas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, informatika - 09P)

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Informatikos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas:

doc. dr. Rimantas Vaicekuskas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, informatika - 09P)

Nariai:

prof. habil. dr. Genadijus Kulvietis (Vilniaus Gedimino technikos universitetas, fiziniai mokslai, informatika - 09P)

prof. habil. dr. Albertas Malinauskas (Fizinių ir technologijos mokslų centro Chemijos institutas, fiziniai mokslai, chemija - 03P)

prof. dr. Dalius Navakauskas (Vilniaus Gedimino technikos universitetas, technologijos mokslai, informatikos inžinerija - 07T)

prof. habil. dr. Mifodijus Sapagovas (Vilniaus universiteto Matematikos ir informatikos institutas, fiziniai mokslai, informatika - 09P)

Oponentai:

prof. habil. dr. Rimvydas Simutis (Kauno technologijos universitetas, fiziniai mokslai, informatika - 09P)

prof. habil. dr. Antanas Žilinskas (Vilniaus universiteto Matematikos ir informatikos institutas, fiziniai mokslai, informatika - 09P)

Disertacija bus ginama viešame Informatikos mokslo krypties tarybos posėdyje 2011 m. lapkričio mėn. 11 d. 14 val. Vilniaus universiteto Matematikos ir informatikos fakulteto Nuotolinių studijų centre.

Adresas: Šaltinių g. 1A, LT-03225, Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2011 m. spalio mėn. 1 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje.

VILNIUS UNIVERSITY

Evelina Gaidamauskaitė

COMPUTATIONAL MODELING OF COMPLEX REACTIONS KINETICS IN
BIOSENSORS

Summary of doctoral dissertation
Physical sciences, informatics (09P)

Vilnius, 2011

The work was performed in 2006-2011 at the Vilnius University.

Scientific supervisor:

prof. dr. Romas Baronas (Vilnius University, Physical Sciences, Informatics - 09P)

The dissertation is being defended at the Council of Scientific Field of Informatics at Vilnius University:

Chairman:

doc. dr. Rimantas Vaicekauskas (Vilnius University, Physical Sciences, Informatics - 09P)

Members:

prof. habil. dr. Genadijus Kulvietis (Vilnius Gediminas Technical University, Physical Sciences, Informatics - 09P)

prof. habil. dr. Albertas Malinauskas (Center for Physical Sciences and Technology Institute of Chemistry, Physical Sciences, Chemistry - 03P)

prof. dr. Dalius Navakauskas (Vilnius Gediminas Technical University, Technological Sciences, Informatics Engineering - 07T)

prof. habil. dr. Mifodijus Sapagovas (Vilnius University Institute of Mathematics and Informatics, Physical Sciences, Informatics - 09P)

Opponents:

prof. habil. dr. Rimvydas Simutis (Kaunas University of Technology, Physical Sciences, Informatics - 09P)

prof. habil. dr. Antanas Žilinskas (Vilnius University Institute of Mathematics and Informatics, Physical Sciences, Informatics - 09P)

The dissertation will be defended at the public meeting of the council in the VU MIF Distance Learning Center on the 11th of November, 2011 at 14:00.

Adress: Šaltinių 1A, LT-03225 Vilnius, Lithuania.

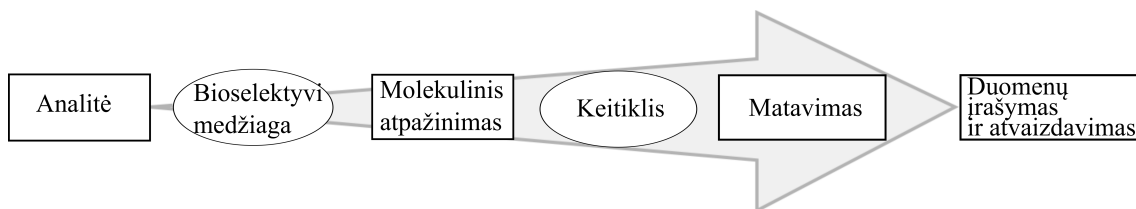
The summary of the dissertation was distributed on the 1st of October, 2011.

The dissertation is available at the library of Vilnius University.

Įvadas

Greita ir tiksli informacija yra labai svarbi priimant teisingus sprendimus bei pasirenkant tinkamus veiksmus. Žmogus suvokia išorinę informaciją remdamasis biologinių jutiklių - regos, klausos, skonio, kvapo ir lytėjimo pojūčių - sistema. Tačiau daugeliu atvejų tik mūsų pojūčių nepakanka. Todėl nuolat yra kuriamos naujos pagalbinės priemonės, pavyzdžiui - jutikliai, biojutikliai, biologiniai kuro elementai bei reaktoriai. Šiame darbe detalai nagrinėsime daigiapakopių biojutiklių projektavimo bei jų veiklos modeliavimo klausimus.

Šiame darbe biojutiklio sąvoka yra taikoma jutikliams, naudojantiems biomolekules kaip selektyvius atpažinimo elementus [5, 31, 39, 43]. Biojutikliai yra analitiniai įtaisai sudaryti iš biologiškai aktyvios bei selektyviai atpažįstančios substratą medžiagos, dažniausiai fermento, ir keitiklio formuojančio makroskopinį fizinį signalą (žr. 1 pav.). Pastarojo signalo stipris paprastai yra tiesiogiai proporcingas substrato koncentracijai.



1 pav.: Biologinio atpažinimo procesas.

Pagal Tarptautinės Fundamentinės ir Taikomosios chemijos sąjungos (IUPAC) apibrėžimą:

Biojutiklis yra integruotas atpažinimo-keitimo įtaisas, gebantis pateikti selektyvią kiekybinę ar pusiau kiekybinę analitinę informaciją pasitelkdamas biologinio atpažinimo elementą [38].

Biojutikliai yra pakankamai pigūs, jautrūs bei patikimi įtaisai, dažnai naudojami klinikinės diagnostikos, vaistų kūrimo, maisto analizės, aplinkos ir pramoniniame monitoringe bei kitoms reikmėms [21, 28, 40, 43, 45].

Sparčiai besiplečianti taikymų sritis sukuria naujų biojutiklių tipų poreikį. Naujų įtaisų kūrimui būtini lygiagretūs eksperimentiniai tyrimai. Tačiau pastarieji eksperimentai dėl didelės reagentų, ypač fermentų, kainos yra labai brangūs. Savo ruožtu, skaitiniai eksperimentai gali patikimai pakeisti fizinius. Skaitinis biojutiklių modeliavimas yra paremtas netiesinių dalinių išvestinių lygčių sprendimu [5]. Šios lygtys yra sudarytos iš tiesinio difuziją aprašančio nario bei netiesinio biokatalitinės substrato transformacijos reakcijos greičio. Analiziniai lygčių sprendiniai egzistuoja tik ribinių substrato koncentracijų atvejais [32]. Bendruoju atveju lygčių sprendimui turi būti pritaikytas skaitinio

sprendimo metodai. Šiame darbe yra taikomi baigtinių skirtumų skaitinio sprendimo metodai. Optimaliam sprendiniui parinkti atlikta lyginamoji reakcijos - difuzijos tipo lygčių sprendimo analizė.

Dauguma ankstesnių skaitiniam biojutiklių modeliavimui skirtų darbų remiasi vienos pakopos cheminės reakcijos aproksimacija. Tačiau šiuolaikiniai biojutikliai yra sudėtinės sistemos, kuriose naudojami keli fermentai arba vienas fermentas dalyvauja keliose reakcijose vienu metu. Dar sudėtingesnė situacija būdinga biojutikliams, kuriuose vyksta kryžminė reakcija tarp substrato ir produkto. Todėl, modeliuojant tokius biojutiklius, būtina atsižvelgti į juose vykstančių procesų daugiapakopį pobūdį. Šiame darbe nuodugniai iširtos tokių reakcijų schemų savybės.

Matematinis modelis dažniausiai yra formuluojamas kiekvienai atskirai reakcijų schemai [5]. Tačiau toks darbas yra gana sudėtingas, taip pat jo metu sunku išvengti klaidų. Deterministinė modelių sudarymo proceso prigimtis leidžia jį automatizuoti. Šiuo principu paremta programinė įranga gerokai paspartintų naujų biojutiklių kūrimą gyvybės mokslų tyrimams. Plačios biojutiklių taikymo sritys bei nuolat auganti jų paklausa tyrimams, pramoninėms bei medicininėms reikmėms liudija ne tik apie jų poreikį šiandien, bet ir apie potencialias galimybes artimoje ateityje [33].

Tyrimų objektas

Disertacijos tyrimų objektai - biojutiklių modeliai bei kompiuterinio modeliavimo metodai. Darbe detaliam tiriama matematiniai ir skaitiniai daugiapakopių biojutiklių modeliai. Tyrimų objektas taip pat apima ir baigtinių skirtumų schemų pritaikomumo bei automatizuoto kompiuterinių modelių sudarymo sritis.

Tyrimų metodika

Nauji matematiniai modeliai formuluojami taikant kinetinę difuzijos bei cheminių procesų aprašymą. Atitinkamos reakcijos - difuzijos lygtys priklauso netiesinių parabolinių dalinių išvestinių diferencialinių lygčių tipui. Jų skaitiniam sprendimui panaudoti keli baigtinių skirtumų metodai. Automatizuoto kompiuterinio modeliavimo programinės įrangos kūrimui pasitelktas SBML aprašas bei JAVA programavimo kalba. Daugiapakopių biojutiklių savybės tirtos kompiuterinio modeliavimo būdu.

Tyrimų problema ir uždaviniai

Disertacijos tyrimų problema - automatizuoto daugiapakopių biojutiklių skaitinio modeliavimo metodo sukūrimas.

Siekiant išspręsti tyrimų problemą spręsti tokie uždaviniai:

1. Sudaryti matematinius modelius praktiniams daugiapakopiams biojutikliams: peroksidaziniam optiniam bei lakaziniam amperometriniam.
2. Palyginti dažniausiai naudojamas baigtinių skirtumų skaitinio sprendimo schemas sprendžiant reakcijos - difuzijos lygtis. Nustatyti labiausiai tinkamą schemą, atsižvelgiant į sprendinio tikslumą, skaičiavimo laiką bei taikymo paprastumą.
3. Sukurti bendrą programinę įrangą kompiuteriniam daugiapakopių biojutiklių modeliavimui.
4. Ištirti modelio parametrų įtaką optinio biojutiklio atsakui.
5. Pasitelkiant naująją programinę įrangą atlikti sinergetinio efekto modeliavimą lakaziniame biojutiklyje.

Mokslinis naujumas ir rezultatai

1. Sudaryti originalūs matematiniai modeliai absorbciniam bei fluorescenciniam peroksidaziniams biojutikliams.
2. Pasiūlytos naujos, regeneracijos, kraštinės sąlygos matematiniam lakazinio biojutiklio modeliui.
3. Baigtinių skirtumų schemų palyginimas parodė, kad greičiausiai pasirinktas sprendinio tikslumas pasiekiamas taikant neišreikštinę bei Hopscotch schemas. Uždaviniams, kuriems sparta svarbesnė už tikslumą, turėtų būti taikoma išreikštinė schema.
4. Sukurtas lankstus modelis, kurį galima pritaikyti konkrečių praktinių daugiapakopių biojutiklių modeliavimui.
5. Lakazinio biojutiklio modeliavimas paaiškino sinergetinio reiškinių kilmę.

Praktinis reikšmingumas

Disertacijoje suformuluotus matematinius modelius galima taikyti daugiapakopių biojutiklių tyrimams, kūrimui bei veiklos kontrolei. Juos taip pat galima nesudėtingai apibendrinti ir kitiems aktualiems biojutikliams. Darbe pasiūlyta biojutiklių modeliavimo metodika gali būti būsimų tyrimų pagrindu. Naujoji daugiapakopių biojutinklių modeliavimo programinė įranga yra interaktyvi ir patogi vartotojams. Ja gali naudotis ne

tik modeliavimo, bet ir biochemijos bei bioinžinerijos tyrėjai. Atlikti skaitinio modeliavimo eksperimentai pagrindė naujų metodų adekvatumą nagrinėjant tokias sudėtingas sistemas kaip sinergetinis lakazinis bei optinis peroksidazinis biojutikliai. Disertacijos rezultatai pritaikyti įgyvendinant projektus „Bioelektrokatalizė sintezėje ir analizėje (BIOSA)“, kurį finansavo Lietuvos mokslo taryba (sutarties Nr. PBT-04/2010) bei „Kompiuterinių metodų, algoritmų ir įrankių efektyviam sudėtingos geometrijos biojutiklių modeliavimui ir optimizavimui sukūrimas“, finansuojamą iš ES Socialinio fondo pagal VP1-3.1-ŠMM-07-K priemonę „Parama mokslininkų ir kitų tyrėjų mokslinei veiklai (Visuotinė dotacija)“.

Ginamieji teiginiai

1. Dažniausiai skaitiniam Michaelis-Menten fermentine kinetika paremtų reakcijos-difuzijos lygčių sprendimui taikomų baigtinių skirtumų schemų palyginimas parodė, kad greičiausiai pasirinkta santykinės paklaidos vertė pasiekama taikant neišreikštinę bei Hopscotch schemas. Uždaviniams, kuriems sparta svarbesnė už tikslumą, turėtų būti taikoma išreikštinė schema.
2. Įvairiuose daugiapakopiuose biojutikliuose vykstančius procesus galima aprašyti pasiūlytu SBML kalbos plėtiniumi. Sukurta programinė įranga užtikrina taip aprašytų biojutiklių kompiuterinį modeliavimą.
3. Kompiuterinis lakazinio biojutiklio modeliavimas teoriškai paaikškino eksperimentiškai stebėtą sinergetinę mediatoriaus įtaką biojutiklio atsakui.
4. Optinio peroksidazinio biojutiklio matematinį modelį galima sėkmingai taikyti biojutiklio atsako kinetinių savybių tyrimui. Skaitinio modeliavimo rezultatai parodė, kad biojutiklio atsakas yra stabilus santykinai plataus išorinio difuzijos sluoksnio, kuris turi nedidelę įtaką atsakui esant didelėms fermento koncentracijoms, atveju.

Darbo rezultatų patikimumas

Skaitinio modeliavimo rezultatai palyginti su eksperimentinėmis vertėmis siekiant įsitikinti jų patikimumu. Modeliavimo rezultatai nežymiai priklauso nuo galimų parametru neapibrėžčių. Geras sutapimas pastebėtas ir lyginant su vėlesniais darbais. Biojutiklių modeliavimui taip pat taikyti naujausi matematiniai bei kompiuteriniai metodai.

Aprobavimas

Šio darbo rezultatai buvo paskelbti penkiuose straipsniuose [1A, 2A, 3A, 4A, 5A]. Trys iš jų - ISI sąrašo žurnaluose ([1A, 2A, 4A]). Be to, rezultatai buvo pristatyti šešių tarptautinių konferencijų leidiniuose ([6A, 7A, 8A, 9A, 10A, 11A]). Vienuolika žodinių pranešimų atlikta įvairiose konferencijose:

1. E. Gaidamauskaitė, R. Baronas. Influence of Spontaneous Convection on Amperometric Biosensor Response. *23rd Nordic Seminar on Computational Mechanics*, 21-22 October, 2010, KTH, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden.
2. E. Gaidamauskaitė, R. Baronas. A Computational Investigation of the Optical Biosensor by a Dimensionless Model. *Kompiuterininkų dienos - 2009*, Rugsėjo 25 - 26, 2009, KTU, Kaunas, Lietuva.
3. E. Gaidamauskaitė, R. Baronas. Numerical Modelling of Peroxidase-based Optical Biosensor. *14th International Conference on Mathematical Modelling and Analysis MMA 2009*, 27 - 30 May, 2009, Daugavpils, Latvia.
4. E. Gaidamauskaitė, R. Baronas. Computer Modelling of Biosensor with Product Inhibition. *5th European Congress on Computational Methods in Applied Sciences and Engineering ECCOMAS 2008*, 30 June - 4 July, 2008, Venice, Italy.
5. R. Baronas, E. Gaidamauskaitė. A Reduced Model of Peroxidase-based Optical Biosensor. *13th International Conference on Mathematical Modelling and Analysis MMA 2008*, 4 - 7 June, 2008, Tartu (Kääriku), Estonia.
6. E. Gaidamauskaitė, R. Baronas. Modelling a Peroxidase-based Fluorescent Biosensor. *22nd European Conference on Modelling and Simulation ECMS 2008*, 3 - 6 June, 2008, University of Cyprus, Nicosia, Cyprus.
7. E. Gaidamauskaitė, R. Baronas. Computational Modelling of Rotating Disc Enzyme Electrode. *20th Nordic Seminar on Computational Mechanics*, 23-24 November, 2007, Chalmers University, Göteborg, Sweden.
8. E. Gaidamauskaitė. The Development of Computer Models for Biosensors. *XIII International Scientific IT Conference, Kompiuterininkų dienos - 2007*, Rugsėjo 13-15, 2007, Panevėžys, Lietuva.
9. E. Gaidamauskaitė. The Development of Computer Models for the Biosensors. *PhD Summer School "Formal Methods for System Analysis in Informatics"*, Gegužės 13-19, 2007, Druskininkai, Lietuva.
10. E. Gaidamauskaitė, R. Baronas. Automatizuotas biojutiklių kompiuterinių modelių sudarymas (The development of computer models for amperometric biosensors). *Informacinės technologijos 2007*, Sausio 31 - Vasario 1, 2007, KTU, Kaunas, Lietuva.

11. E. Gaidamauskaitė, R. Baronas. Baigtinių skirtumų metodo taikymas biojutiklio veiksmui modeliuoti. *Informacinės technologijos 2006*, Sausio 25-26, 2006, KTU, Kaunas, Lietuva.

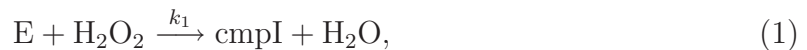
1. Daugiapakopių biojutiklių matematiniai modeliai

Biojutiklių matematinių modelių sudarymas yra būtinas siekiant padidinti jų produktyvumą ir efektyvumą [2, 35]. Nemažos dalies šiuolaikinių biojutiklių veikimas yra paremtas daugiapakopėmis cheminių reakcijų schemomis [31, 39, 43]. Šiame skyriuje pateikiami daugiapakopių biojutiklių (peroksidazinio optinio ir lakazinio sinergetinio) matematiniai modeliai [1A, 3A, 4A, 7A, 9A, 10A].

1.1. Matematinis peroksidazinio optinio biojutiklio modelis

Optiniai biojutikliai yra dažnai naudojami aplinkotyrimams, klinikiniam bei pramoniniam tikslams [43]. Šie įrenginiai leidžia atlikti realaus laiko molekulinę sąveikų analizę be ženklinimo priemonių [19]. Optiniai biojutikliai taip pat yra taikomi tiriant molekulinę sąveiką tarp peptidų, baltymų, oligonukleotidų, angliavandenių, vaistų bei virusų [25, 26, 30, 36, 44]. Siekiant nuodugniai ištirti projektavimui svarbias šių biojutiklių kinetines savybes turi būti atliktas lygiagretus realistinių jų modelių tyrimas. Priešingai nei pakankamai nuosekliai ištirti amperometriniai, optiniai biojutikliai buvo modeliuojami tik pavieniuose darbuose [23, 27].

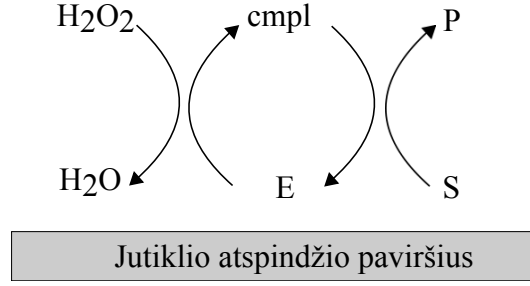
Optinį biojutiklį sudaro ant atspindžio paviršiaus imobilizuotas fermentinis sluoksnis, lazeris bei detektorius. Išsamiam veikimo aprašymui būtina atsižvelgti ir į medžiagų difuzijos sluoksnį. Optinio biojutiklio matematinis modelis skirtas aprašyti dviejų pakopų reakcijų schemą. Vandenilio peroksidas (H_2O_2) reaguoja su peroksidaze (E) suformuodami junginį I (cmpI) bei vandenį (H_2O). Šios reakcijos greičio konstanta yra k_1 . Antrosios reakcijos metu junginys I (cmpI) reagodamas su substratu (S) suformuoja fermentą (E) bei produktą (P), kai reakcijos greičio konstanta yra k_2 (2 pav.):



Produktas (P) sugeria šviesą, todėl peroksidazinio biojutiklio atsakas yra šviesos intensyvumo pokytis (absorbicija). Susidariusio produkto kiekis apibūdina substrato koncentraciją [41].

Simetriškos geometrijos ir homogeniško imobilizuoto fermento pasiskirstymo biojutiklyje cheminiai bei medžiagos pernašos kinetiniai vyksmai aprašomi reakcijos-difuzijos lygčių sistema ($0 < x < d, t > 0$),

$$\frac{\partial S_e}{\partial t} = D_{S_e} \frac{\partial^2 S_e}{\partial x^2} - k_2 C S_e, \quad (3)$$



2 pav.: Peroksidazinio optinio biojutiklio reakcijų schema.

$$\frac{\partial P_e}{\partial t} = D_{P_e} \frac{\partial^2 P_e}{\partial x^2} + k_2 C S_e, \quad (4)$$

$$\frac{\partial H_e}{\partial t} = D_{H_e} \frac{\partial^2 H_e}{\partial x^2} - k_1 E H_e, \quad (5)$$

$$\frac{\partial E}{\partial t} = -k_1 E H_e + k_2 C S_e, \quad (6)$$

$$\frac{\partial C}{\partial t} = k_1 E H_e - k_2 C S_e, \quad (7)$$

kur x ir t yra erdvės ir laiko koordinatės, $S_e(x, t)$, $P_e(x, t)$, $H_e(x, t)$, $E(x, t)$, $C(x, t)$ yra substrato, produkto, vandenilio peroksido ir junginio I koncentracijos fermento sluoksnyje, d yra fermento sluoksnio plotis, D_{S_e} , D_{P_e} , D_{H_e} yra difuzijos koeficientai.

Už fermentinio sluoksnio ribų vyksta tik substrato, produkto bei vandenilio peroksido difuzinės pernašos procesai ($d < x < d + \delta$, $t > 0$),

$$\frac{\partial S_b}{\partial t} = D_{S_b} \frac{\partial^2 S_b}{\partial x^2}, \quad (8)$$

$$\frac{\partial P_b}{\partial t} = D_{P_b} \frac{\partial^2 P_b}{\partial x^2}, \quad (9)$$

$$\frac{\partial H_b}{\partial t} = D_{H_b} \frac{\partial^2 H_b}{\partial x^2}, \quad (10)$$

kur δ yra difuzijos sluoksnio plotis, $S_b(x, t)$, $P_b(x, t)$, $H_b(x, t)$ yra substrato, produkto bei vandenilio peroksido koncentracijos difuzijos sluoksnyje, D_{S_b} , D_{P_b} , D_{H_b} yra atitinkami difuzijos koeficientai.

Difuzijos sluoksnis ($d < x < d + \delta$) yra laikomas Nernst difuzijos sluoksniu [42]. Pastarojo sluoksnio plotis nekinta viso proceso metu. Taip pat yra laikoma, kad už difuzijos

sluoksnio ribų koncentracijos yra pastovios.

Uždavinio pradinių sąlygų apibrėžimas remiasi prielaida, kad biojutiklio veikimas inicijuojamas substrato prasiskverbimu į difuzijos sluoksnį.

Uždavinio kraštinių sąlygų apibrėžimui taikomos trys prielaidos: substrato, produkto bei vandenilio peroksido koncentracijų difuzijos sluoksnio ir išorinės erdvės sandūroje pastovumas, medžiagų nepralaidumas ant elektrodo paviršiaus bei tolygumo sąlygos sluoksnių sandūrose.

Optinio biojutiklio atsaku laikoma šviesos sugertis. Šviesą sugeria produktas fermentiniame ir difuziniame sluoksnyje. Išorinių sąlygų dėka optinio signalo formavimui įtakos neturi produkto molekulės palikusios fermento ir difuzijos sluoksnius. Sugertis $A(t)$ laiko momentu t yra randama taikant sąryšį:

$$A(t) = \varepsilon_P l_{ef} \bar{P}, \quad l_{ef} = d + \delta, \quad (11)$$

kur ε_P yra produkto sugerties koeficientas, \bar{P} - vidutinė produkto koncentracija fermento ir difuzijos sluoksniuose, l_{ef} - efektinis fermento ir Nernst difuzijos sluoksnio plotis [41]. Organinių junginių ε_P vertė varijuoja nuo 10^4 iki $10^2 \text{ m}^2 \text{ mol}^{-1}$.

Vidutinės substrato, produkto ir vandenilio peroksido koncentracijos difuzijos ir fermento sluoksniuose yra apibrėžiamos tokiu būdu:

$$\bar{U} = \frac{1}{d + \delta} \left(\int_0^d U_e(x, t) dx + \int_d^{d+\delta} U_b(x, t) dx \right), \quad U \in \{S, P, H\}. \quad (12)$$

Stacionarusis atsakas A_∞ yra apibrėžiamas, kai $t \rightarrow \infty$,

$$A_\infty = \lim_{t \rightarrow \infty} A(t). \quad (13)$$

Kita svarbi biojutiklio charakteristika yra jautris - stacionaraus atsako išvestinė pagal substrato koncentraciją [31, 39]. Bedimensinis biojutiklio jautris B_S apibrėžiamas taip:

$$B_S(S_0) = \frac{S_0}{A_\infty(S_0)} \times \frac{d A_\infty(S_0)}{d S_0}, \quad (14)$$

kur $A_\infty(S_0)$ yra biojutiklio atsakas apskaičiuotas kai išorinė substrato koncentracija yra S_0 .

Bedimensinis Biot skaičius Bi yra apibrėžiamas kaip išorinės bei vidinės substrato pernašos varžų santykis [3, 15],

$$Bi = \frac{d/D_{Se}}{\delta/D_{Sb}} = \frac{dD_{Sb}}{\delta D_{Se}}. \quad (15)$$

Fluorescencinio optinio biojutiklio atsakas yra sužadintų produkto molekulių emituojamo spinduliavimo intensyvumas [7A]. Pagal Beer-Lambert dėsnį fluorescencijos intensyvumas $F_I(t)$ laiko momentu t yra [4, 16]:

$$F_I(t) = I_0 \varphi \left(1 - 10^{-\varepsilon P l_{ef} \bar{P}} \right), \quad (16)$$

kur I_0 žymi žadinančios šviesos intensyvumą, φ yra kvantinis fluoroforo našumas, \bar{P} - vidutinė produkto koncentracija difuzijos sluoksnyje. Produkto fluorescencijos kvantinis našumas φ yra apibrėžiamas kaip emituojamų ir absorbuojamų fotonų santykis. Jo vertė varijuoja tarp 0,001 ir 1.

Fluorescencija $F_I(t)$ yra tiesiogiai proporcinga žadinančios šviesos intensyvumui I_0 , todėl matavimo rezultatai dažnai pateikiami bedimensine forma $F(t)$,

$$F(t) = F_I(t)/I_0. \quad (17)$$

Stacionarus fluorescencinio biojutiklio atsakas F_∞ yra apibrėžiamas, kai $t \rightarrow \infty$,

$$F_\infty = \lim_{t \rightarrow \infty} F(t). \quad (18)$$

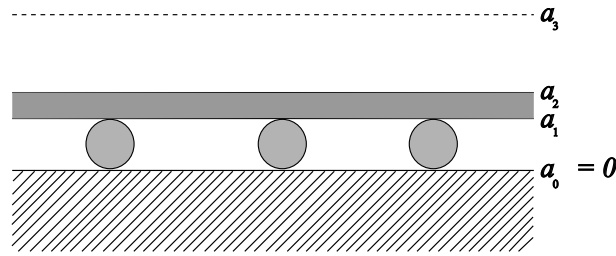
1.2. Matematinis lakazinio sinergetinio biojutiklio modelis

Daugelio daugiapakopiuose biojutikliuose vykstačių cheminių vyksmų negalima aprašyti supaprastinta Michaelis-Menten schema [9, 11]. Vienas iš jų - optinis biojutiklis aptartas anksčiau, kitas praktinėm reikmėm labai svarbus atvejis yra sinergetinis biojutiklis [6, 10, 13, 24, 34]. Sinergetinėje fermentinių reakcijų schemoje fermentas verčia substratą produktu lygiagrečiai vykstant kryžminei reakcijai tarp substrato ir produkto.

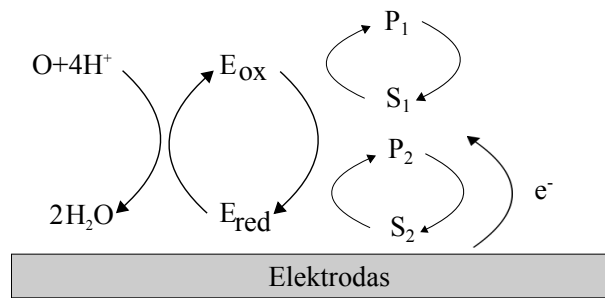
Neseniai buvo sukonstruotas ir ištirtas lakazinis sinergetinis biojutiklis, kurio veikimas pagrįstas N-pakeistų fenotiazinų ir fenoksazinų oksidacija esant heksacianoferatui(II) [18]. Sinergetinis procesas buvo analiziškai tirtas remiantis stacionarios būsenos sąlygomis bei ignoruojant medžiagų pernašą. Biojutiklyje vyksta ne tik biokatalitinės transformacijos, bet ir substrato bei produkto pernašos procesai [20, 31, 39, 43]. Difuzija riboja biojutiklio jautrį. Šių sudėtingų procesų modeliavimas pasitelkiant analizinius diferencialinių lygčių sistemos sprendinius yra praktiškai neįmanomas [7, 22].

Šiame skirsnyje formuluojamas lakazinio sinergetinio biojutiklio matematinis modelis. Biojutiklio modelis yra suskaidytas į tris dalis: fermento sluoksnį, dializės membraną ir išorinį difuzijos sluoksnį.

Lakazinis biojutiklis sudarytas iš grafito elektrodo padengto tinkleliu užpildytu fermentu [18]. Fermentinis sluoksnis su tinkleliu yra padengtas dializės membrana, kurią supa išorinis difuzijos sluoksnis (3 pav.).

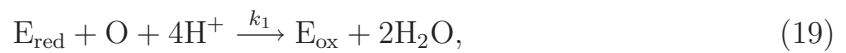


3 pav.: Lakazinio amperometrino biojutiklio struktūra.



4 pav.: Lakazinio amperometrino biojutiklio reakcijų schema.

Reakcijų schema (4 pav.) aprašo ne tik oksiduotos lakazės (E_{ox}) sąveiką su dviem substratais, bet ir kryžminę reakciją tarp oksiduoto mediatoriaus (P_2) ir ferocianido (S_1) [18]. Lakazė reaktyvuojama deguonimi,



kur E_{red} ir E_{ox} redukuotas ir oksiduotas lakazės fermentas, S_1 ir S_2 yra substratai, P_1 , P_2 - reakcijų produktai. S_2 ir P_2 yra taip pat vadinami redukuotu ir oksiduotu mediatoriais, o P_1 ir P_2 yra elektrochemiškai aktyvios medžiagos.

Laikantis imobilizuoto fermento homegeniško pasiskirstymo prielaida, medžiagų pernaša ir reakcijų kinetika fermentiniame sluoksnyje gali būti aprašyta reakcijos-difuzijos lygčių sistema ($0 < x < a_1$, $t > 0$):

$$\frac{\partial E_{red,1}}{\partial t} = D_{E_{red,1}} \frac{\partial^2 E_{red,1}}{\partial x^2} + 4k_2 E_{ox,1} S_{1,1} - k_1 E_{red,1} O_1 + 4k_3 E_{ox,1} S_{2,1}, \quad (25a)$$

$$\frac{\partial E_{ox,1}}{\partial t} = D_{E_{ox,1}} \frac{\partial^2 E_{ox,1}}{\partial x^2} + k_1 E_{red,1} O_1 - 4k_2 E_{ox,1} S_{1,1} - 4k_3 E_{ox,1} S_{2,1}, \quad (25b)$$

$$\frac{\partial S_{1,1}}{\partial t} = D_{S_{1,1}} \frac{\partial^2 S_{1,1}}{\partial x^2} - 4k_2 E_{ox,1} S_{1,1} - k_4 P_{2,1} S_{1,1}, \quad (25c)$$

$$\frac{\partial S_{2,1}}{\partial t} = D_{S_{2,1}} \frac{\partial^2 S_{2,1}}{\partial x^2} - 4k_3 E_{ox,1} S_{2,1} + k_4 P_{2,1} S_{1,1}, \quad (25d)$$

$$\frac{\partial P_{1,1}}{\partial t} = D_{P_{1,1}} \frac{\partial^2 P_{1,1}}{\partial x^2} + 4k_2 E_{ox,1} S_{1,1} + k_4 P_{2,1} S_{1,1}, \quad (25e)$$

$$\frac{\partial P_{2,1}}{\partial t} = D_{P_{2,1}} \frac{\partial^2 P_{2,1}}{\partial x^2} + 4k_3 E_{ox,1} S_{2,1} - k_4 P_{2,1} S_{1,1}, \quad (25f)$$

$$\frac{\partial O_1}{\partial t} = D_{O_1} \frac{\partial^2 O_1}{\partial x^2} - k_1 E_{red,1} O_1, \quad (25g)$$

kur $E_{red,1}$, $E_{ox,1}$, $S_{i,1}$, $P_{i,1}$ ir O_1 redukuotos ir oksiduotos fermento formos, i -ojo substrato, i -ojo produkto ir deguonies koncentracijos, a_1 žymi fermento sluoksnio plotį, $D_{E_{red,1}}$, $D_{E_{ox,1}}$, $D_{S_{i,1}}$, $D_{P_{i,1}}$ ir D_{O_1} yra difuzijos koeficientai, $i = 1, 2$.

Dializės membranoje ir išoriniame difuzijos sluoksnyje fermentinė reakcija nevyksta. Todėl šiuose sluoksniuose yra modeliuojama tik medžiagų pernaša bei elektrocheminė reakcija (22) ($a_{j-1} < x < a_j$, $t > 0$),

$$\frac{\partial S_{1,j}}{\partial t} = D_{S_{1,j}} \frac{\partial^2 S_{1,j}}{\partial x^2} - k_4 P_{2,j} S_{1,j}, \quad (26a)$$

$$\frac{\partial S_{2,j}}{\partial t} = D_{S_{2,j}} \frac{\partial^2 S_{2,j}}{\partial x^2} + k_4 P_{2,j} S_{1,j}, \quad (26b)$$

$$\frac{\partial P_{1,j}}{\partial t} = D_{P_{1,j}} \frac{\partial^2 P_{1,j}}{\partial x^2} + k_4 P_{2,j} S_{1,j}, \quad (26c)$$

$$\frac{\partial P_{2,j}}{\partial t} = D_{P_{2,j}} \frac{\partial^2 P_{2,j}}{\partial x^2} - k_4 P_{2,j} S_{1,j}, \quad (26d)$$

$$\frac{\partial O_j}{\partial t} = D_{O_j} \frac{\partial^2 O_j}{\partial x^2}, \quad (26e)$$

kur $S_{i,j}$, $P_{i,j}$ ir O_j yra i -ojo substrato, i -ojo produkto ir deguonies koncentracijos dializės membranoje ($j = 2$) ir difuzijos sluoksnyje ($j = 3$), a_1 - fermento sluoksnio plotis, $a_2 - a_1$ ir $a_3 - a_2$ žymi membranos ir difuzijos sluoksnio pločius atitinkamai, $D_{S_{i,j}}$, $D_{P_{i,j}}$ ir D_{O_j} yra difuzijos koeficientai, $i = 1, 2$, $j = 2, 3$.

Uždavinio pradinių sąlygų apibrėžimas remiasi prielaida, kad biojutiklio veikimas ini-

cijuojamas substratų prasiskverbimu į difuzijos sluoksnį. Proceso pradžioje deguonies pasiskirstymas laikomas tolygiu, o fermentas egzistuoja tik redukuotoje formoje.

Kraštinės sąlygos formuluojamos atsižvelgiant į produkto suvartojimą ir substrato regeneracijos procesus ant elektrodo paviršiaus. Taip pat atsižvelgiama į elektrochemiškai neaktyvių medžiagų ir fermento nepralaidumą ant elektrodo paviršiaus bei tolygumo sąlygas sluoksnių sandūrose. Difuzijos sluoksnio ir išorinės erdvės sandūroje visų medžiagų koncentracijos nekinta.

Sinergetinio biojutiklio atsakas yra fizikiniame eksperimente matuojamas srovės stipris $I(t)$. Srovė priklauso nuo heksacianoferato (III) ir mediatoriaus srauto ant elektrodo paviršiaus,

$$I(t) = n_e F A \left(D_{P_{1,1}} \frac{\partial P_{1,1}}{\partial x} \Big|_{x=0} + D_{P_{2,1}} \frac{\partial P_{2,1}}{\partial x} \Big|_{x=0} \right), \quad (27)$$

kur n_e - elektrocheminėje reakcijoje dalyvaujančių elektronų skaičius, F yra Faradėjaus konstanta, A - elektrodo paviršiaus plotas.

Stacionarus amperometrinio biojutiklio atsakas I_∞ yra apibrėžiamas, kai $t \rightarrow \infty$,

$$I_\infty = \lim_{t \rightarrow \infty} I(t). \quad (28)$$

2. Automatizuotas daugiapakopių biojutiklių modeliavimas

Kompiuterinis daugiapakopių biojutiklių modeliavimas yra sudėtingas ir daug skaičiavimo laiko reikalaujantis procesas [1, 7]. Skaitiniam modeliavimui yra naudojami standartiniai skaičiavimo įrankiai [14, 37]. Tačiau skaitiniai sprendimo metodai naudojami šiuose programose nėra optimalūs reakcijos-difuzijos tipo lygčių sprendimui. Taip pat šie kompiuteriniai įrankiai nėra skirti didžiąjai daliai biochemikų ar bioinžinierių. Šiame skyriuje yra pristatoma nauja plačiam vartotojų ratui prieinama programinė įranga skirta automatizuotam daugiapakopių biojutiklių modeliavimui. Siekiant optimizuoti skaitinį sprendimą taip pat atliktas baigtinių skirtumų schemų palyginimas.

2.1. Baigtinių skirtumų schemos biojutiklių modeliavimui

Biojutiklių veiksmą aprašančių matematinių modelių analiziniai sprendiniai egzistuoja tik ypatingaisiais atvejais [8, 17]. Bendroju atveju biojutiklio veiksmas modeliuojamas skaitmeniškai [7, 32]. Tam plačiai taikomas baigtinių skirtumų metodas [29]. Netiesinėms reakcijos-difuzijos lygtims spręsti galima taikyti įvairias skirtumines schemas [3, 29]. Šiame skirsnyje palyginami plačiai taikomų skirtuminių schemų tikslumas bei efektyvumas [5A].

Supaprastintai, biojutiklį galima įsivaizduoti kaip plokščią elektrodą, kurio paviršius padengtas fermento sluoksniu. Fermento sluoksnyje vyksta reakcija, kurios metu substratas (S) virsta produktu (P) [31, 39]:



Vienmatėje erdvėje biojutiklio matematinis modelis gaunamas jungiant fermentinę reakciją su medžiagų difuzija [17, 32]:

$$\begin{aligned} \frac{\partial S}{\partial t} &= D_S \frac{\partial^2 S}{\partial x^2} - \frac{V_{max} S}{K_M + S}, \\ \frac{\partial P}{\partial t} &= D_P \frac{\partial^2 P}{\partial x^2} + \frac{V_{max} S}{K_M + S}, \quad 0 < x < d, \quad t > 0, \end{aligned} \quad (30)$$

kur S yra substrato koncentracija, P - produkto koncentracija, t - laikas, x - erdvės koordinatė, D_S ir D_P yra substrato bei produkto difuzijos koeficientai, K_M - Michaelis-Menten konstanta, V_{max} - maksimalusis reakcijos greitis, d - fermento sluoksnio plotis.

Biojutiklis pradeda veikti, kai jis panardinamas į analizuojamąjį tirpalą. Amperometrijuose biojutikliuose dėl elektrodo poliarizacijos reakcijos produkto koncentracija elekt-

rodo paviršiuje išlieka pastovi ir lygi nuliui. Substratas nereaguoja elektrodo paviršiuje. Tarus, kad analizuojamasis tirpalas yra intensyviai maišomas, difuzijos sluoksnis ($0 < x < d$) išlieka pastovaus pločio. Substrato ir produkto koncentracijos fermento ir analizuojamojo tirpalo sandūroje išlieka pastovios visą biojutiklio veikimo laikotarpį.

Biojutiklio atsakas yra elektros srovė. Srovės tankio $I(t)$ išraiška laiko momentu t gaunama iš Faradėjaus ir Fiko dėsnų, naudojant produkto srauto funkciją elektrodo paviršiuje,

$$I(t) = n_e F D_P \left. \frac{\partial P}{\partial x} \right|_{x=0}, \quad (31)$$

kur n_e yra elektronų skaičius, kurie perneša krūvį elektrodo paviršiuje, F - Faradėjaus konstanta. Tariame, kad sistema nusistovi, kai $t \rightarrow \infty$,

$$I_p = \lim_{t \rightarrow \infty} I(t), \quad (32)$$

kur I_p yra pusiausviroji biojutiklio srovė.

Sprendžiant uždavinį baigtinių skirtumų metodu, nagrinėjamoji sritis padengiama tiesių (bendruoju atveju kreivių) tinklu $\Omega_{h\tau}$,

$$\Omega_{h\tau} = \{(x_i, t_j) : x_i = ih; t_j = j\tau; hN = d; \tau M = T; i = 0, \dots, N; j = 0, \dots, M\}, \quad (33)$$

kur T - biojutiklio tyrimo trukmė.

Išreikštinė skirtuminė schema

Naudojant išreikštinę skirtuminę schemą substrato ir produkto koncentracijų lygtys (30) aproksimuojamos naudojant žinomas žemesnės tinklo eilės vertes. Išreikštinė skirtuminė schema yra stabili tik tuomet, kai yra tenkinama sąlyga:

$$\tau \leq \min \left\{ \frac{h^2}{2D_S}, \frac{h^2}{2D_P} \right\}. \quad (34)$$

Dėl šios stabilumo sąlygos būtina smarkiai didinti laiko žingsnių skaičių esant dideliame erdvės žingsnių skaičiui. Tai nulemia didelę skaičiavimų trukmę.

Neišreikštinė skirtuminė schema 1

Biojutiklio matematinis modelis gali būti sprendžiamas keliomis neišreikštinėmis skirtuminėmis schemomis. Pagal schemą, pavadintą „neišreikštinė skirtuminė schema 1“, lygtys (30) aproksimuojamos reakcijos nario substrato koncentracijos reikšmes imant žemesnioje tinklo eilėje. Neišreikštinės schemos pasižymi stabilumu ir rezultatų tikslumu, naudojant mažiau skaičiavimo žingsnių.

Neišreikštinė skirtuminė schema 2

Substrato koncentracijos kitimo lygtį galima aproksimuoti labiau neišreikštine schema. Reakcijos nario skaitiklyje substrato koncentraciją galima imti aukštesnio lygmens. Ši lygtis yra taip pat tiesinė.

Crank-Nicolson skirtuminė schema

Pakankamai dažnai difuzijos lygties aproksimavimui yra taikomas Crank-Nicolson metodas [12, 29]. Taikant šį metodą, reakcijos-difuzijos lygtys (30) aproksimuojamos tiesinėmis skirtuminėmis lygtimis su žemesnio ir aukštesnio lygmenų reikšmėmis.

Hopscotch skirtuminė schema

Hopscotch metodu tinklo taškų reikšmės randamos dviem etapais [29]. Pirmu etapu, naudojant žinomas žemesnio lygio reikšmes apskaičiuojami lyginiai tinklo taškai. Antru etapu, nelyginiai tinklo taškai skaičiuojami naudojant jau žinomas lyginių taškų reikšmes.

Skaitiniams sprendiniams gauti buvo sudaryti kompiuteriniai modeliai. Gautųjų tiesinių algebrinių lygčių sistemų matricos yra trijųstrižinės, todėl lygčių sistemos buvo sprendžiamos pakankamai efektyviai [29]. Apibrėžtos skirtuminės schemas buvo lyginamos tarpusavyje atsižvelgiant į schemų paklaidas ir skaičiavimo laiką. Santykinė paklaida E_r skaičiuojama taip:

$$E_r = \frac{|J_R - J_a|}{J_a}, \quad J_a = \begin{cases} J_l, & S_0 \ll K_M, \\ J_g, & S_0 \gg K_M, \end{cases} \quad (35)$$

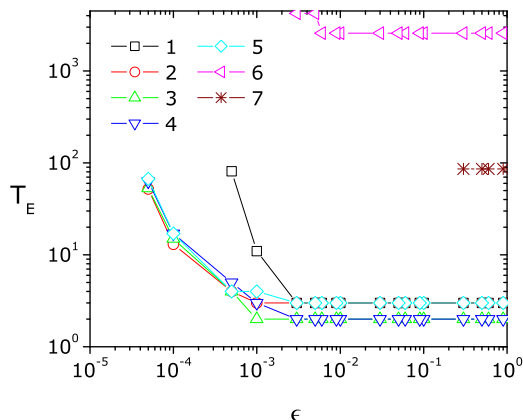
čia J_a - analizinio sprendinio pusiausvirosios srovės stipris, J_R - pusiausvirosios srovės stipris apskaičiuotas taikant skirtuminę schemą. Matematinio modelio sprendiniai buvo skaičiuojami taikant $V_{max} = 100\mu M/s$, $K_M = 100\mu M$, $S_0 \in \{10^{-3}K_M; 10^3K_M\}$ reikšmes. Kitų parametrų reikšmės tokios: $D_S = D_P = 300\mu m^2/s$, $n_e = 2$, $T = 10s$, $d = 100\mu m$.

Skaičiavimų trukmė T_E apibrėžiama taikant skirtingas santykinės paklaidos ribas ϵ :

$$T_E(\epsilon) = \min_{N,M} \{T_{N,M} : E_r \leq \epsilon\}, \quad (36)$$

kur $T_{N,M}$ yra skaičiavimų trukmė prie N ir M tinklo žingsnių.

$T_E(\epsilon)$ yra minimali skaičiavimų trukmė norint pasiekti, kad santykinė paklaida E_r būtų ne didesnė nei ϵ . Skaičiavimai buvo atlikti skirtingoms erdvės ir laiko žingsnių vertėms $N, M \in \{20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280, 2560, 5120, 10240\}$. 5 paveikslo rezultatai rodo,



5 pav.: Skaičiavimų trukmės T_E priklausomybė nuo santykinės paklaidos ϵ , $N, M \in \{20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280, 2560, 5120, 10240\}$. 1 - išreikštinė schema, 2 - neišreikštinė schema 1, 3 - neišreikštinė schema 2, 4 - Crank-Nicolson schema, 5 - Hopscotch schema, 6 - Maple, 7 - MATLAB.

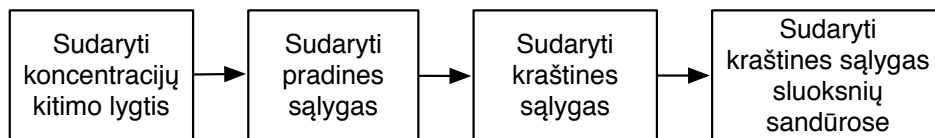
kad reikiama santykinės paklaidos vertė greičiausiai yra pasiekama taikant neišreikštinę ir Hopscotch schemas. Nepaisant sudėtingų skaičiavimų standartiniai dalinių išvestinių diferencialinių lygčių sprendėjai nepateikia tikslų rezultatų. Pavyzdžiui, MATLAB sprendėjas nepasiekia didesnio tikslumo nei 0,1.

2.2. Automatizuoto modelių sudarymo programinė įranga

Dažniausiai, kompiuteriniam naujų biojutiklių veikimo modeliavimui kiekvieną kartą kuriamas jų matematinis ir kompiuterinis modelis. Šis procesas tampa sudėtingu daugiapakopių biojutiklių atveju. Tačiau deterministinis šio proceso pobūdis leidžia jį automatizuoti pasitelkiant programinę įrangą.

Sukurta programinė įranga leidžia apibrėžti biojutiklių veikimo schemas bei savybes grafinėje vartotojo sąsajoje. Siekiant realizuoti daugkartinio apibrėžtų modelių naudojimo galimybę, buvo pasitelkta modelių aprašo kalba. SBML yra efektyvi kalba modelio reakcijų schemų apibrėžimams. Nors ši kalba ir nepasižymi visomis reikiamomis savybėmis biojutiklių modeliavimui, ją galima nesunkiai išplėsti. Išleidus SBML 2 lygio 3 versiją visi modelio elementai buvo papildyti pastabų (*Annotation*) nariu. Trūkstamos modelio savybės gali būti pateiktos SBML modelio sričių (*Compartment*), medžiagų (*Species*), reakcijų (*Reaction*) ir modelio (*Model*) elementų pastabose. Tokiu būdu išlaikant originalią SBML kalbos struktūrą sudaromos sąlygos naudotis kitais SBML įrankiais.

Iš SBML kalba pateikto biojutiklio modelio sudaromi matematinis ir kompiuterinis modeliai. Sukurta programinė įranga leidžia atlikti tokius veiksmus: įkelti SBML dokumen-

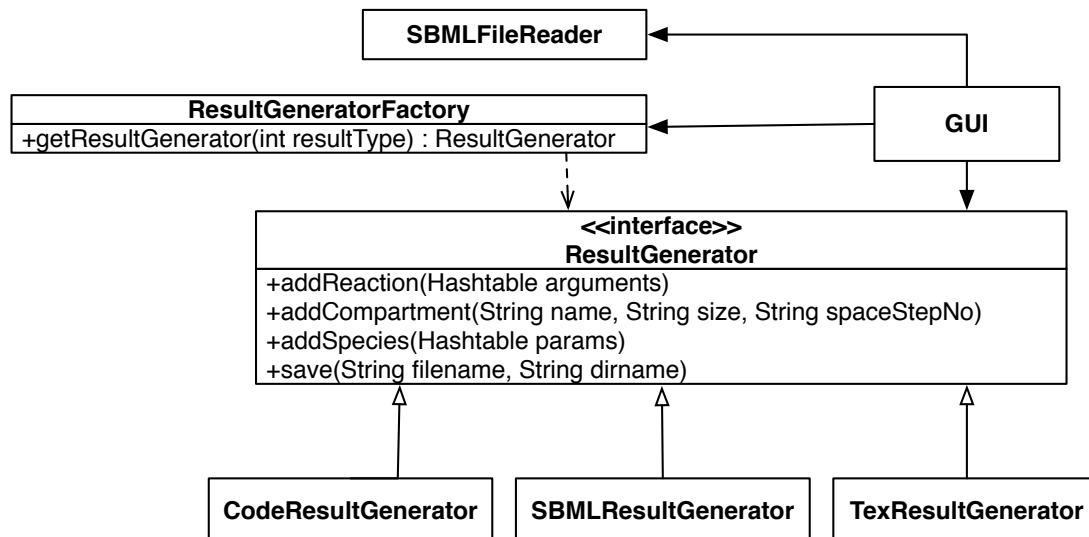


6 pav.: Kompiuterinio modelio sudarymo procesas.

ta į sistemą, išsaugoti SBML dokumentą, sukurti \LaTeX dokumentą aprašantį biojutiklio matematinį bei skaitinį modelius bei sukurti vykdomą programos kodą biojutiklio veikimo modeliavimui. Šiuo lanksčiu modeliu galima sukonstruoti amperometrino, absorbcinio bei fluorescencinio daugiapakopių biojutiklių modelius. Automatizuotas biojutiklių kompiuterinių modelių sudarymas remiasi keliais etapais: pradinių, kraštinių sąlygų bei reakcijos-difuzijos tipo lygčių konstravimu. Bendras algoritmas pateiktas 6 paveiksle.

Matematinis modelis sprendžiamas skaitiškai baigtinių skirtumų metodu. Programinė įranga pateikia dvi skirtumines schemas - išreikštinę ir neišreikštinę.

Sistema realizuota naudojant Gamyklos šabloną (7 pav.). Šis klasių šablonas leidžia atsiriboti nuo konkretaus rezultato (SBML dokumento, \LaTeX domumeno ar programos kodo) kūrimo specifikos.



7 pav.: Sistemos klasių diagrama.

Grafinė vartotojo sąsaja palengvina modelio įvedimo užduotį. Ši sąsaja yra sudaryta iš trijų parametrų sričių - medžiagų, reakcijų bei modelio. Programinė įranga sukurta naudojant Java objektiškai orientuotą programavimo kalbą pasitelkiant SWING bei libSBML bibliotekas.

3. Kompiuterinis daugiapakopių biojutiklių tyrimas

Fizikinės ir kinetinės biojutiklio atsako savybės gali būti tiriamos taikant kompiuterinį modeliavimą. Šiame skyriuje pristatomi daugiapakopių biojutiklių (peroksidazinio optinio ir lakazinio sinergetinio) kompiuterinio modeliavimo rezultatai [1A, 4A]. Šie tyrimai pagrindė naujo metodo pritaikomumą biojutiklių tyrimams. Detalus praeinamosios ir stacionarios fazės modeliavimas atskleidė biojutiklio atsako priklausomybę nuo įvairių parametrų. Tyrimo rezultatai gali būti pritaikyti naujų biojutiklių kūrimui bei jų veiklos kontrolei.

3.1. Kompiuterinis peroksidazinio optinio biojutiklio tyrimas

Stacionarus biojutiklio atsakas A_R laiko momentu T_R apibrėžiamas,

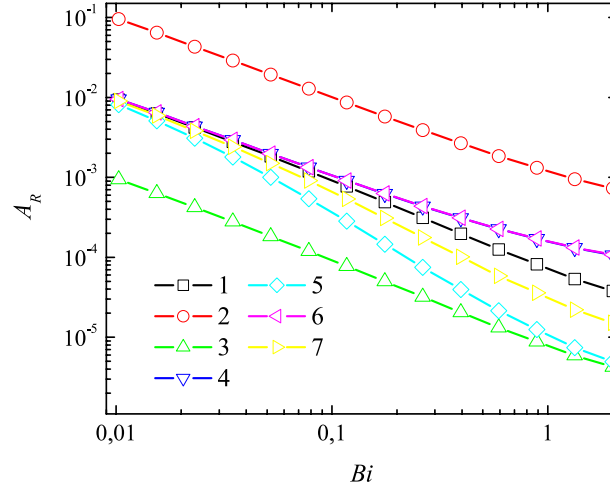
$$A_R = A(T_R) \approx A_\infty, \quad T_R = \min_{j>0, A_j>0} \left\{ \tau j : \frac{A_j - A_{j-1}}{A_j \tau} < \varepsilon \right\}, \quad (37)$$

kur τ yra laiko žingsnio ilgis. Skaičiavimams naudota $\varepsilon = 10^{-3}$ vertė. Skaitiniams eksperimentams naudotos tokios parametrų reikšmės:

$$\begin{aligned} D_{Se} = D_{Pe} = D_{He} = 300 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}, \quad D_{Sb} = D_{Pb} = D_{Hb} = 600 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}, \\ k_1 = 7,1 \times 10^6 \text{s}^{-1}\text{M}^{-1}, \quad k_2 = 2 \times 10^7 \text{s}^{-1}\text{M}^{-1}, \quad \varepsilon_P = 10^3 \text{m}^2\text{mol}^{-1}. \end{aligned} \quad (38)$$

Keičiant įvesties parametrus buvo skaitiškai analizuojama jų įtaka rezultatams, ypač aiškinantis katalitinių parametrų svarbą biojutiklio atsakui pereinamojoje ir stacionariojoje būsenose.

Biojutiklio atsako priklausomybė nuo difuzijos sluoksnio pločio pavaizduota 8 paveiksle. Biot skaičius Bi buvo apskaičiuotas laikantis fermento sluoksnio pastovumo prielaidos. Absorbcija didėja augant substrato koncentracijai. Atsakas stipriai priklauso nuo išorinės substrato koncentracijos S_0 , o kitų parametrų įtaka yra nežymi. Plataus difuzijos sluoksnio atveju ($Bi < \approx 0,02$ or $\delta > \approx 100 \mu\text{m}$) absorbcija priklauso tik nuo substrato koncentracijos. Šviesą absorbuojančio produkto koncentracija tiesiogiai priklauso nuo substrato koncentracijos, todėl absorbcija keičiasi kintant substrato koncentracijai. Apytikriai tiesinis stacionarios absorbcijos A_R mažėjimas didėjant Biot skaičiui Bi gali būti paaiškintas tiesišku ribų, kur produkto koncentracija yra nulinė, plėtimu ($x = d + \delta$). Todėl tikslus išorinio Nernst difuzijos sluoksnio pločio nustatymas yra labai svarbus prognozuojant biojutiklio atsaką. 8 paveikslas taip pat parodo, kad stacionarios absorbcijos pokytis keičiantis Biot skaičiui Bi yra gerokai didesnis esant mažesnėms pradinėms fermento (E_0 , 5 kreivė) ir vandenilio peroksido (H_0 , 7 kreivė) koncentracijoms, nei didesnių koncentracijų atveju (4 ir 6 kreivės). Absorbcija yra mažiau jautri difuzijos sluoksnio pločio δ pokyčiams, esant didesnėms E_0 ir H_0 vertėms nei mažesnėms.



8 pav.: Absorbcijos A_R priklausomybė nuo Biot skaičiaus Bi esant pastoviam fermento sluoksnio pločiui $d = 1\mu\text{m}$, trims substrato koncentracijoms S_0 : 10 (3), 100 (1, 4, 5, 6, 7), 1000 (2) μM , trims pradinėms fermento koncentracijoms E_0 : 0,1 (5), 1 (1, 2, 3, 6, 7), 10 (4) nM ir trims pradinėms vandenilio peroksido koncentracijoms H_0 : 0,1 (7), 1 (1, 2, 3, 4, 5), 10 (6) mM.

Taip pat buvo ištirta fermento sluoksnio pločio įtaka absorbcijai. Atliekant šiuos skaičiavimus Biot skaičius randamas laikantis difuzijos sluoksnio pločio pastovumo prielaidos. Fermento sluoksnio (membranos) pločio įtaka biojutiklio atsakui yra gana gerai žinoma. Paprastai fermentinio sluoksnio pločio svarba mažėja didėjant sluoksnio pločiui. 9 paveikslas parodo, kad fermento sluoksnio plotis d peroksidazinio optinio biojutiklio atsaką A_R veikia nežymiai. Tai gali būti paaiškinta atsižvelgus į santykinai platų difuzijos sluoksnį. Išorinio difuzijos sluoksnio plotis δ yra keliomis eilėmis didesnis nei fermentinio sluoksnio plotis d . Biojutiklio atsakas yra pakankamai stabilus keičiantis fermento sluoksnio pločiui, kai Biot skaičiaus vertė kinta nuo 0,02 iki 0,2 (plotis d kinta nuo $0,01\delta$ iki $0,1\delta$). Biojutiklio atsako stabilumas keičiantis fermento sluoksnio pločiui yra naudinga charakteristika kuriant naujus biojutiklius. 9 pav. taip pat rodo, kad absorbcija stipriai priklauso nuo išorinės substrato koncentracijos S_0 .

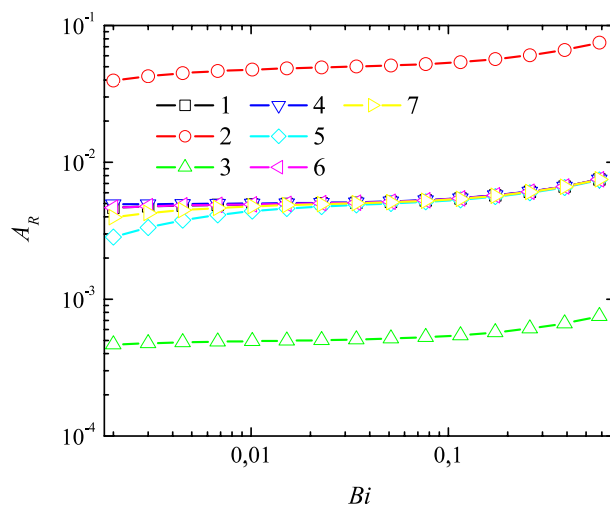
3.2. Kompiuterinis lakazinio sinergetinio biojutiklio tyrimas

Stacionarus biojutiklio atsakas I_R laiko momentu T_R apibrėžiamas,

$$I_R = I(T_R) \approx I_\infty, \quad T_R = \min_{j>0, I_j>0} \left\{ \tau_j : \frac{I_j - I_{j-1}}{I_j} < \varepsilon \right\}, \quad \tau_j = \tau_j, \quad (39)$$

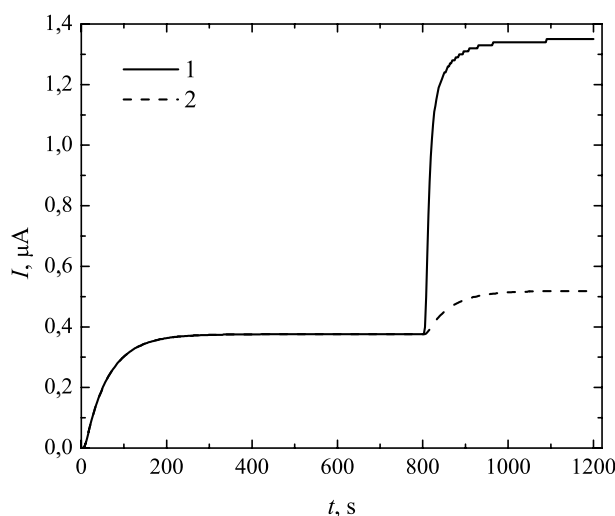
kur τ yra laiko žingsnio ilgis, $I_j = I(\tau_j)$. Skaičiavimams naudota $\varepsilon = 10^{-3}$ vertė.

Lakazinio biojutiklio atsako savybės buvo tiriamos taikant kompiuterinį modeliavimą.



9 pav.: Absorbcijos A_R priklausomybė nuo Biot skaičiaus Bi esant pastoviam difuzijos sluoksnio pločiui $\delta = 100 \mu\text{m}$. Kiti parametrai ir žymėjimai sutampa su 8 pav.

Keičiant įvesties parametrus biojutiklio veikimas buvo analizuojamas atsižvelgiant į medžiagų koncentracijų įtaką sinergetiniam efektui.



10 pav.: Lakazinio biojutiklio srovės $I(t)$ pokytis dviem atvejais: (1) mediatoriaus $S_{2,0}$ koncentracija lygi $11 \mu\text{M}$ laiko momentu $t = 800\text{s}$, (2) nedalyvaujant mediatoriui ($S_{2,0} = 0$) ferocianido $S_{1,0}$ koncentracija padidinama iki $39 \mu\text{M}$ laiko momentu $t = 800\text{s}$.

Siekiant ištirti mediatoriaus (substratas S_2) poveikį biojutiklio atsakui buvo atlikti du nepriklausomi skaitiniai eksperimentai. Apskaičiuoti biojutiklio srovių stipriai pavaizduoti paveiksle 10. Pradiniame abiejų eksperimentų etape į tirpalą buvo įpiltas tik pirmasis substratas S_1 . Kai sistema pasiekė stacionarią būseną ($t = 800\text{s}$), buvo įpiltas

papildomas substratas. Pirmuoju atveju (kreivė 1) mediatorius buvo įpiltas nekeičiant S_1 koncentracijos. Antruoju (kreivė 2) - buvo įpiltas papildomas S_1 substrato kiekis nekeičiant nulinės S_2 koncentracijos. Suminė abiejų substratų koncentracija abiem atvejais buvo vienoda. Rezultatai rodo, kad papildomos heksacianoferato(II) (substrato S_1 , kreivė 2) kiekis sustiprina bioelektrodo srovę, kuri nusistovi po apytikriai 200 sekundžių. Tačiau mediatorius (substratas S_2 , kreivė 1) nulemia didelį bioelektrodo atsako šuolį lyginant su vienodos S_1 koncentracijos verte (kreivė 2). Šie skaičiavimai patvirtina sinergetinį efektą.

Išvados

1. Skaitiniam Michaelis-Menten fermentine kinetika paremtų reakcijos-difuzijos lygčių sprendimui dažnai taikomų baigtinių skirtumų schemų detali lyginamoji analizė parodė, kad greičiausiai pasirinkta santykinės paklaidos vertė pasiekama taikant neišreikštinio skaičiavimo bei Hopscotch metodus. Išreikštinė schema turėtų būti naudojama uždaviniams, kurių sprendimui svarbiausias faktorius yra ne tikslumas, bet sprendimo greitis.
2. Įvairius daugiapakopių biojutiklių modelius galima apibrėžti SBML kalbos plėtimu. Sukurtą programinę įrangą galima taikyti automatizuotam skaitiniam daugiapakopių biojutiklių modeliavimui.
3. Sinergetinį matematinį modelį su naujomis regeneracijos kraštinėmis sąlygomis galima pritaikyti skaitiniam sinergetinių daugiapakopių biojutiklių veiklos modeliavimui. Kompiuterinis lakazinio biojutiklio modeliavimas kokybiškai paaikškino ir patvirtino eksperimentiškai stebėtą sinergetinį mediatoriaus įtakos biojutiklio atsakui efektą.
4. Matematinį peroksidazinį optinį biojutiklio modelį galima sėkmingai taikyti tiriant kinetinius biojutiklio atsako ypatumus. Skaitinio modeliavimo rezultatai parodė, kad biojutiklio atsakas yra stabilus santykinai plataus išorinio difuzijos sluoksnio, kuris turi nedidelę įtaka atsakui esant didelėms fermento koncentracijoms, atveju.

Publikacijos disertacijos tema

Publikacijos periodiniuose leidiniuose

- [1A] E. Gaidamauskaitė, R. Baronas, J. Kulys. Modelling Synergistic Action of Laccase-based Biosensor Utilizing Simultaneous Substrates Conversion. *Journal of Mathematical Chemistry*, 49:1573-1586, 2011 [ISI Web of Science].
- [2A] D. Britz, R. Baronas, E. Gaidamauskaitė, F. Ivanauskas. Further Comparisons of Finite Difference Schemes for Computational Modelling of Biosensors. *Nonlinear Analysis: Modelling and Control*, 14(4):419–433, 2009 [ISI Web of Science].
- [3A] E. Gaidamauskaitė, R. Baronas. A Computational Investigation of the Optical Biosensor by a Dimensionless Model. *Informacijos mokslai (Information Sciences)*, 50:306–310, 2009 [LISA].
- [4A] R. Baronas, E. Gaidamauskaitė, J. Kulys. Modelling a Peroxidase-based Optical Biosensor. *Sensors*, 7(11):2723–2740, 2007 [ISI Web of Science].
- [5A] E. Gaidamauskaitė, R. Baronas. A Comparison of Finite Difference Schemes for Computational Modelling of Biosensors. *Nonlinear Analysis: Modelling and Control*, 12(3):359-369, 2007 [INSPEC].

Publikacijos recenzuojamuose konferencijų leidiniuose

- [6A] E. Gaidamauskaitė, R. Baronas. Influence of Spontaneous Convection on Amperometric Biosensor Response. *23rd Nordic Seminar on Computational Mechanics*, Konferencijos pranešimų medžiaga, ISSN 0348-467X, 330–333, 2010.
- [7A] E. Gaidamauskaitė, R. Baronas. Modelling a Peroxidase-based Fluorescent Biosensor. *22nd European Conference on Modelling and Simulation ECMS 2008*, Konferencijos pranešimų medžiaga, ISBN 978-0-9553018-5-8, 152–156, 2008 [ISI Proceedings].
- [8A] E. Gaidamauskaitė, R. Baronas. Computational Modelling of Rotating Disc Enzyme Electrode. *20th Nordic Seminar on Computational Mechanics*, Konferencijos pranešimų medžiaga, ISSN 1652-8549, 2007.
- [9A] E. Gaidamauskaitė, R. Baronas. Automatizuotas biojutiklių kompiuterinių modelių sudarymas (The development of computer models for amperometric biosensors). *Informacinės technologijos 2007*, Konferencijos pranešimų medžiaga, ISSN 1822-6337, 359–363, 2007.

- [10A] E. Gaidamauskaitė. The Development of Computer Models for the Biosensors. *PhD Summer School "Formal Methods for System Analysis in Informatics"*, Konferencijos pranešimų medžiaga, ISBN 978-9955-591-49-8, 15–18, 2007.
- [11A] E. Gaidamauskaitė, R. Baronas. Baigtinių skirtumų metodo taikymas biojutiklio veiksmui modeliuoti. *Informacinės technologijos 2006*, Konferencijos pranešimų medžiaga, ISBN 9955-09-993-3, 527–531, 2006.

Trumpos žinios apie autorę

Evelina Gaidamauskaitė gimė 1982 m. liepos 25 d. Vilniuje. 2004 m. baigė Vilniaus universiteto Matematikos ir informatikos fakultetą ir įgijo informatikos bakalauro laipsnį (BSc). 2006 m. įgijo informatikos magistro laipsnį su pagyrimu (MSc, Cum laude) Vilniaus universitete. Nuo 2006 iki 2010 m. - Vilniaus universiteto informatikos doktorantė.

2008-2010 metais E. Gaidamauskaitė dirbo asistente Vilniaus universitete. Vedė informatikos ir duomenų bazių valdymo sistemų pratybas bei recenzavo magistro darbus. Nuo 2003 metų autorė taip pat dirbo konsultante ir analitike finansinėse institucijose.

Autorė buvo dukart apdovanota Lietuvos valstybinio mokslo ir studijų fondo doktorantų mokslinių tyrimų stipendija (2008 ir 2010 metais). Taip pat E. Gaidamauskaitė laimėjo ECCOMAS konferencijos „5th European Congress on Computational Methods in Applied Sciences and Engineering (ECCOMAS 2008)“ stipendiją.

2007 metais E. Gaidamauskaitė dalyvavo dvejose doktorantų mokyklose: Lietuvoje ir Ispanijoje.

Summary

Biosensors are analytical devices made up of a combination of a biological entity, usually an enzyme, that recognizes a specific analyte (substrate) and the transducer that translates the biorecognition event into a signal. In order to create new types of biosensors the corresponding experimental studies are necessary. Computational experiments could very well replace very expensive physical ones. However, the multi-step character of a chemical reaction scheme must be considered and modeled accordingly. In this thesis such reaction schemes were studied in great details. Original mathematical models were developed for optical peroxidase-based and amperometric laccase-based biosensors. The deterministic nature of model construction allows the automated models to be built. Based on this assumption flexible model for computational modeling of different practical multistep biosensors was developed. In order to optimize the numerical solution of the reaction-diffusion type equations common finite difference schemes were compared. The comparison shows that the fastest schemes to achieve the required relative error are implicit and Hopscotch schemes. For the problems where accuracy is not a significant factor but the speed is, the simplest explicit scheme should be used. Applying the new flexible model a computational modeling of the multi-step biosensors were produced. The modeling of laccase biosensor explained and confirmed the synergistic effect. The computational modeling of the optical biosensor indicated that response is highly stable at the relatively thick external diffusion layer, which has little effect on the response at high enzyme concentrations.

Literatūra

- [1] P. Ahuja. *Introduction to Numerical Methods in Chemical Engineering*. PHI Learning Pvt. Ltd., 2010.
- [2] C. Amatore, A. Oleinick, I. Svir, N. da Mota, and L. Thouin. Theoretical modeling and optimization of the detection performance: a new concept for electrochemical detection of proteins in microfluidic channels. *Nonlinear Analysis: Modelling and Control*, 11(4):345–365, 2006.
- [3] R. Aris. *The Mathematical Theory of Diffusion and Reaction in Permeable Catalysts. The Theory of the Steady State*. Clarendon Press, 1975.
- [4] F. Baldini and North Atlantic Treaty Organization. *Optical chemical sensors*. Springer, 2006.
- [5] R. Baronas, F. Ivanauskas, and J. Kulys. *Mathematical Modeling of Biosensors*. Springer-Verlag, 2009.
- [6] F. Barriere, P. Kavanagh, and D. Leech. A laccase-glucose oxidase biofuel cell prototype operating in a physiological buffer. *Electrochimica Acta*, 51(24):5187–5192, 2006.
- [7] D. Britz. *Digital Simulation in Electrochemistry*. Springer-Verlag, 2005.
- [8] P. W. Carr and L. D. Bower. *Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry: Fundamentals and Applications*. John Wiley, 1980.
- [9] A. Chaubey and B. D. Malhotra. Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(6-7):441–456, 2002.
- [10] M.J. Cooney, V. Svoboda, C. Lau, G. Martina, and S. D. Minteer. Enzyme catalysed biofuel cells. *Energy Environmental Science*, 1(3):320–337, 2008.
- [11] A. Cornish-Bowden. *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. Portland Press, 2004.
- [12] J. Crank and P. Nicolson. A practical method for numerical evaluation of solutions of partial differential equations of the heat conduction type. *Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, 43(1):50–64, 1947.
- [13] R. S. Freire, C. A. Pessoa, L. D. Mello, and L. T. Kubota. Direct electron transfer: An approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14(2):230–243, 2003.
- [14] W. Gander and J. Hrebicek. *Solving Problems in Scientific Computing Using Maple and MATLAB*. Springer-Verlag, 2004.

-
- [15] J. P. Kernevez. *Enzyme Mathematics. Studies in Mathematics and its Applications*. Elsevier Science, 1980.
- [16] G.K. Knopf and A.S. Bassi. *Smart biosensor technology*. CRC Press/Taylor & Francis, 2007.
- [17] J. Kulys. The development of new analytical systems based on biocatalysts. *Analytical Letters*, 14(6):377–397, 1981.
- [18] J. Kulys and R. Vidžiūnaitė. Laccase based synergistic electrocatalytical system. *Electroanalysis*, 21(20):2228–2233, 2009.
- [19] R. J. Leatherbarrow and P. R. Edwards. Analysis of molecular recognition using optical biosensors. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3(5):544–547, 1999.
- [20] M. E. G. Lyons, J. Murphy, and S. Rebouillat. Theoretical analysis of time dependent diffusion, reaction and electromigration in membranes. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 4(8):458–472, 2000.
- [21] Bansi D. Malhotra and Asha Chaubey. Biosensors for clinical diagnostics industry. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 91(1-3):117–127, 2003.
- [22] A. Meena, A. Eswari, and L. Rajendran. Mathematical modelling of enzyme kinetics reaction mechanisms and analytical solutions of non-linear reaction equations. *Journal of Mathematical Chemistry*, 48(2):179–186, 2010.
- [23] S. Merino, M. Grinfeld, and S. McKee. A degenerate reaction diffusion system modelling an optical biosensor. *Zeitschrift für angewandte Mathematik und Physik*, 49(1):46–85, 1998.
- [24] O.V. Morozova, G.P. Shumakovich, M. A. Gorbacheva, S. V. Shleev, and A. I. Yaropolov. "Blue" laccases. *Biochemistry (Moscow)*, 72(10):1136–1150, 2007.
- [25] C. B. Ojeda and F. S. Rojas. Recent development in optical chemical sensors coupling with flow injection analysis. *Sensors*, 6(10):1245–1307, 2006.
- [26] V. M. N. Passaro, F. Dell’olio, B. Casamassima, and F. De Leonardis. Guided-wave optical biosensors. *Sensors*, 7(4):508–536, 2007.
- [27] J. L. Rickus. Impact of coenzyme regeneration on the performance of an enzyme based optical biosensor: a computational study. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(6):965–972, 2005.
- [28] N. J. Ronkainen, H. B. Halsall, and W. R. Heineman. Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39(5):1747–1763, 2010.
- [29] A. A. Samarskii. *The Theory of Difference Schemes*. Marcel Dekker, 2001.

- [30] V. Sanz, S. de Marcos, and J. Galbán. Direct glucose determination in blood using a reagentless optical biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(12):2876–2883, 2007.
- [31] F. Scheller and F. Schubert. *Biosensors*. Elsevier, 1992.
- [32] T. Schulmeister. Mathematical modelling of the dynamic behaviour of amperometric enzyme electrodes. *Selective Electrode Reviews*, 12(2):203–260, 1990.
- [33] V. Scognamiglio, G. Pezzotti, I. Pezzotti, J. Cano, K. Buonasera, D. Giannini, and M. Giardi. Biosensors for effective environmental and agrifood protection and commercialization: from research to market. *Microchimica Acta*, 170:215–225, 2010.
- [34] K. Servat, S. Tingry, L. Brunel, S. Querelle, M. Cretin, C. Innocent, C. Jolival, and M. Rolland. Modification of porous carbon tubes with enzymes: Application for biofuel cells. *Journal of Applied Electrochemistry*, 37(1):121–127, 2007.
- [35] Ioan Stamatina, C. Berlic, and A. Vaseashta. On the computer-aided modelling of analyte-receptor interactions for an efficient sensor design. *Thin Solid Films*, 495(1-2):312–315, 2006.
- [36] L. De Stefano, P. Arcari, A. Lamberti, C. Sanges, L. Rotiroti, I. Rea, and I. Rendina. DNA optical detection based on porous silicon technology: from biosensors to biochips. *Sensors*, 7(2):214–221, 2007.
- [37] L. Strömbäck, V. Jakonienė, H. Tan, and P. Lambrix. Representing, storing and accessing molecular interaction data: a review of models and tools. *Briefings in Bioinformatics*, 7(4):331–338, 2006.
- [38] D. R. Thévenot, R. P. Buck, K. Cammann, R. A. Durst, K. Toth, and G. S. Wilson. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification (technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 71(12):2333–2348, 1999.
- [39] A. P. F. Turner, I. Karube, and G. S. Wilson. *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, 1987.
- [40] S. Viswanathan, H. Radecka, and J. Radecki. Electrochemical biosensors for food analysis. *Monatshefte für Chemie*, 140(8):891–899, 2009.
- [41] T. Vo-Dinh. *Biomedical Photonics Handbook*. CRC Press LLC, 2003.
- [42] J. Wang. *Analytical Electrochemistry*. Springer - Verlag, 1988.
- [43] U. Wollenberger, F. Lisdat, and F. W. Scheller. *Frontiers in Biosensorics 2. Practical Applications*. Birkhauser Verlag, 1997.
- [44] B. Wu, Y. Wang, J. Li, Z. Song, J. Huang, X. Wang, and Q. Chen. An optical biosensor for kinetic analysis of soluble Interleukin-1 receptor I binding to immobilized Interleukin-1 α . *Talanta*, 70(3):485–488, 2006.

- [45] D. Yu, B. Blankert, J. C. Virè, and J. M. Kauffmann. Biosensors in drug discovery and drug analysis. *Analytical Letters*, 38(11):1687–1701, 2005.