

УДК 51-76

Задача восстановления параметров математических моделей ферментативной кинетики

**Винокуров В.А., Дёмин О.В., Метёлкин Е.А.,
Печенцов А.С., Садовнический В.А.**

В настоящей работе рассматриваются математические модели ферментативного катализа, описывающие изменение во времени концентраций веществ в клетках живых организмов. Математический инструмент описания — системы обыкновенных дифференциальных уравнений, где вектор решения состоит из концентраций взаимодействующих веществ. Правые части этих систем строятся по известным правилам, но содержат числовые параметры, определяющие свойства отдельного интермедиата. Рассмотрена задача о восстановлении значений этих параметров по экспериментальным данным. Описан объём экспериментальной информации, необходимой и достаточной для полного определения параметров системы.

При решении этой биохимической задачи создан новый метод многомерной полиномиальной интерполяции — метод многомерной разностной интерполяции, представляющий общематематическую ценность. Метод основан на впервые публикуемой здесь математической теореме о совпадении значений дифференциального и соответствующего разностного оператора при вычислении старших коэффициентов полинома.

§ 1. Разрешимость задачи восстановления параметров

§ 1.1. Введение

Последние десятилетия были ознаменованы значительным увеличением объема биологической информации. Появление нового поко-

ления измерительной аппаратуры и новых методик измерения [1, 2, 3] позволило многократно повысить эффективность измерений, и в конечном итоге привело к своего рода «информационному взрыву». В самом деле, за последние десятилетия был расшифрован геном множества бактерий, животных и даже человека, получены исчерпывающие данные о протеоме множества организмов, делаются попытки охарактеризовать метаболом. Такой, своего рода экстенсивный путь развития биологии зачастую ставил исследователей в тупик, заставляя изобретать новые методы анализа и обработки получаемых данных.

Такое положение вещей стимулировало появление новых отраслей биологической науки: биоинформатика, геномика, протеомика и метаболомика, которые сортируют, систематизируют и классифицируют полученную биологическую информацию. Тем не менее, классифицировать и систематизировать — это не значит понять механизм функционирования. Информация о геноме (протеоме, метаболоме и т.д.) какого-либо организма не в состоянии напрямую дать ответ, как этот организм будет отвечать на те или иные воздействия. Более того, обладая всей этой информацией, мы не способны управлять живым организмом как инженерной системой, то есть, вносить какие-то изменения в его организацию (генетические модификации) и знать заранее, какие изменения произойдут в поведении этого организма или, по крайней мере, в той частной биохимической системе, которая была изменена.

Одним из претендентов на создание универсального хранилища разнородной биологической информации, привлекающего в последнее время все больший интерес, является подход, конструирующий некий «математический образ» рассматриваемой биологической системы. Такого рода методы формируют универсальный язык между биологами и представителями других наук (физиками, математиками, инженерами), и что особенно важно, могут являться инструментом для предсказания поведения биологических систем. Именно этим занимается отрасль биологии называемая «системной биологией», которая применяет различные математические инструменты для того, чтобы сконструировать математическую модель, способную описать ту или иную рассматриваемую биологическую систему.

Для описания биохимических систем, поведение которых характеризуется изменениями концентраций метаболитов, из которых состоит эта система, от времени сегодня применяется математический аппарат обыкновенных дифференциальных уравнений. Такие математические модели называются «кинетическими» [4, 5, 6, 7, 8, 9], так

как позволяют понять, описать и предсказать поведение биохимической системы во времени. В самом деле, биохимическая система представляет собой совокупность внутриклеточных веществ, которые могут превращаться друг в друга в процессе биохимических реакций, катализируемых внутриклеточными катализаторами – ферментами. Кинетическая модель этой системы представляет собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений [10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17]. Переменными являются концентрации всех метаболитов рассматриваемой системы. Изменения концентраций во времени задается правыми частями системы уравнений, которые представляют собой линейные комбинации скоростей реакций, входящих в рассматриваемую биохимическую систему. Функции, задающие скорости, зависят от концентраций метаболитов и параметров модели и являются обычно рациональными функциями концентраций [18].

Для того чтобы модель имела предсказательную силу, то есть решения системы уравнений отражали характерные черты поведения соответствующей ей биохимической системы, параметры, входящие в функцию скорости, должны быть выбраны таким образом, чтобы решения системы согласовывались со всеми имеющимися экспериментальными данными. Это значит, что в процессе конструирования и верификации модели вся значимая информация о биохимической системе может быть трансформирована в значения параметров этой модели. Таким образом, модель может выступать в качестве хранилища всей доступной информации о рассматриваемой биологической системе, причем, это хранилище (то есть модель) обладает предсказательной силой.

Кинетическое моделирование используют многие специалисты, занимающиеся системной биологией. Несмотря на это, строгих математических обоснований такой стратегии работы с экспериментальными данными разработано не было. В самом деле, без ответа остаются следующие вопросы. Верно ли, что набор значений параметров модели, идентифицированный на основе имеющихся экспериментальных данных, является единственным? Какой набор экспериментальных данных гарантирует единственность идентификации параметров модели? Какая взаимосвязь между погрешностью используемых экспериментальных данных и точностью идентификации параметров модели?

Для того чтобы ответить на эти и другие подобные вопросы необходимо:

- 1) Разработать подход к точной и однозначной идентификации параметров кинетических моделей. В рамках этого подхода долж-

ны быть сформулированы и доказаны теоремы определяющие минимальный набор экспериментальных данных, достаточный для идентификации параметров моделей.

- 2) Определить связь между погрешностью используемых экспериментальных данных и точностью восстановления параметров модели.

Разработка нового подхода к идентификации параметров разделяется на два этапа. Это разделение обусловлено наличием двух типов количественных экспериментальных данных, используемых для верификации:

а) зависимость начальной скорости функционирования отдельных ферментов от концентрации их субстратов, продуктов, активаторов и ингибиторов, измеренные в *in vitro* экспериментах;

б) зависимость концентраций и скоростей ферментативных реакций от времени, измеренные в *in vitro* или *in vivo* экспериментах.

Кинетическая модель, описывающая первый тип экспериментальных данных а), представляет собой функцию скорости ферментативной реакции, определённую на основе информации о каталитическом цикле фермента. В общем случае, функция скорости реакции является дробно-рациональной функцией от концентраций субстратов, продуктов, ингибиторов и активаторов рассматриваемого фермента.

Кинетическая модель, описывающая второй тип экспериментальных данных б), представляет собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений. Переменными этой системы уравнений являются концентрации интермедиатов, рассматриваемой системы, а правая часть этой системы представляет собой произведение стехиометрической матрицы на вектор скоростей ферментативных реакций.

Настоящая работа является первой попыткой разработать набор четких критериев к построению математических моделей ферментативных процессов в клетке. В первой части статьи мы сформулировали, что представляет собой кинетическая модель, то есть свели задачу к строгим математическим терминам. Для кинетической модели отдельного фермента мы указали набор экспериментальных данных, необходимых для верификации модели. При наличии такого набора данных оказалось, что задачу верификации модели можно сформулировать как задачу поиска коэффициентов полинома, восстанавливаемых однозначно.

§ 1.2. Формулировка математической модели

Система обыкновенных дифференциальных уравнений химической кинетики

Основными экспериментально измеряемыми величинами, используемыми при описании процессов в клетке, являются концентрации химических веществ в различные моменты времени. С математической точки зрения, соответствующая система описывается вектор-функцией $x = x(t)$, где x есть n -мерный вектор с неотрицательными вещественными компонентами, а t — время. Динамику изменений концентраций во времени в данной области исследований на сегодня принято описывать следующей системой нелинейных дифференциальных уравнений

$$\dot{x} = f(x, p), \quad (1.1)$$

на интервале времени $[0, T]$ с начальным условием в момент $t = 0$ вида

$$x(0) = x_0. \quad (1.2)$$

Далее через \mathbf{R} мы обозначаем поле вещественных чисел, через $\mathbf{R}_+ \equiv [0, +\infty[$ — открытую правую полупрямую, а через $\mathbf{H} \equiv [0, +\infty[$ — замкнутую правую полупрямую. Поскольку концентрации веществ — величины неотрицательные, то далее предполагается, что вектор $x \in \mathbf{H}^n$. Вектор $p \in \mathbf{H}^k$ есть k -мерный вектор неотрицательных числовых параметров реакций.

Отображение $f : \mathbf{H}^n \times \mathbf{H}^k \rightarrow \mathbf{R}^n$, определяющее вид системы n обыкновенных дифференциальных уравнений (1.1), в данной модели полностью определяет динамику конкретной системы во времени. В рассматриваемой ситуации общий вид отображения известен и целью проведения экспериментов является конкретизация отображения f или, говоря точнее, определение числовых значений параметров $p \in \mathbf{H}^k$.

В рассматриваемом классе задач химической кинетики отображение $f(x, p)$ допускает следующее представление

$$f(x, p) = Nv(x, p). \quad (1.3)$$

Здесь N — матрица $n \times m$ с целочисленными элементами, называемая стехиометрической матрицей системы, а отображение $v : \mathbf{H}^n \times \mathbf{H}^k \rightarrow \mathbf{R}^m$ есть вектор скоростей реакций. Каждая компонента $v_i(x, p)$,

$i \in \overline{1, m}$, вектора v , в свою очередь, допускает следующее представление

$$v_i(x, p) = \frac{u_i(x, p)r_i(x, p)}{g_i(x, p)}, \quad (1.4)$$

в котором величины u_i , r_i и g_i — полиномы как функции аргумента $x \in \mathbf{H}^n$. Дополнительно известно, что полиномы $r_i(x, p)$ и $g_i(x, p)$ положительны на всем множестве изменения аргументов $x \in \mathbf{H}^n$ и $p \in \mathbf{H}^k$, а функция $u_i(x, p)$ допускает следующее представление

$$u_i(x, p) = \prod_{N_{ij} < 0} x_j^{|N_{ij}|} - \frac{\prod_{N_{ij} > 0} x_j^{N_{ij}}}{K_{eq}}, \quad (1.5)$$

где N_{ij} — элементы стехиометрической матрицы, и имеет нули по аргументу x внутри области \mathbf{H}^n . Таким образом, нули функции скорости $v_i(x, p)$ совпадают с нулями полинома $u_i(x, p)$. Нули функции скорости имеют химический смысл точек равновесия и определяют-ся из стационарных точек данной реакции, что позволяет определить конкретные значения параметров, входящих в выражение функции $u_i(x, p)$ и конкретный вид полинома $u_i(x, p)$. Мы приходим к задаче об определении параметров p набора рациональных функций вида $\frac{r_i(x, p)}{g_i(x, p)}$ по их значениям в конечном числе точек $x = x_1, x = x_2, \dots, x = x_q$.

Далее мы будем рассматривать одну компоненту функции скорости, индекс i фиксируется и потому опускается.

О некоторых особенностях получения экспериментальной информации

Прежде чем приступить к формулировке требований к набору экспериментальных данных, достаточно для идентификации параметров модели, рассмотрим, какого рода данные в принципе используются для верификации.

В настоящее время экспериментальные данные по кинетике фермента принято представлять как графики зависимости начальных скоростей работы фермента от концентрации одного из метаболитов, участвующих в реакции, при фиксированных значениях концентраций прочих. Такие графики не представляют собой результаты прямых измерений, а являются производными измерений зависимостей концентраций прочих метаболитов.

Рассмотрим кратко схему одного такого эксперимента. Пусть перед исследователем стоит задача изучить кинетику фермента E , осуществляющего следующую обратимую реакцию



то есть исследовать зависимость скорости как функцию концентраций метаболитов

$$v = v(x_1, x_2, x_3, x_4).$$

Эксперименты такого рода, как правило, проводятся в искусственном объеме (*in vitro*).

- 1) Перед началом эксперимента в сосуде содержатся метаболиты в следующих концентрациях $x_1 = x_1^0, x_2 = x_2^0, x_3 = x_4 = 0$. Течение описываемой реакции в отсутствие фермента термодинамически возможно, однако, как правило, идет с ничтожно малой скоростью, то есть характерное время самопроизвольной реакции много больше длительности эксперимента.
- 2) В сосуд добавляется некоторое количество исследуемого фермента, так чтобы его итоговая концентрация была много меньше концентрации субстрата. В растворе течет реакция.
- 3) В различные промежутки времени из объема берутся пробы и делаются измерения концентраций одного или нескольких метаболитов (в нашем случае метаболита x_3). В этом случае экспериментальные данные будут представлены зависимостью, изображенной на рисунке 1. В начальный промежуток времени t_1 скорость работы фермента (кривая наклона) изменяется, после чего фермент переходит в стационарный режим работы (период t_2), в течение которого скорость практически не изменяется. Мы не будем вдаваться в детали нестационарного поведения фермента, которое в настоящее время изучены и объяснены теоретически, обратив свое внимание исключительно на стационарное поведение фермента, которое наиболее легко измеряется и анализируется.

Поскольку концентрация фермента много меньше концентрации субстратов, то за период времени $t_1 + t_2$ концентрации последних не успевают измениться значительно.

$$x_1(t) = x_1^0 - \Delta x,$$

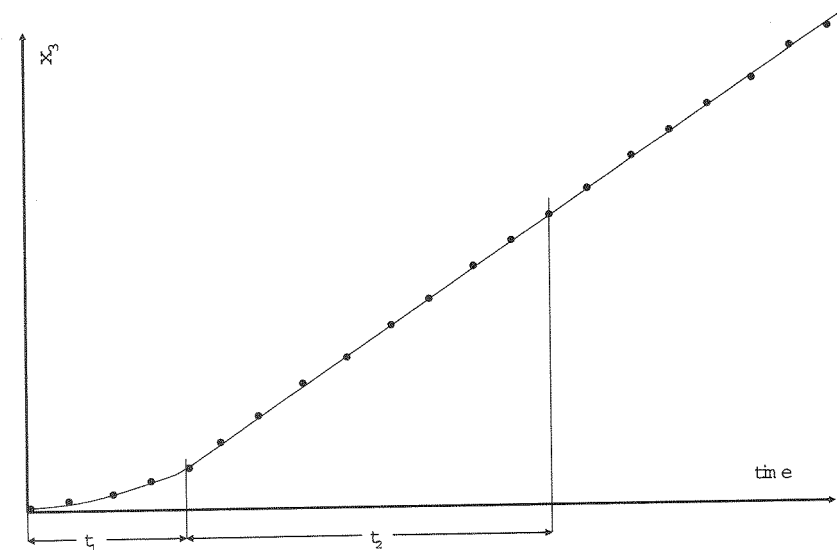


Рис. 1: Экспериментальные точки, описывающие поведение фермента во времени.

$$x_2(t) = x_2^0 - \Delta x,$$

$$x_3(t) = \Delta x,$$

$$x_4(t) = \Delta x,$$

Поэтому в первом приближении ($\Delta x \ll x_1^0, x_2^0$),

$$x_1(t) \approx x_1^0,$$

$$x_2(t) \approx x_2^0,$$

$$x_3(t) \approx 0,$$

$$x_4(t) \approx 0.$$

Таким образом, измерив коэффициент наклона стационарного участка зависимости концентрации от времени, мы получим так называемую начальную скорость при фиксированном значении концентраций метаболитов

$$v^0 = v(x_1^0, x_2^0, 0, 0).$$

- 4) Прделав указанную процедуру при различных значениях концентраций метаболитов мы получим набор k точек, образующих кривую (рис.2)

$$v^k = v(x_1^k, x_2^0, 0, 0).$$

Напомним, что каждая точка графика на рис.2 является ре-

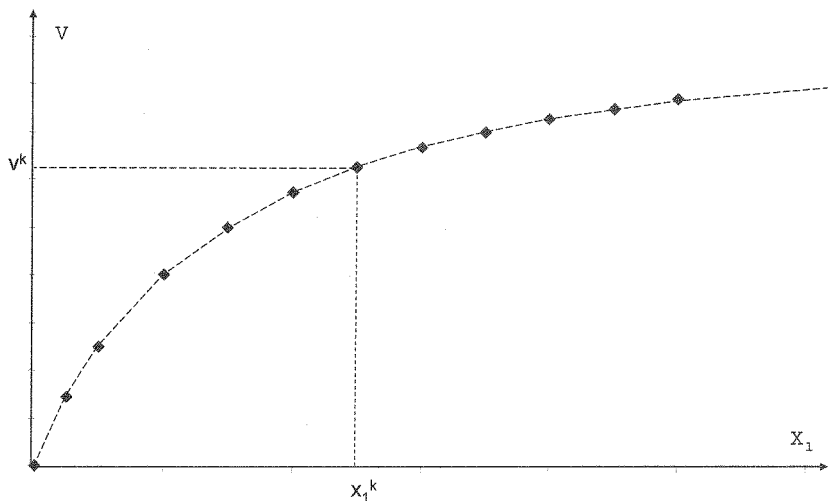


Рис. 2: Экспериментальные точки, полученные из серии экспериментов. Демонстрируют зависимость стационарной скорости реакции в зависимости от концентрации одного из субстратов при фиксированных значениях концентраций прочих метаболитов.

зультатом целой серии экспериментов, описанных выше.

- 5) Указанную процедуру проводят как в прямом, так и в обратном направлении реакции для нескольких значений метаболитов, получая серию кривых.
- 6) Заметим, что не все точки на рисунке 2 являются значимыми, очевидно, что большинство из них можно получить экстраполяцией. Таким образом, если удастся выработать четкие критерии к количеству и качеству измеряемых точек, то удастся не только более точно определить параметры уравнения скорости, но и многократно повысить эффективность и понизить количество необходимых экспериментов.

- 7) Рассмотренная нами экспериментальная методика в принципе позволяет сделать измерения другого рода. Если с момента добавления фермента пройдет достаточно большой промежуток времени, то исследуемая система рано или поздно перейдет в состояние равновесия, то есть состояние, когда скорость работы фермента станет равной нулю. Поскольку нули функции скорости $v(x, p)$ совпадают с нулями функции $u(x, p)$, то приравняв функцию $u(x, p)$ к нулю и подставив измеренные значения равновесных концентраций метаболитов, мы сможем напрямую вычислить константу равновесия реакции K_{eq} . Следует заметить, что константа равновесия, строго говоря, не является характеристикой фермента, поскольку характеризует исключительно термодинамические свойства реакции безотносительно того, каким образом эта реакция осуществлялась. Как следует из предыдущего раздела в принципе экспериментально возможно измерить значения скорости в любой точке пространства метаболитов.

§ 1.3. Задача о восстановлении параметров по известным значениям скорости в нескольких точках

Общий случай рациональной функции скорости

Рассмотрим рациональную функцию вида

$$v(x, p) = \frac{r(x, p)}{g(x, p)}, \quad (1.6)$$

являющуюся отношением двух полиномов $r = r(x, p)$ и $g = g(x, p)$ по аргументу $x \in \mathbf{H}^n$, зависящих также от вектора параметров $p \in \mathbf{H}^k$. Требуется восстановить k -мерный вектор параметров p по измерениям значений функции $v(x, p)$ в точках $x = x_1, x = x_2, \dots, x = x_q$ из \mathbf{H}^n . В общем случае эта задача не имеет решения по той простой причине, что если полиномы $r = r(x)$ и $g = g(x)$ имеют общий множитель $s = s(x)$, т.е. верны представления

$$r(x) = s(x)r_1(x), \quad (1.7)$$

$$g(x) = s(x)g_1(x), \quad (1.8)$$

где $s(x)$, $r_1(x)$, $g_1(x)$ — полиномы по x , то значения отношения $\frac{r(x)}{g(x)} = \frac{r_1(x)}{g_1(x)}$ не зависят от коэффициентов полинома $s(x)$. Одна-

ко в некоторых более частных ситуациях задача о восстановлении коэффициентов полиномов, составляющих рациональную функцию, может иметь решение.

Редукция к случаю полинома

Простейший такой практически важный случай, когда числитель $r(x, p)$ — полином степени нуль, т. е. константа. В этом случае мы рассматриваем задачу о восстановлении рациональной функции вида

$$v(x, p) = \frac{1}{g(x, p)} \quad (1.9)$$

по ее значениям в конечном числе точек. А поскольку в наших условиях полином по x , стоящий в знаменателе, положителен в области изменения переменных $x \in \mathbf{H}^n$, $p \in \mathbf{H}^k$, то мы приходим к задаче о восстановлении коэффициентов полинома некоторой степени m от n переменных по его значениям в конечном числе точек $x_1, x_2, \dots, x_q \in \mathbf{H}^n$. В случае одного переменного $n = 1$ эта задача достаточно проста и хорошо изучена в классической математике. Однако в случае n переменных она требует дополнительного исследования.

§ 1.4. Восстановление коэффициентов полинома от нескольких переменных по его значениям в нескольких точках

Основные обозначения теории функций нескольких переменных

Далее мы будем использовать следующие обозначения. \mathbf{N} — множество натуральных чисел. $\mathbf{N}_0 = \mathbf{N} \cup \{0\}$ — множество натуральных чисел, объединённое с нулём. $\alpha \in \mathbf{N}_0^n$, $\alpha \equiv (\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n)$ — мультииндекс; $|\alpha| \equiv \sum_{i=1}^n \alpha_i$ — длина мультииндекса; $\alpha! \equiv \alpha_1! \alpha_2! \dots \alpha_n!$. Если $x \in \mathbf{R}^n$ и $\alpha \in \mathbf{N}_0^n$, то $x^\alpha \equiv x_1^{\alpha_1} x_2^{\alpha_2} \dots x_n^{\alpha_n}$. Полином степени $m \in \mathbf{N}_0$ от $n \in \mathbf{N}$ переменных в этих обозначениях записывается в виде суммы

$$g(x) = \sum_{\substack{\alpha \in \mathbf{N}_0^n \\ |\alpha| \leq m}} g_\alpha x^\alpha. \quad (1.10)$$

Через $D_i \equiv \frac{\partial}{\partial x_i}$, $i \in \overline{1, n}$ мы обозначаем оператор взятия i -той частной

производной дифференцируемой функции. Если $\alpha \in \mathbf{N}_0^n$ — мультииндекс, то $D^\alpha \equiv D_1^{\alpha_1} D_2^{\alpha_2} \dots D_n^{\alpha_n}$, а через $f^{(\alpha)}(a) \equiv D_1^{\alpha_1} D_2^{\alpha_2} \dots D_n^{\alpha_n} f(x)|_a$ обозначается частная производная порядка $\alpha \in \mathbf{N}_0^n$ функции f в точке a . Через $L_i, i \in \overline{1, n}$, мы обозначаем оператор взятия i -той частной разности. Если $\alpha \in \mathbf{N}_0^n$ — мультииндекс, то $L^\alpha \equiv L_1^{\alpha_1} L_2^{\alpha_2} \dots L_n^{\alpha_n}$.

Основная теорема и её следствия

Пусть $a \in \mathbf{H}^n$ — некоторая точка, тогда полином $g(x)$ степени m представим по формуле Тейлора

$$g(x) = \sum_{\substack{\alpha \in \mathbf{N}_0^n \\ |\alpha| \leq m}} \frac{g^{(\alpha)}(a)}{\alpha!} (x-a)^\alpha. \quad (1.11)$$

т. е. для коэффициентов разложения полинома $g(x)$ с центром в точке 0

$$g(x) = \sum_{\substack{\alpha \in \mathbf{N}_0^n \\ |\alpha| \leq m}} g_\alpha(0) x^\alpha \quad (1.12)$$

справедливо представление

$$g_\alpha(0) = \frac{g^{(\alpha)}(0)}{\alpha!}. \quad (1.13)$$

Используя формулу (1.13), мы вычислим коэффициенты g_α полинома $g(x)$, если вычислим значения производных $g^{(\alpha)}(0)$ через значения полинома $g(x)$ в конечном числе точек. Но последнее вычисление мы проведем, используя следующую теорему (готовится к печати — см. [19]).

ТЕОРЕМА 1. [Винокуров В.А., Садовничий В.А.] Пусть $g(x)$ — полином степени $m \in \mathbf{N}_0$, и $\alpha \in \mathbf{N}_0^n$ — мультииндекс такой, что $|\alpha| = m$, тогда верно равенство

$$L^\alpha g(x) = D^\alpha g(x) = \text{const}. \quad (1.14)$$

СЛЕДСТВИЕ 1. Коэффициенты любого полинома от нескольких переменных однозначно восстанавливаются по его значениям в конечном числе точек.

Теорема 1 дает практический алгоритм восстановления полинома от нескольких переменных по его значениям в нескольких точках, оптимальный по числу точек.

§ 1.5. Математические и химические параметры системы

Согласно пункту 1 каждая компонента $v_i(x, p)$ вектора скорости реакций в нашей модели представляется формулой (1.4) через три полинома. Таким образом, функция скорости определяется заданием коэффициентов трёх полиномов $u_i(x, p)$, $r_i(x, p)$, $g_i(x, p)$. Следовательно из эксперимента мы можем, в лучшем случае, определить коэффициенты этих полиномов, а затем, зная выражения этих коэффициентов через параметры p мы должны восстановить сами исходные параметры. Далее мы будем называть k числовых параметров, составляющих вектор p — *химическими* параметрами, а коэффициенты полиномов по x вида $u_i(x, p)$, $r_i(x, p)$, $g_i(x, p)$ — *математическими* параметрами. Итак, рассмотрев вопрос о возможности и единственности восстановления математических параметров, мы должны далее рассмотреть вопрос о восстановлении химических параметров по математическим.

С этой целью мы рассмотрим два примера конкретных функций скорости. В первом примере функция скорости задаётся 12 математическими параметрами, которые выражаются через 11 химических параметров, причём и наоборот — 11 химических параметров выражаются через 12 математических параметров явными формулами. Т.е. в первом примере химические параметры однозначно восстанавливаются по известным математическим параметрам. Во втором примере функция скорости содержит больше химических параметров, чем математических, поэтому однозначное восстановление химических параметров по известным математическим параметрам невозможно.

§ 1.6. Пример 1

Запись функции скорости реакции в химических обозначениях

Рассмотрим пример функции скорости для ферментативной реакции, осуществляемой по механизму Ordered Bi-Bi (Cleland classification), широко распространённому в практически важных случаях. В реакции участвуют 4 метаболита, функция скорости имеет вид:

$$v = \frac{u}{g}, \quad (1.15)$$

где числитель есть однородный полином второго порядка вида

$$u = V_f \cdot V_r \left(A \cdot B - \frac{P \cdot Q}{K_{eq}} \right), \quad (1.16)$$

а знаменатель — полином третьего порядка, $m = 3$, вида

$$\begin{aligned}
 g = & V_r \cdot K_{iA} \cdot K_{mB} + V_r \cdot K_{mB} \cdot A + V_r \cdot K_{mB} \cdot B + \\
 & + \frac{V_f \cdot K_{mQ} \cdot P}{K_{eq}} + \frac{V_f \cdot K_{mP} \cdot Q}{K_{eq}} + V_r \cdot A \cdot B + \\
 & + \frac{V_f \cdot K_{mP} \cdot A \cdot P}{K_{eq} \cdot K_{iA}} + \frac{V_f \cdot P \cdot Q}{K_{eq}} + \frac{V_r \cdot K_{mA} \cdot B \cdot Q}{K_{iQ}} + \\
 & + \frac{V_r \cdot A \cdot B \cdot P}{K_{iP}} + \frac{V_f \cdot B \cdot P \cdot Q}{K_{iB} \cdot K_{eq}}.
 \end{aligned} \quad (1.17)$$

Здесь $x_1 \equiv A$, $x_2 \equiv B$, $x_3 \equiv P$, $x_4 \equiv Q$ — концентрации 4 компонентов реакции, а 11 величин

$$V_r, V_f, K_{eq}, K_{iA}, K_{mB}, K_{mA}, K_{mQ}, K_{mP}, K_{iQ}, K_{iP}, K_{iB}, \quad (1.18)$$

— химические параметры системы.

Переход к стандартным математическим обозначениям

В математических обозначениях полиномы u и g запишем в виде

$$u(x, p) = x_1 x_2 - u_{2,34} x_3 x_4, \quad (1.19)$$

$$\begin{aligned}
 g(x, p) = & g_0 + g_{1,1} x_1 + g_{1,2} x_2 + g_{1,3} x_3 + g_{1,4} x_4 + \\
 & + g_{2,12} x_1 x_2 + g_{2,13} x_1 x_3 + g_{2,24} x_2 x_4 + g_{2,34} x_3 x_4 + \\
 & + g_{3,123} x_1 x_2 x_3 + g_{3,234} x_2 x_3 x_4.
 \end{aligned} \quad (1.20)$$

Итак, 12 математических параметров

$$u_{2,34}, g_0, g_{1,1}, g_{1,2}, g_{1,3}, g_{1,4}, g_{2,12}, g_{2,13}, g_{2,24}, g_{2,34}, g_{3,123}, g_{3,234}, \quad (1.21)$$

— коэффициентов полиномов u и g , следующим образом выражаются через 11 исходных химических параметров:

$$\begin{aligned}
 u_{2,34} &= \frac{1}{K_{eq}}; & g_{2,12} &= \frac{1}{V_f}, \\
 g_0 &= \frac{K_{iA} K_{mB}}{V_f}, & g_{2,13} &= \frac{K_{mQ}}{V_r K_{eq} K_{iA}}, \\
 g_{1,1} &= \frac{K_{mB}}{V_f}, & g_{2,24} &= \frac{K_{mA}}{V_f K_{iQ}},
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} g_{1,2} &= \frac{K_{mA}}{V_f}, & g_{2,34} &= \frac{1}{V_r K_{eq}}, \\ g_{1,3} &= \frac{K_{mQ}}{V_r K_{eq}}, & g_{3,123} &= \frac{1}{V_f K_{iP}}, \\ g_{1,4} &= \frac{K_{mP}}{V_r K_{eq}}, & g_{3,234} &= \frac{1}{V_r K_{iB} K_{eq}}. \end{aligned}$$

Если определены 12 математических параметров (1.21) то далее 11 химических параметров (1.18) следующим образом выражаются через 12 математических параметров

$$\begin{aligned} K_{eq} &= \frac{1}{u_{3,34}}, \quad V_f = \frac{1}{g_{2,12}}, \quad K_{mB} = \frac{g_{1,1}}{g_{2,12}}, \quad K_{mA} = \frac{g_{1,2}}{g_{2,12}}, \\ K_{iQ} &= \frac{g_{1,2}}{g_{2,24}}, \quad K_{iP} = \frac{g_{2,12}}{g_{3,123}}, \quad V_r = \frac{u_{3,34}}{g_{2,34}}, \\ K_{iB} &= \frac{g_{2,34}}{g_{3,234}}, \quad K_{iA} = \frac{g_0}{g_{1,1}}, \quad K_{mQ} = \frac{g_{1,3}}{g_{2,34}}, \quad K_{mP} = \frac{g_{1,4}}{g_{2,34}}. \end{aligned}$$

Вывод: 11 химических параметров (1.18) однозначно выражаются через 12 математических параметров (1.21).

Процедура восстановления коэффициентов полинома по его значениям

В данном примере у полинома степени 3 от 4 переменных $g(x)$ отлично от нуля только 11 параметров и согласно теореме об обратной функции (см. [20, стр. 679]) в ситуации общего положения для их определения можно ограничиться измерением значений полинома только в 11 точках.

Проверим, что следующий выбор точек решает поставленную задачу. А именно, сначала выбираются 7 точек $M_1, M_2, \dots, M_7 \in \mathbf{H}^3$, лежащих в плоскости $x_4 = 0$, а затем 4 точки $M_8, M_9, M_{10}, M_{11} \in \mathbf{H}^3$, лежащие в плоскости $x_1 = 0$. Точки $M_1, M_2, \dots, M_7 \in \mathbf{H}^3$ имеют вид

$$\begin{aligned} M_1 &= z \cdot (1, 1, 1, 0) \\ M_2 &= z \cdot (2, 1, 1, 0) \\ M_3 &= z \cdot (1, 2, 1, 0) \\ M_4 &= z \cdot (1, 1, 2, 0) \\ M_5 &= z \cdot (2, 2, 1, 0) \\ M_6 &= z \cdot (2, 1, 2, 0) \end{aligned}$$

$$M_7 = z \cdot (1, 2, 2, 0),$$

где $z \in \mathbf{R}_+$ — произвольный положительный параметр. Точки M_8 – M_{11} имеют вид

$$M_8 = z \cdot (0, 1, 1, 1)$$

$$M_9 = z \cdot (0, 2, 1, 1)$$

$$M_{10} = z \cdot (0, 1, 2, 1)$$

$$M_{11} = z \cdot (0, 2, 2, 2),$$

где $z \in \mathbf{R}_+$ — произвольный положительный параметр.

Полагаем $y_i \equiv g(M_i)$, $i \in \overline{1, 11}$, — значения полинома g в точках M_i . Решая линейную систему 11 уравнений для 11 коэффициентов полинома $g(x)$ вида

$$g(M_i) = y_i, \quad i \in \overline{1, 11}, \quad (1.22)$$

получаем следующие выражения для коэффициентов полинома через его значения в точках M_1, M_2, \dots, M_{11} :

$$g_0 = y_6 + y_5 - 2y_4 - 2y_3 - 3y_2 + 6y_1$$

$$g_{1,1} = \frac{1}{z} (y_7 - y_6 - y_5 + 3y_2 - 2y_1)$$

$$g_{1,2} = \frac{1}{z} (-y_5 + 2y_3 + y_2 - 2y_1)$$

$$g_{1,3} = \frac{1}{z} (-y_6 + 2y_4 + y_2 - 2y_1)$$

$$g_{1,4} = \frac{1}{z} (y_8 - y_6 - y_5 + 2y_4 + 2y_3 + 3y_2 - 6y_1)$$

$$g_{2,12} = \frac{1}{z^2} (-y_7 + y_5 + y_4 - y_2)$$

$$g_{2,13} = \frac{1}{z^2} (-y_7 + y_6 + y_3 - y_2)$$

$$g_{2,24} = \frac{1}{z^2} (y_9 - y_8 + y_5 - 2y_3 - y_2 + 2y_1)$$

$$g_{2,34} = \frac{1}{z^2} (y_{10} - y_8 + y_6 - 2y_4 - y_2 + 2y_1)$$

$$g_{3,123} = \frac{1}{z^3} (y_7 - y_4 - y_3 + y_1)$$

$$g_{3,234} = \frac{1}{z^3} (y_{11} - y_{10} - y_9 + y_8).$$

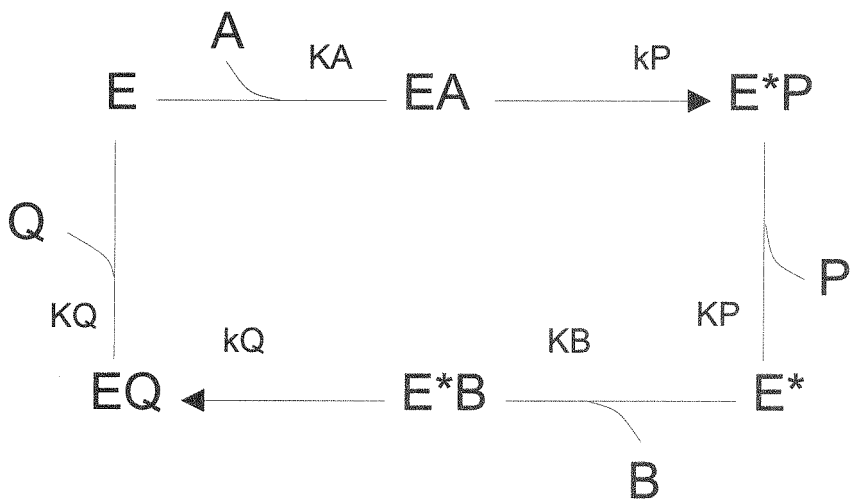


Рис. 3: Каталитический цикл фермента, работающего по механизму Ping-Pong Bi-Bi [1].

Следующий пример иллюстрирует, что не всегда в уравнениях скорости можно однозначно восстановить химические параметры по известным математическим параметрам. В самом деле, мы рассмотрим уравнение скорости с 5-ю математическими параметрами, в котором фигурируют 6 химических параметров. Эти два примера иллюстрируют следующий вывод: восстановление математических параметров на основе экспериментальных данных не гарантирует однозначного восстановления химических параметров уравнения скорости.

§ 1.7. Пример 2

Рассмотрим каталитический цикл работы фермента, изображенный на рисунке 3. В соответствии с классификацией Клеянда [21, ВВА, 1963] механизм этой ферментативной реакции может быть отнесен к Bi Bi Ping Pong Quasi Equilibrium. В рамках этого механизма стадии присоединения субстратов A и B , а также стадии диссоциации продуктов P и Q являются квазиравновесными и характеризуются следующими константами диссоциации: K_A , K_B , K_P и K_Q , соответственно. Кроме того, каталитические стадии являются необратимыми и характеризуются константами скорости k_1 и k_2 .

Запись функции скорости реакции в химических обозначениях

Применяя методы вывода уравнений скорости, описанные в [21], мы получим уравнение (19), функции u и g которого задаются следующим образом:

$$u = e_0 AB, \quad (1.23)$$

$$g = \frac{AK_B}{k_2} + \frac{BK_A}{k_1} + \frac{AB(k_1 + k_2)}{k_1 k_2} + \frac{APK_B}{k_2 K_P} + \frac{BQK_A}{k_1 K_Q}. \quad (1.24)$$

Здесь, e_0 обозначает полную концентрацию фермента, A , B , P и Q — концентрации субстратов и продуктов, а величины K_A , K_B , K_P , K_Q , k_1 и k_2 представляют собой химические параметры.

Переход к стандартным математическим обозначениям

Положив $x_1 = A$, $x_2 = B$, $x_3 = P$, $x_4 = Q$, можно переписать выражения (1.23, 1.24) для полиномов u и g в стандартных математических обозначениях:

$$u = u_{2,12} \cdot x_1 \cdot x_2, \quad (1.25)$$

$$g = g_{1,1} \cdot x_1 + g_{1,2} \cdot x_2 + g_{2,12} \cdot x_1 \cdot x_3 + g_{2,24} \cdot x_2 \cdot x_4. \quad (1.26)$$

Шесть математических параметров $u_{2,12}$, $g_{1,1}$, $g_{1,2}$, $g_{2,12}$, $g_{2,13}$, $g_{2,24}$ могут быть выражены через семь химических параметров: полную концентрацию фермента e_0 и шесть химических параметров K_A , K_B , K_P , K_Q , k_1 , k_2 , — следующим образом:

$$u_{2,12} = e_0,$$

$$g_{1,1} = \frac{K_B}{k_2},$$

$$g_{1,2} = \frac{K_A}{k_1},$$

$$g_{2,12} = \frac{1}{k_1} + \frac{1}{k_2},$$

$$g_{2,13} = \frac{K_B}{k_2 K_P},$$

$$g_{2,24} = \frac{K_A}{k_1 K_Q}.$$

Наоборот, 7 химических параметров $e_0, K_A, K_B, K_P, K_Q, k_1, k_2$, невозможно выразить через 6 математических параметров $u_{2,12}, g_{1,1}, g_{1,2}, g_{2,12}, g_{2,13}, g_{2,24}$.

§ 1.8. Математические выводы

Итак, в рассматриваемом общем классе реакций, скорости которых описываются рациональными функциями, восстановление параметров реакций по измерениям скоростей реакции в конечном числе точек в ситуации общего положения может иметь не единственное решение. Тем не менее, указан более узкий класс реакций, для которых восстановление параметров возможно и единственно. Построен новый алгоритм разностной интерполяции полиномов многих переменных, на основе которого строится оптимальный метод восстановления параметров системы.

В общем же классе реакций, скорости которых описываются рациональными функциями, любой конкретный набор реакций при данном сочетании параметров требует отдельного исследования на единственность восстановления параметров.

§ 2. Алгоритм многомерной разностной интерполяции и восстановление параметров математических моделей ферментативной кинетики

§ 2.1. Введение

В настоящее время кинетические модели сложных биохимических систем находят все большее применение в качестве полезного инструмента для решения различных задач биотехнологии и биомедицины, таких как оптимизация продуктивности различных бактериальных штаммов, предсказание результатов вносимых генетических модификаций, испытание новых лекарственных препаратов. Одной из основных проблем, возникающих при разработке кинетических моделей, является идентификация большого числа параметров модели. Про-

блема обусловлена как общей сложностью клеточных систем (большое число реакций метаболической сети, сложность ее топологии и регуляции), так и высокой сложностью механизмов функционирования их отдельных элементов — ферментов.

Основная задача идентификации кинетической модели биохимической системы заключается в однозначной идентификации всех параметров этой модели на основе экспериментальных данных. Эта задача состоит из двух подзадач, которые могут быть сформулированы следующим образом:

1. Определение такого (минимального) набора экспериментальных данных (и точности их измерения), который позволил бы однозначно идентифицировать все параметры рассматриваемой модели с наперед заданной точностью.
2. Определение тех параметров модели (и точность их идентификации), которые могут быть восстановлены на основе наперед заданного набора экспериментальных данных, измеренных с заданной точностью.

В предыдущей части мы рассмотрели задачу идентификации параметров для класса моделей, описывающих функционирование индивидуальных ферментов. В этом описании модели сводится к дробно-рациональной функции, задающую уравнение скорости реакции, катализируемой рассматриваемым ферментом. Экспериментальные данные, на основе которых идентифицируются параметры этой модели, представляют собой зависимости начальной скорости работы фермента от концентраций его субстратов, продуктов и эффекторов. Для описанного таким образом класса моделей мы используем теорему 1, обосновывающую возможность решения задачи идентификации. Более того мы, редуцировали задачу о восстановлении параметров уравнения скорости по измеренным в конечном числе экспериментов значениям к задаче о восстановлении коэффициентов полинома по его значениям в конечном числе точек. Теперь мы переходим к изложению конкретного алгоритма для решения подзадач 1 и 2.

Мы предлагаем практический алгоритм по идентификации параметров функции скорости работы фермента. Практическая разрешимость этой задачи вытекает из теоремы 1. Ранее, для решения подобных задач исследователи использовали, как правило, алгоритмы численной подгонки, которые показали свою практическую значимость, однако обладали рядом недостатков. Так эти использование этих алгоритмов не решает вопрос однозначности идентификации параметров,

не дает рекомендаций по количеству и типу экспериментальных данных, а также не позволяет оценить погрешность значений параметров. Другим распространенным методом является явное вычисление параметров за счет линеаризации функции скорости, как например, в случае уравнения Михаэлиса-Ментен. Тем не менее, таким способом можно определить параметры только ограниченного числа функций.

Разработанный нами алгоритм позволяет для описания работы фермента отказаться от ненадежных методов фиттирования в пользу методов точной идентификации по конечному числу экспериментальных точек. Он более универсален, чем другие явные методы, что позволяет использовать его для более широкого класса функций.

В настоящей работе мы устанавливаем минимальный объем экспериментальной информации, необходимой для идентификации систем рассматриваемого класса. Показано, что предложенный алгоритм требует в $n!$ меньше экспериментов (n – число измеряемых метаболитов), чем использованные ранее методы, что при значительном числе метаболитов дает принципиальную экономию ресурсов ($6! = 720$). Кроме того, на примере было продемонстрировано, что стандартная постановка эксперимента, в которой значения параметров снимаются только на границе области, при определенном виде функции скорости не позволяет определить некоторые параметры. Были сформулированы требования к типу экспериментальных данных.

Следует заметить, что предложенный алгоритм может быть также применен не только для целей моделирования ферментативных процессов, но также и для широкого круга задач, описываемых аналогичными математическими моделями.

В настоящей статье мы строим новый метод решения задачи полиномиальной интерполяции для полиномов любой степени с любым числом переменных. На базе теоремы 1 нами разработан новый метод интерполяции — метод разностной интерполяции. Метод разностной интерполяции обладает следующими преимуществами перед ранее известными методами интерполяции (см. [29]):

- 1) **универсальность** — единым образом для любого числа переменных n и любого порядка полинома m даются явные формулы для узлов интерполяции, а также для коэффициентов полинома через его значения в узлах интерполяции;
- 2) **технологичность** — метод содержит m -шаговый алгоритм восстановления коэффициентов полинома, непосредственно реализуемый на компьютере.

Мы детализируем число и геометрию расположения точек измерения скорости и требования к уровню погрешности экспериментальных данных. На основе построенного метода нами решены следующие задачи:

- 1) определено минимальное множество точек (узлов интерполяции), необходимое для идентификации параметров системы;
- 2) указаны количество точек наблюдения и геометрия их расположения для восстановления функции скорости;
- 3) доказано, что для восстановления параметров реакций по нашему методу требуется в $n!$ раз меньше точек наблюдения, чем ранее использованными методами, что дает принципиальную экономию ресурсов в высоких размерностях ($5! = 120, 10! = 3628800$);
- 4) построена процедура контроля точности вычислений и соответствия результатов вычислений математической модели процесса на базе использования дополнительной информации (обращения в ноль) о коэффициентах полинома;
- 5) на основе проведенного анализа указан важный класс реакций, для которых ранее использованные алгоритмы не позволяют восстановить коэффициенты, а наш метод работает.

Далее мы даём детальное описание и обоснование метода разностной интерполяции.

§ 2.2. Метод разностной интерполяции

Описание результатов

Исследования проводятся для класса математических моделей, введенного в разделе 1, а именно, для случая рациональных функций вида

$$v_i(x, p) = \frac{u_i(x, p)}{g_i(x, p)}, \quad (2.1)$$

где $u_i(x, p)$, $g_i(x, p)$ — полиномы по переменной $x \in \mathbf{H}^n$, зависящие от аргумента $p \in \mathbf{H}^k$ как от параметра. В представлении (2.1) полином $u_i(x, p)$ имеет нули в \mathbf{H}^n и восстанавливается по множеству нулей или, в химической терминологии, по стационарным точкам данной реакции. Таким образом, задача определения параметров функций скорости $v_i(x, p)$ редуцируется к задаче определения параметров $p \in \mathbf{H}^k$ полинома $g_i(x, p)$, стоящего в знаменателе формулы (2.1), по значениям

этого полинома в конечном числе точек $x \in \mathbf{H}^n$. Априорно известна положительность полинома $g_i(x, p)$ при $x \in \mathbf{H}^n$ и $p \in \mathbf{H}^k$.

Рассмотрим задачу о восстановлении коэффициентов полинома $g(x)$ степени m от n переменных, $x \in \mathbf{R}^n$, с центром разложения в точке $a \in \mathbf{R}^n$ вида

$$g(x) = \sum_{\substack{\alpha \in \mathbf{N}_0^n \\ |\alpha| \leq m}} g_\alpha(a)(x-a)^\alpha. \quad (2.2)$$

по значениям этого полинома, заданным в конечном наборе точек.

Полином общего вида степени m от n переменных задаётся набором

$$M(m, n) = \frac{(m+n)!}{m!n!}. \quad (2.3)$$

числовых коэффициентов $\{g_\alpha(a)\}_{\alpha \in \mathbf{N}_0^n, |\alpha| \leq m}$ (см. [29, стр. 25]). Таким образом для восстановления полинома общего вида требуется использовать его значения в $\nu \geq M(m, n)$ точках. Минимально возможное число точек — узлов интерполяции есть $M(m, n)$. Мы предлагаем метод разностной интерполяции. А именно, в окрестности точки a указывается множество S из $M(m, n)$ точек — узлов интерполяции, по значениям в которых коэффициенты полинома общего вида степени m от n переменных однозначно определяются.

Ключевой инструмент нашего построения теорема 1. Сформулируем для дальнейшего использования следующее следствие 2 этой теоремы.

СЛЕДСТВИЕ 2. Пусть $g(x)$ полином степени не выше m и α мультииндекс размера m , тогда для коэффициента $g_\alpha(a)$ полинома $g(x)$ справедливо представление

$$g_\alpha(a) = \frac{1}{\alpha!} L^\alpha g(a). \quad (2.4)$$

Описание множества $S(a, h, n, m)$ узлов интерполяции

Возьмём произвольную точку $a \in \mathbf{R}^n$ и вектор шагов $h = (h_1, h_2, \dots, h_n)$. Требуется, чтобы все компоненты вектора h были не равны нулю, а в остальном этот вектор может быть произвольным. Введём

следующее множество узлов интерполяции:

$$S(a, h, n, m) = \{a + \sum_{i=1}^n \beta_i h_i e_i \mid (\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n) \equiv \beta \in \mathbf{N}_0^n, |\beta| \leq m\}, \quad (2.5)$$

$\{e_i\}_{i=1}^n$ — стандартный базис в \mathbf{R}^n .

Через L_i обозначим оператор взятия частной разности по переменной x_i :

$$L_i f(x) = \frac{1}{h_i} f(x + h_i e_i) - f(x), \quad (2.6)$$

его b -я степень, $b \in \mathbf{N}$ выглядит так:

$$L_i^b f(x) = \frac{1}{h_i^b} \sum_{\nu=0}^b (-1)^{b-\nu} \frac{b!}{\nu!(b-\nu)!} f(x + \nu h_i e_i). \quad (2.7)$$

Если $\alpha = (\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n)$ — мультииндекс, $h = (h_1, h_2, \dots, h_n)$ — вектор шагов, то положим:

$$L^\alpha = \prod_{i=1}^n L_i^{\alpha_i}. \quad (2.8)$$

Напомним, что длиной мультииндекса называется сумма его координат.

ЗАМЕЧАНИЕ 1. Из формул (2.7, 2.8) следует, что при $|\alpha| = m$ значения величины $L^\alpha f(a)$ выражаются только через значения функции $f(x)$ в точках множества $S(a, h, n, m)$.

m -шаговый алгоритм вычисления коэффициентов полинома по его значениям в точках множества S

Пусть $g(x)$ полином степени не выше m . Опишем m шагов вычисления коэффициентов $g_\alpha(a)$ многочлена по его значениям в точках множества $S(a, h, n, m)$. Построение проводится в обратном порядке — начинается со значения целого неотрицательного индекса $k = m$ и кончается значением индекса $k = 0$.

Шаг m . Полагаем $k = m$. Полагаем

$$g_m(x) \equiv g(x). \quad (2.9)$$

Мультииндекс $\alpha \in \mathbf{N}_0^n$, $|\alpha| = m$. Согласно следствию 2 справедливо равенство

$$g_\alpha(a) = \frac{1}{\alpha!} L^\alpha g(a). \quad (2.10)$$

Итак, коэффициенты $g_\alpha(a)$ при мономах порядка $k = m$ теперь известны.

Шаг $m - 1$. Полагаем $k = m - 1$. Полагаем

$$g_{m-1}(x) \equiv g(x) - \sum_{\alpha \in \mathbf{N}_0^n, |\alpha|=m} g_\alpha(a)(x-a)^\alpha. \quad (2.11)$$

Мультииндекс $\alpha \in \mathbf{N}_0^n$, $|\alpha| = m - 1$. Согласно следствию 2 справедливо равенство

$$g_\alpha(a) = \frac{1}{\alpha!} L^\alpha g_{m-1}(a). \quad (2.12)$$

Итак, коэффициенты $g_\alpha(a)$ при мономах порядка $k \geq m - 1$ теперь известны.

Шаг k . Пусть $k \in \overline{0, m}$. Полагаем

$$g_k(x) \equiv g(x) - \sum_{\alpha \in \mathbf{N}_0^n, k < |\alpha| \leq m} g_\alpha(a)(x-a)^\alpha. \quad (2.13)$$

(Сумма по пустому множеству индексов по определению полагается равной нулю.) Мультииндекс $\alpha \in \mathbf{N}_0^n$, $|\alpha| = k$. Согласно следствию 2 справедливо равенство

$$g_\alpha(a) = \frac{1}{\alpha!} L^\alpha g_k(a). \quad (2.14)$$

Мы убедились в справедливости следующей теоремы.

ТЕОРЕМА 2. Коэффициенты любого многочлена степени m от n переменных вычисляются через его значения на множестве $S(a, h, n, m)$ вида (2.5) по формулам (2.13, 2.14).

Из доказанной теоремы 2 следует, что для любых натуральных чисел n и m в любой окрестности любой точки $a \in \mathbf{R}^n$ существует множество $S(a, h, n, m)$ вида (2.5) такое, что коэффициенты любого полинома степени m от n переменных вычисляются через его значения на множестве $S(a, h, n, m)$ по формулам (2.13, 2.14).

Для полиномов частного вида, у которых часть коэффициентов известна, например, часть коэффициентов равна нулю, можно обойтись меньшим, чем $M(n, m)$ количеством узлов интерполяции. В разделе

1 приведен, в частности, пример 1 восстановления по значениям в 11 точках многочлена третьей степени от четырёх переменных, у которого априори известно, что заданные $35 - 11 = 24$ коэффициента равны нулю.

§ 2.3. Свойства шаблона

Описание шаблона

Далее введенное в разделе 2 конечное множество узлов интерполяции $S(a, h, n, m) \subset \mathbf{R}^n$ будем называть *шаблоном*. Шаблон состоит из $M(n, m)$ точек. Произвольный полином степени $m \in \mathbf{N}_0$ от n переменных может быть записан в виде (2.2), т. е. задается набором $M(n, m)$ числовых коэффициентов $g_\alpha(a)$.

Рассмотрим n -мерный симплекс $\Gamma \subset \mathbf{R}^n$, являющийся наименьшим замкнутым выпуклым телом, содержащем точку $a \in \mathbf{R}^n$ и n точек $z_i \in \mathbf{R}^n$ вида

$$z_i \equiv a + mh_i e_i, \quad i \in \overline{1, n}. \quad (2.15)$$

Множество $S(a, h, n, m) \subset \Gamma$ состоит из всех целочисленных точек симплекса Γ , т. е. точек вида

$$x = a + \sum_{i=1}^n \beta_i h_i e_i, \quad (2.16)$$

где мультииндекс $\beta \in \mathbf{N}_0^n$. Объем симплекса Γ в $n!$ раз меньше объема параллелепипеда P со сторонами $m|h_1|, m|h_2|, \dots, m|h_n|$. Параллелепипед P содержит

$$p(n, m) \equiv (m+1)^n \quad (2.17)$$

целочисленных точек вида (2.16). Известно, что объем параллелепипеда P в $n!$ раз больше объема симплекса Γ , поэтому можно было бы ожидать выполнения неравенства

$$N(n, m) \leq \frac{p(n, m)}{n!} \quad (2.18)$$

при $n \in \mathbf{N}$ и $m \in \mathbf{N}_0$. Однако при $n \geq 2$ и $m \geq 1$ неравенство (2.18) неверно, т. е. верно обратное неравенство

$$\forall n \geq 2 \quad \forall m \geq 1 \quad \left| N(n, m) > \frac{p(n, m)}{n!} \right. \quad (2.19)$$

Тем не менее, при любом $n \in \mathbb{N}$ справедливо предельное соотношение

$$\lim_{m \rightarrow \infty} \frac{p(n, m)}{N(n, m)} = n!, \quad (2.20)$$

которое говорит об асимптотической справедливости неравенства (2.18) при достаточно больших степенях m полинома.

Формулы восстановления коэффициентов полинома

Восстановление коэффициентов полинома g_α по значениям полинома в конечном числе точек шаблона производится по формулам (2.10–2.14). Эти формулы показывают, что любой коэффициент полинома g_α является линейным функционалом от набора значений полинома в точках шаблона. Для случая старших коэффициентов полинома норма этого линейного отображения имеет вид

$$\text{normc}(\alpha, h) = \frac{b_\alpha}{|h^\alpha|}, \quad (2.21)$$

где b_α — положительная константа, не зависящая от вектора $h \in \mathbb{R}^n$. Формула (2.21) показывает, что ошибка δ_α вычисления коэффициента g_α по набору значений полинома g в точках шаблона равна

$$\delta_\alpha = \frac{b_\alpha}{|h^\alpha|} \cdot \delta, \quad (2.22)$$

где δ — норма ошибки задания набора значений полинома в соответствующем нормированном пространстве. В случае равного шага по всем осям

$$h_1 = h_2 = \dots = h_n \equiv h_0 \quad (2.23)$$

формула (2.22) принимает вид

$$\delta_\alpha = \frac{b_\alpha}{|h_0|^m} \cdot \delta. \quad (2.24)$$

§ 2.4. Выбор геометрии и шага

При заданном шаблоне S коэффициенты полинома $g(x)$ степени m вычисляются по его значениям в точках шаблона по формулам (2.10–2.14). Положение точек шаблона задаётся двумя векторами: вектором $a \in \mathbb{R}^n$ — положение нулевой вершины $x_0 = a$ и вектором шагов

$h \in \mathbf{R}^n$. Так как вектор шагов h может быть выбран сколь угодно малым, то формально восстановление коэффициентов полинома возможно по его значениям в любой сколь угодно малой окрестности любой точки. Однако при выборе положения и размеров шаблона требуется учесть геометрию множества определения и погрешность задания значений функции. Рассмотрение этого вопроса мы начнём со случая полинома, заданного во всём пространстве \mathbf{R}^n или на неограниченном множестве \mathbf{H}^n .

Случай полинома, заданного на \mathbf{R}^n

В случае полинома, заданного на всём \mathbf{R}^n при выборе параметров шаблона будем исходить из формулы (2.22) для ошибки вычисления коэффициента g_α при старшей степени. Согласно формуле (2.22) соответствующая ошибка не зависит от положения a нулевой вершины шаблона, а зависимость от вектора $h \in \mathbf{R}^n$ выражается множителем $|h^\alpha|$, стоящим в знаменателе. Итак, при фиксированной величине погрешности δ задания значений полинома, погрешность δ_α определения коэффициентов полинома будет неограниченно уменьшаться, если все компоненты h_1, h_2, \dots, h_n вектора h стремятся к бесконечности. Наиболее просто это видно в случае равного шага по всем осям координат, когда справедлива формула (2.24). Мы пришли к выводу, что для полинома, заданного на всём пространстве \mathbf{R}^n , выбор начальной точки $a \in \mathbf{R}^n$ не имеет значения, а шаги h_1, h_2, \dots, h_n по осям координат должны принимать как можно большие значения для минимизации ошибки вычисления коэффициентов полинома.

Случай полинома, заданного на \mathbf{H}^n

В случае полинома, заданного на \mathbf{H}^n , когда все координаты вектора x должны быть неотрицательны, отличие от предыдущего пункта заключается в том, что для возможности неограниченно увеличивать шаги h_1, h_2, \dots, h_n по осям координат нужно добавить требование положительности шагов $h_1 > 0, h_2 > 0, \dots, h_n > 0$. При этом дополнительном условии уменьшение погрешности δ_α также производится увеличением всех компонент h_1, h_2, \dots, h_n вне зависимости от выбора начальной точки $a \in \mathbf{H}^n$.

Полином в ограниченной области

В случае полинома $g(x)$, заданного в ограниченной области $G \subset$

$\subset \mathbf{R}^n$, модуль шага дискретизации $|h_i|$ по оси x_i ограничен сверху, поэтому величина ошибки вычисления коэффициентов полинома, даваемая формулами (2.22), (2.24) не может неограниченно уменьшаться. Задача минимизации ошибки в этом случае приводится к задаче максимизации модулей шагов дискретизации $|h_1|, |h_2|, \dots, |h_n|$ при условии, что шаблон остаётся в пределах множества G , т.е. к "максимизации" геометрических размеров шаблона. Эта задача может быть строго математически поставлена, если мы выберем некоторую норму на линейном пространстве коэффициентов полинома фиксированного порядка или на линейном пространстве всех коэффициентов полинома и будем рассматривать ошибку, как функцию параметров $a \in G$, $h \in \mathbf{R}^n$. Наиболее простой вид задача о минимизации ошибки принимает в случае равных шагов по всем осям $h_1 = h_2 = \dots = h_n = h_0$. Тогда это будет задача о размещении в областях G наибольшего симплекса, натянутого на $n + 1$ точку вида: $a_0 = a$, $a_1 = a + mh_0 e_1$, $a_2 = a + mh_0 e_2$, \dots , $a_n = a + mh_0 e_n$. А именно, к нахождению такого $a \in G$, при котором допустимы значения $|h_0|$ максимально.

Влияние точек шаблона на коэффициенты полинома

Согласно итерационной процедуре вычисления коэффициентов полинома для вычисления значения коэффициента $g_\alpha(a)$ с $|\alpha| = m$, требуется вычислить разностную $(L^\alpha g)(a)$ производную. Вычисление разностной производной L^α в случае $|\alpha| = m$, например, производится с использованием значений полинома в точке $x_\alpha = a + \sum_{i=1}^n \alpha_i h_i e_i$ шаблона и во всех подчиненных точках шаблона. Таким образом, при вычислении коэффициентов при всех старших степенях полинома будут использованы значения полинома во всех точках шаблона.

Первый вывод, который отсюда проистекает, заключается в том, что для вычисления коэффициента g_α полинома, у которого все компоненты $\alpha_i \neq 0$, $i = 1, \dots, n$ необходимо использовать внутреннюю точку множества \mathbf{H}^n . Однако этот вывод опирается на специальный вид нашего метода интерполяции. Тем не менее нетрудно убедиться, что данный вывод верен для любого алгоритма интерполяции.

ТЕОРЕМА 3. Пусть полином

$$g(x) = \sum_{\substack{\alpha \in \mathbf{N}_0^n \\ |\alpha| \leq m}} g_\alpha x^\alpha \quad (2.25)$$

на множестве \mathbf{H}^n и мультииндексе $\alpha \in \mathbf{N}_0^n$ не имеет нулевых компо-

нент. Тогда для любой точки $x \in \mathbf{H}^n$, лежащей на границе \mathbf{H}^n верно

$$g_\alpha x^\alpha = 0. \quad (2.26)$$

Следствие 3. Если мультииндекс $\alpha \in \mathbf{N}_0^n$ не имеет нулевых компонент, то коэффициент g_α полинома $g(x)$ вида (2.25) не может быть восстановлен по значениям на границе области \mathbf{H}^n .

На сегодня восстановление параметров скорости обычно производится по ее значениям в точках, лежащих на границе множества $\mathbf{H}^n \subset \mathbf{R}^n$. Но как мы только, что убедились это возможно лишь для скоростей, у которых полином $g(x)$ не содержит произведения всех концентраций x_1, x_2, \dots, x_n в положительных степенях. В общем же случае процедура восстановления, использующая лишь значения скорости на гранях множества \mathbf{H}^n не гарантирует восстановления. В разделе 2 мы приводим пример реакции с $n = 3, m = 3$, для которой знаменатель $g(x)$ функции скорости содержит произведение $x_1 x_2 x_3$ всех концентраций. Для этой реакции наш алгоритм дает восстановление параметров, а ранее принятый алгоритм восстановления, использующий лишь значения на гранях первого октанта, не работает.

§ 2.5. Роль погрешности исходной информации

Для более глубокого обсуждения роли погрешности при выборе шаблона мы должны вернуться к формуле (2.1) представления функции скорости, как отношениям двух полиномов.

О происхождении изучаемого полинома $g(x)$

Изучаемый полином $g(x)$ коэффициенты которого подлежат восстановлению появился в нашей задаче как знаменатель формулы (2.1) представления функции скорости. Непосредственно измеряемой в эксперименте величиной мы полагаем значение функции скорости $v(x)$ в данной точке $x \in \mathbf{H}^n$. Далее мы также из экспериментальной информации о нулях функции $v(x)$ определяем полином $u(x)$ стоящий в числителе формулы (2.1). Таким образом, экспериментальные значения полинома $g(x)$ получаются путем вычислений по формуле

$$g(x) = \frac{u(x)}{v(x)}, \quad (2.27)$$

числитель и знаменатель которой содержит погрешности экспериментального происхождения. Поскольку числитель и знаменатель формулы (2.27) с погрешностью, то при вычислении значений полинома

$g(x)$ по этой формуле следует внимательно рассмотреть случай, когда знаменатель принимает значения, эквивалентные нулю в рамках погрешности его определения.

Уровень нуля и уровень достоверности

Введём положительное число $\delta_0 > 0$, характеризующее уровень погрешности, и такое, что данные из эксперимента значения функции g' такое, что $|g'| < \delta_0$, можно считать равными нулю. Для проведения достоверных вычислений по формуле (2.27) введём положительную величину $\delta_t \gg \delta_0$, которую мы назовём уровнем доверия, и будем считать вычисления по формуле (2.27) достоверными лишь в области $G_t \subset \mathbf{H}^n$, где выполняется неравенство

$$|v(x)| > \delta_t, \quad (2.28)$$

При построении множества G_t мы заведомо исключили некоторую окрестность нулей функции $u(x)$, в том числе и начало координат. Если степень полинома $g(x)$ выше степени полинома $u(x)$, то область $G_t \subset \mathbf{H}^n$ будет ограничена и при выборе шаблона мы должны разместить его в этой ограниченной области согласно рецептам раздела 2. В остальных случаях необходимы дополнительные рассуждения.

§ 2.6. Использование дополнительной информации о коэффициентах полинома для контроля точности вычислений

В ряде случаев известна дополнительная информация о восстанавливаемых коэффициентах полинома. Типичным случаем является ситуация, когда из математической модели известны коэффициенты полинома, равные нулю. Дополнительная информация этого вида может быть использована в методе для контроля точности вычислений и соответствия результатов вычислений исходной математической модели явления. А именно, заранее известные (нулевые) коэффициенты мы будем вычислять по тем же формулам (2.10–2.14). Рассмотрим случай коэффициента g_α при старшей степени, т.е. с $|\alpha| = m$. Тогда вычисленное значение g'_α , соответствующее равному нулю коэффициенту, должно в силу формулы (2.22) удовлетворять неравенству

$$|g'_\alpha| \leq \frac{b_\alpha}{|h^\alpha|} \delta \quad (2.29)$$

Выполнение неравенства (2.29) и будет критерием правильности вычислений. Нарушение неравенства (2.29) в процессе вычислений и будет сигналом некорректности процесса вычислений. Причинами нарушения неравенства (2.29) могут быть

- 1) ошибка вычислений,
- 2) занижение погрешности,
- 3) несоответствие математической модели изучаемому явлению.

§ 2.7. Пример функции скорости, не восстанавливаемой по значениям на границе

В качестве примера функции скорости, параметры которой не восстанавливаются по значениям на границе области, мы рассмотрели уравнение скорости, соответствующему механизму *Random BiUni* (классификация Клеянда) с аллостерическим ингибированием продуктом. Фермент катализирует реакцию, описываемую уравнением:



Каталитическая схема, соответствующая данному механизму, изображена на рисунке 4. На схеме в узлах изображены различные формы

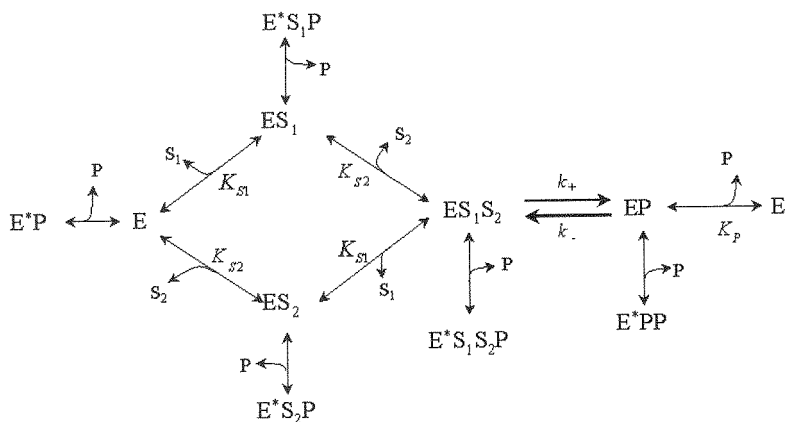


Рис. 4: Каталитическая схема реакции

фермента, связанные с субстратами и продуктом. Стрелками изображены процессы перехода фермента в различные состояния, рядом со стрелкой показаны константы реакций, соответствующие каждой стадии. Поскольку продукт является аллостерическим ингибитором, фермент имеет специальный сайт, связывающий P . Связавшись с продуктом, фермент теряет способность осуществлять каталитическую стадию, изображенную на рисунке двойными стрелками. Ингибированные формы фермента мы обозначили как E^* .

Мы вывели уравнение скорости для работы фермента, предположив, что стадия катализа является более медленной, чем стадии связывания. В соответствии с приближением мы воспользовались квазиравновесным приближением. Запишем условие равновесия на концентрации всех форм фермента.

$$\begin{aligned} K_{S1} &= \frac{S_1 \cdot E}{ES_1} = \frac{S_1 \cdot ES_2}{ES_1 S_2}, \\ K_{S2} &= \frac{S_2 \cdot E}{ES_2} = \frac{S_2 \cdot ES_1}{ES_1 S_2}, \\ K_P &= \frac{P \cdot E}{EP}, \end{aligned} \quad (2.31)$$

$$K_P^* = \frac{P \cdot E}{E^* P} = \frac{P \cdot ES_1}{E^* S_1 P} = \frac{P \cdot ES_2}{E^* S_2 P} = \frac{P \cdot ES_1 S_2}{E^* S_1 S_2 P} = \frac{P \cdot EP}{E^* P P}.$$

Отсюда мы выразили концентрации всех форм фермента через константы равновесия и концентрации свободной формы E

$$\begin{aligned} ES_1 &= E \frac{S_1}{K_{S1}}, \\ ES_2 &= E \frac{S_2}{K_{S2}}, \\ ES_1 S_2 &= E \frac{S_1 \cdot S_2}{K_{S1} \cdot K_{S2}}, \\ EP &= E \frac{P}{K_P}, \\ E^* P &= E \frac{P}{K_P^*}, \\ E^* S_1 P &= E \frac{P \cdot S_1}{K_P^* \cdot K_{S1}}, \\ E^* S_2 P &= E \frac{P \cdot S_2}{K_P^* \cdot K_{S2}}, \\ E^* S_1 S_2 P &= E \frac{P \cdot S_1 \cdot S_2}{K_P^* \cdot K_{S1} \cdot K_{S2}}, \\ E^* P P &= E \frac{P \cdot P}{K_P^* \cdot K_P}. \end{aligned} \quad (2.32)$$

Поскольку суммарная концентрация всех форм фермента не изменяется, запишем закон сохранения

$$\begin{aligned} E + ES_1 + ES_2 + ES_1 S_2 + EP + E^* P + \\ + E^* S_1 P + E^* S_2 P + E^* S_1 S_2 P + E^* P = E^{total}. \end{aligned} \quad (2.33)$$

Воспользовавшись этим выражением и равновесными соотношениями, мы смогли выразить концентрацию свободной формы фермента

$$E = \frac{E^{total}}{1 + \frac{S_1}{K_{S1}} + \frac{S_2}{K_{S2}} + \frac{S_1 \cdot S_2}{K_{S1} \cdot K_{S2}} + \frac{P}{K_P} + \frac{P}{K_P^*} + \frac{P \cdot S_1}{K_P^* \cdot K_{S1}} + \frac{P \cdot S_2}{K_P^* \cdot K_{S2}} + \frac{P \cdot S_1 \cdot S_2}{K_P^* \cdot K_{S1} \cdot K_{S2}}}. \quad (2.34)$$

Уравнение скорости можно найти, воспользовавшись законом действующих масс для "медленной" стадии.

$$v = k_+ \cdot ES_1S_2 - k_- \cdot EP. \quad (2.35)$$

Воспользовавшись соотношениями (33, 37), мы получили уравнение скорости работы фермента.

$$v = \frac{k_+ \cdot E^{total}}{\Delta \cdot K_{S1} \cdot K_{S2}} \cdot (S_1 \cdot S_2 - P/K_{eq}),$$

где

$$K_{eq} = \frac{k_+}{k_-} \cdot \frac{K_P}{K_{S1} \cdot K_{S2}},$$

$$\Delta = 1 + \frac{S_1}{K_{S1}} + \frac{S_2}{K_{S2}} + \frac{S_1 \cdot S_2}{K_{S1} \cdot K_{S2}} + \frac{P}{K_P} + \frac{P}{K_P^*} + \frac{P \cdot S_1}{K_P^* \cdot K_{S1}} + \frac{P \cdot S_2}{K_P^* \cdot K_{S2}} + \frac{P \cdot S_1 \cdot S_2}{K_P^* \cdot K_{S1} \cdot K_{S2}}.$$

§ 2.8. Математические выводы

В данной работе разработана методика восстановления параметров реакций по измерениям функции скорости. Установлен минимальный объем экспериментальной информации, необходимой для идентификации систем рассматриваемого класса, построен и проанализирован новый алгоритм, использующий минимальный объем экспериментальной информации. Показано, что предложенный алгоритм требует в $n!$ меньше экспериментов (n — число регистрируемых компонент), чем использованные ранее методы, что в высших размерностях дает принципиальную экономию ресурсов ($5! = 120$, $10! = 3628800$). Исчерпывающий анализ проведен для специального класса реакций с рациональной функцией скорости вида (1). Однако анализ идеальной ситуации позволяет перейти к исследованию более сложных систем, используя уже построенные конструкции и привлекая точные методы современного функционального анализа.

§ 2.9. Обсуждение

Как было сказано ранее, одним из возможных путей изучения сложных биологических систем является использование точных наук. Связующим звеном между экспериментальными данными и математикой, как и в прочих естественных науках, может являться моделирование, а применительно к описанию биохимических процессов клетки — кинетическое моделирование. В настоящее время кинетическое моделирование ставит своей задачей не только изучение режимов работы (например, колебания, релаксация, переходные процессы), то есть получение качественной информации, но также и количественные результаты, такие как предсказание значений концентраций метаболитов, проверка существующих гипотез, согласование разнородной информации, руководство к модификации метаболизма для получения организмов с заранее заданными свойствами.

Несмотря на то, что методы кинетического моделирования более или менее успешно применяются для решения поставленных выше и прочих задач, в настоящее время теория конструирования и анализа таких математических объектов все еще не имеет четких критериев. Подходов к кинетическому моделированию существует ровно столько, сколько существует групп, занимающихся этими задачами. Каждая группа использует разную степень детализации описания, разный подход к идентификации параметров, причем подробность описания, по-видимому, не всегда соотносится с поставленной задачей. Как самим исследователям, строящим модели, так и их оппонентам всегда сложно ответить на вопрос, насколько представленная модель адекватна решаемой задаче. Оценка качества модели, как правило, выносится на основании почти интуитивных, субъективных соображений.

Настоящую работу мы посвятили, на наш взгляд, одному из главных критериев адекватности модели, а именно вопросу идентификации параметров кинетической модели. Следует заметить, что современные методы идентификации параметров уравнений скорости являются преимущественно численными методами подгонки и не позволяют дать единый набор параметров. Более того, в настоящее время исследователи не могут ответить, какой набор экспериментальных данных является необходимым или достаточным для описания системы. Достаточно ли входных данных для того, чтобы подтвердить правомерность сделанных выводов? Все эти обстоятельства вызывают закономерный протест у биохимиков-экспериментаторов и определяют традиционно низкий уровень доверия к результатам моделирования. Данная ситуация приводит к отсутствию диалога между эксперимен-

таторами и теоретиками, решающими одну и ту же задачу. Экспериментаторы зачастую не доверяют результатам теоретических исследований, а теоретики не могут сформулировать пожелания к качеству и количеству экспериментальной информации, даже если экспериментаторы готовы к сотрудничеству.

В основной части нашей работы мы преднамеренно сузили круг проблем до идентификации параметров уравнения скорости отдельного фермента по экспериментальным зависимостям начальных скоростей от концентраций метаболитов. Поставленная задача облегчается тем, что уравнение скорости, являющееся явной функцией, имеет дробно-рациональный вид с определенной структурой числителя и знаменателя. Благодаря тому, что структура и коэффициенты числителя, как правило, известны, задача сводится к определению коэффициентов полинома многих переменных стоящего в знаменателе.

Следует заметить, что теория идентификации параметров полинома многих переменных до настоящего времени не была разработана, поэтому математическая часть работы представляет самостоятельный интерес и может быть использована для других аналогичных задач. Так, в работе удалось показать, что коэффициенты полинома могут быть восстановлены однозначно по конечному множеству значений точек пространства переменных. Интерпретируя математические результаты на практическом языке, нам удалось строго показать, что все математические параметры уравнения можно идентифицировать однозначно, основываясь на экспериментальных данных, причем эти экспериментальные точки можно получить, используя стандартные схемы экспериментов.

Сформулированная теорема и следствия дают практический алгоритм идентификации параметров. Такой алгоритм позволит идентифицировать значения неизвестных констант напрямую без использования алгоритмов фитинга. Однако ряд важных вопросов требуют дальнейшего исследования. В частности, как показывает пример раздела 2, мы не всегда можем выразить однозначно так называемые химические параметры уравнения скорости, даже если удастся разделить математические. Количество и значимость химических параметров может различаться даже для одного выбранного каталитического цикла и зависит от методов вывода уравнения скорости и используемых приближений. Для того, чтобы химические параметры восстанавливались по математическим однозначно, по-видимому, необходимо решение задачи унификации уравнений скорости. Разработка таких критериев может быть самостоятельной задачей.

Литература

1. Schaefer, U., Boos, W., Takors, R., and Weuster-Botz, D., (1999) *Analytical Biochemistry* 270, 88-96
2. Buchholz, A., Takors, R., and Wandrey, C., (2001) *Analytical Biochemistry* 295, 129-137
3. Buchholz A., Hurlebaus J., Wandrey C., Takors, R., (2002) *Biomolecular Engineering* 19, 5-15 .
4. Noble, M., Sinha, Y., Kolupaev, A., Demin, O., Earnshaw, D., Tobin, F., West, J., Martin, J. D., Qiu, C., Liu, W., DeWolf, W. E. Jr., Tew, D., Goryanin, I. I., (2006) *Biotechnology and Bioengineering* 95, 560-571
5. Moehren, G., Markevich, N., Demin, O.V., Kiyatkin, A., Goryain, I., Kholodenko, B.N., (2002) *Biochemistry* 41, 306-320
6. Markevich, N.I., Moehren, G., Demin, O.V., Kiyatkin, A., Hoek J.B., Kholodenko, B.N., (2004) *Syst Biol (Stevenage)*1(1), 104-113
7. Kholodenko, B.N., Demin, O.V., Moehren, G., Hoek, J.B., (1999) *J. Biol. Chem.* 15;274(42), 30169-30181
8. Riznichenko, G.Yu., Lebedeva, G.V., Demin, O.V., Belyaeva, N.E., Rubin, A.B., (2000) *Biophysics (Moscow)* 45, 452-460
9. Lebedeva, G.V., Belyaeva, N.E., Riznichenko, G.Yu., Rubin, A.B., Demin, O.V., (2000) *J. Physical Chemistry (Moscow)* 74, 1897-1906
10. Demin, O.V., Lebedeva, G.V., Kolupaev, A.G., Zobova, E.A., Plyusnina, T.Yu., Lavrova, A.I., Dubinsky, A., Goryacheva, E.A., Tobin, F., Goryanin, I.I., (2004) IN: G. Ciobanu, G. Rozenberg (Eds.): *Modelling in Molecular Biology*, Natural Computing Series, Springer p.59-103
11. Rizzi, M., Baltes, M., Theobald, U., Reuss, M., (1997) *Biotechnol Bioeng* 55, 592-608
12. Chassagnole, C., Rais, B., Quentin, E., Fell, D. A., and Mazat, J. P., (2001) *Biochem. J.* 356, 415-423
13. Rais, B., Chassagnole, C., Letellier, T., Fell, D. A., and Mazat, J. P., (2001) *Biochem. J.* 356, 425-432
14. Chassagnole, C., Fell, D. A., Rais B., Kudla B., and Mazat, J. P., (2001) *Biochem. J.* 356, 433-444
15. Bakker, B. M., Michels, P. A., Opperdoes, F. R., Westerhoff, H. V., (1997) *J. Biol. Chem.* 7;272(6) 3207-3215
16. Teusink, B., Bakker, B. M., Westerhoff, H. V., (1996) *Biochim. Biophys. Acta.* Jul 31;1275(3) 204-212
17. Westerhoff, H. V., and Van Dam, K., (1987) *Thermodynamics and Control of Biological Free-energy Transduction*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam
18. Cornish-Bouden, A., (2001) *Fundamentals of enzyme kinetic*. Portland Press, Cambridge

19. <http://vinokur.narod.ru>
20. Ильин В.А., Садовничий В.А., Сендов В.А. Математический анализ. — М.: «Наука», 1979.
21. Clealand, W.W. (1989) Biochim. Biophys. Acta. 67, The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products, 104-137
22. Mogilevskaya, E., Demin, O., Goryanin, I., (2006) Journal of Biological Physics 32(3-4), Kinetic Model of Mitochondrial Krebs Cycle: Unraveling the Mechanism of Salicylate Hepatotoxic Effects, 245-271
23. Demin, O. V., Goryanin, I. I., Kholodenko, B. N., Westerhoff, H. V., (2001) Mol. Biol. (Moscow) 35(6), 1095-1104
24. Goryanin, I. I., Demin, O. V., Tobin, F., (2003) Applications of Whole Cell and Large Pathway Mathematical Models in the Pharmaceutical Industry. IN: Metabolic Engineering in the Post Genomic Era, (B.Kholodenko and H.Westerhoff, Eds) Horison Bioscience, UK , Eds. 103-129
25. Demin, O. V., Plyusnina, T. Y., Lebedeva, G. V., Zobova, E. A., Metelkin, E. A., Kolupaev, A. G., Goryanin, I. I., Tobin, F., (2005) Kinetic modelling of the E. coli metabolism. IN: Topics in Current Genetics, Eds. Alberghina L., Westerhoff H.V., Springer, 31-67
26. Metelkin, E., Goryanin, I., Demin, O., (2006) Biophys. J. 90, Mathematical modeling of mitochondrial adenine nucleotide translocase, 423-432
27. Demin, O. V., Dronov, S., Goryanin, I. I., Lebedeva, G. V., (2004) Biochemistry (Moscow) 69 (12), Kinetic model of imidazole glycerol phosphate synthetase of Escherichia coli, 1625-1638
28. Mogilevskaya, E., A., Lebedeva, G. V., Goryanin, I. I., Demin O. V., (2007) Biophysics (Moscow) 52, N. 1, Kinetic model of Escherichia coli isocitrate dehydrogenase functioning and regulation, 47-56
29. Мысовских И.П. Интерполяционные кубатурные формулы. — М.: "Наука", 1981.