

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԱԶԻԶՅԱՆ ՌԱՖԱՅԵԼ ԱՐՄԵՆԻ

ԵՐԿՍՈՒԲՍՏՐԱՏ ՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ ՌԵԱԿՑԻԱՆԵՐԻ ՀԱՄԱԿԱՐԳՉԱՅԻՆ
ՄՈՂԵԼԱՎՈՐՈՒՄԸ ՏԱՐԱԲՆՈՒՅԹ ԱՐԳԵԼԱԿԻՉՆԵՐԻ ԱՌԿԱՅՈՒԹՅԱՄԲ

Գ.00.02 - Կենսաֆիզիկա մասնագիտությամբ
Կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման
ատենախոսության

ՄԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ-2013

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

АЗИЗЯН РАФАЭЛЬ АРМЕНОВИЧ

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДВУСУБСТРАТНЫХ
ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ В ПРИСУТСТВИИ ИНГИБИТОРОВ РАЗНЫХ
ТИПОВ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.02- Биофизика

ЕРЕВАН – 2013

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝ ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ,
կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր
Է.Ս.Գևորգյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս,
ֆիզմաթ. գիտ. դոկտոր, քիմ. գիտ. դոկտոր,
պրոֆեսոր Ա.Ա.Շահինյան,
կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր
Հ.Ռ.Վարդապետյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության
ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2013թ. հունիսի 4-ին, ժամը 14⁰⁰-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ, 0025, ք. Երևան, Ալեք Մանուկյան փող. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքվել է 2013թ. մայիսի 3-ին:

051 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենս.գիտ.դոկտոր, պրոֆեսոր



Լ.Հ. Նավասարդյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель: член-корр. НАН РА, доктор биол. наук,
профессор Э.С.Геворкян

Официальные оппоненты: академик НАН РА, доктор физ.-мат.наук,
доктор хим. наук, профессор А.А.Шагинян,
доктор биол. наук, профессор Г.Р.Вардапетян

Ведущая организация: Институт молекулярной биологии НАН РА

Защита диссертации состоится 4-го июня 2013г., в 14⁰⁰ часов, на заседании Специализированного совета ВАК РА Биофизика 051 при Ереванском государственном университете (РА, 0025, г. Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 3-го мая 2013г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051,
доктор биол. наук, профессор



Լ.Ա.Նավասարդյան

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Ферментативные реакции, протекающие в различных биологических системах, являются сложными многостадийными процессами, которые входят в важнейшие метаболические пути, обеспечивающие жизнедеятельность живых организмов. Нормальное функционирование живой клетки обусловлено взаимосвязанной и регулируемой деятельностью отдельных звеньев – ферментов, в сложной ферментативной цепочке. Деятельность подобной сложной системы находится под влиянием как внешних (температура, давление), так и внутренних (рН, ионная сила) факторов. Известно также, что в живых системах присутствует множество разнообразных низкомолекулярных и высокомолекулярных соединений, которые могут взаимодействовать с ферментами, и тем самым влиять на их активность (ингибировать или активировать). Следовательно, с точки зрения регуляции метаболических процессов, большое значение имеют исследования влияния подобных соединений на функционирование ферментативных реакций.

Наличие в биологических системах в условиях *in vivo* различных ингибиторов, взаимодействующих с молекулами ферментов, превращает их в многокомпонентные сложные системы, для изучения которых необходимы высокочувствительные экспериментальные методы, а также теоретические методические подходы [Рубин, 2004; Келети, 1990]. Математическое описание функционирования таких многокомпонентных систем является сложной задачей. В большинстве случаев оно основано на классической теории Михаэлиса-Ментен [Ризниченко, 2002; Варфоломеев и Гуревич, 1999].

В последние десятилетия, параллельно развитию компьютерной науки, в различных научных исследованиях широкое распространение нашло компьютерное моделирование биологических процессов, или так называемые *in silico* исследования, которые позволяют практически аналогичным образом воспроизвести те научные эксперименты, которые можно осуществить физическим опытом. Таким образом, используя такой подход к научным исследованиям, можно детально исследовать поведение тех процессов, которые очень сложно или даже невозможно изучить с помощью научного эксперимента [Poghosyan, Shahinyan, 2011; Di Ventura, 2006]. В настоящее время методы компьютерного моделирования широко применяются в различных областях современной биологии, в том числе в биофизике, в молекулярной биологии, биокинетике. Среди биокинетических работ, посвященных изучению функционирования мультиферментных систем,

выявлению флуктуаций скорости односубстратной ферментативной реакции, исследованию кинетики односубстратных двухферментных реакций, свой вклад имеют также наши соотечественники [Геворкян, 2001; Сукиасян, 2006; Такгезян, 2009]. Органическим продолжением этих исследований является настоящая работа, посвященная компьютерному моделированию двусубстратных реакций в присутствии ингибиторов разных типов.

Значение изучения многосубстратных, в частности двусубстратных реакций, представляющих собой большую часть известных ферментативных реакций, трудно переоценить [Yon-Kahn, 2010]. В отличие от односубстратных ферментативных реакций, при катализе двусубстратных реакций образуются два фермент-субстратных комплекса, причем в случае реакций, протекающих механизмом пинг-понг, образуются два каталитических комплекса, являющихся двойными комплексами. В случае же реакций с последовательным механизмом образуется один каталитический фермент-субстратный комплекс, являющийся тройным комплексом ($[ES_1S_2]$). Поведение фермент-субстратных комплексов в кинетике ферментативных реакций довольно сложно изучать экспериментальным путем, особенно при наличии в среде различных ингибиторов. Ввиду этого становятся очевидными важность и актуальность исследований двусубстратных ферментативных реакций методом компьютерного моделирования.

Цель исследования заключалась в изучении кинетики двусубстратных ферментативных реакций, протекающих последовательным и пинг-понг механизмами в присутствии различных ингибиторов, с помощью компьютерного моделирования.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи исследования**:

- Осуществить компьютерное моделирование двусубстратных ферментативных реакций, протекающих последовательным и пинг-понг механизмами с использованием двух компьютерных программ: пакета динамического моделирования «*STELLA Research Software*» (далее STELLA) и пакета «*Mathematica*».
- Изучить влияние различных ингибиторов на кинетику двусубстратных ферментативных реакций с упорядоченным последовательным механизмом.
- Изучить влияние различных ингибиторов на кинетику двусубстратных ферментативных реакций с упорядоченным механизмом пинг-понг.
- Осуществить сравнительный анализ между реакциями, протекающими с упорядоченным последовательным и с упорядоченным пинг-понг механизмами.

- Определить степень ингибирования каждого рассмотренного ингибитора (конкурентного, неконкурентного и бесконкурентного) в построенных моделях.

Научная новизна. В работе были созданы десять моделей двусубстратных ферментативных реакций, две из которых без присутствия ингибиторов, а восемь – с присутствием различных ингибиторов. Выбор ингибиторов, принадлежащих к одному типу ингибирования, позволяет более четко разделить ингибиторы по механизму их действия и провести сравнительный анализ.

С помощью компьютерного моделирования определяется эффективность действия некоторых ингибиторов на двусубстратную ферментативную реакцию. Показано, что в зависимости от механизма двусубстратной ферментативной реакции, некоторые ингибиторы могут проявлять наиболее эффективное ингибирование, по сравнению с другими.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Детальный анализ кинетических данных двусубстратных ферментативных реакций, протекающих упорядоченным последовательным механизмом.
- Детальный анализ кинетических данных двусубстратных ферментативных реакций, протекающих упорядоченным пинг-понг механизмом.
- Сравнительный анализ динамики протекания двусубстратных ферментативных реакций с последовательным и пинг-понг механизмами.
- Анализ кинетических параметров двусубстратных ферментативных реакций, протекающих вышеупомянутыми механизмами, при наличии в среде конкурентного, неконкурентного и бесконкурентного ингибитора.
- Сравнительный анализ действия разного типа ингибиторов на двусубстратные ферментативные реакции.

Практическая ценность работы. Модели, полученные в работе, являются универсальными моделями двусубстратных ферментативных реакций с последовательным и пинг-понг механизмами, которые могут быть использованы для кинетических исследований вышеуказанных реакций. Созданные модели являются основой как для экспериментальных, так и для теоретических исследований. Кинетические данные, полученные экспериментальным путем, могут быть внесены в соответствующие модели, что позволит в первую очередь проверить механизм исследуемой реакции, а также выяснить механизм действия ингибитора, присутствующего в исследуемом материале.

Модели при наличии различных ингибиторов могут быть также использованы в фармакологических исследованиях. В этом случае, на основе моделей можно

выбрать соответствующий препарат (ингибитор) для решения поставленной задачи, а также определить необходимое количество препарата для достижения определенного эффекта.

Апробация работы. Результаты, вошедшие в работу, были представлены и доложены на международных конференциях: FEBS combined lecture and practical course: «Introduction into Systems Biology: Basics of Proteomics, Bioinformatics, Biostatistics & Integration of Data Generated by these Fields» (Афины, 2011); International conference on bioinformatics and computational biology – «BIOCOMP BG 2012» (Варна, 2012); International young scientists conference “Perspectives for development of molecular and cellular biology III” (Ереван, 2012); WASET conference: «International Conference on Bioinformatics, Computational Biology, Biomedical Engineering» (Барселона, 2013). Материалы диссертации также докладывались на научных семинарах кафедры биофизики биологического факультета ЕГУ.

Публикации. Основные результаты исследований отражены в 8-ми научных публикациях.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 111 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследований, результатов и обсуждений собственных исследований, выводов и списка цитируемой литературы. Работа содержит 30 рисунков и 9 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи диссертационной работы, отмечена научная новизна, перечислены основные положения, выносимые на защиту и отмечена практическая ценность исследования.

Глава 1. Обзор литературы. Изложены литературные сведения о двусубстратных ферментативных реакциях, подробно описаны два основных механизма этих реакций: последовательный и пинг-понг механизмы. Описаны также их кинетические особенности. В обзоре рассмотрены теория ферментативного катализа Михаэлиса-Ментен, подходы математического решения и моделирования химических и биохимических реакций. Значительная часть обзора посвящена рассмотрению основных типов ингибирования ферментативных реакций.

Глава 2. Методы исследований. Для проведения исследований, в частности для построения и испытания моделей ферментативных реакций, были использованы

программные пакеты динамического моделирования «*STELLA Research Software*» (далее STELLA) и «*Mathematica*».

В пакете «STELLA» при помощи графических структур строятся модели, вводятся параметры структур и определяется взаимосвязь между структурами. Испытание модели в пакете связано с правильным пониманием концепции времени. Обычно в пакете время моделируемого процесса не совпадает с реальной длительностью процесса, поэтому приходится вводить понятие «условного времени». Ввод такого понятия для исследования динамики процесса оправдан, поскольку длительность реальных биологических процессов, в том числе и ферментативных реакций, может не совпасть с временными единицами, используемыми в пакете. Все рассмотренные нами модели были испытаны на основе условных временных единиц. Известно, что в рамках детерминистических моделей решаются дифференциальные уравнения, описывающие исследуемый процесс [Ризниченко, 2003; Henderson, 1973]. Для решения этих уравнений в пакете «STELLA» имеется возможность выбора математического метода интегрирования. Все модели в пакете «STELLA» были испытаны методом интегрирования Эйлера.

В пакете «Mathematica» дифференциальные уравнения вносились непосредственным образом в соответствии с исследуемой схемой или механизмом, а также типом ингибирования ферментативной реакции. Нужно отметить, что в отличие от пакета «STELLA», в пакете «Mathematica» испытания моделей проводились на основе метода интегрирования дифференциальных уравнений Рунге-Куты второго порядка. Как в пакете «STELLA», так и в программе «Mathematica», испытания моделей проводились на основе условных временных единиц.

Глава 3. Результаты и обсуждение.

Моделирование двусубстратной ферментативной реакции с последовательным механизмом.

Несмотря на различие методов решения дифференциальных уравнений в использованных пакетах, испытания моделей в обоих пакетах дают идентичную картину кинетики ферментативной реакции с последовательным механизмом. Незначительная временная разница в полученных данных не отражается на характере кинетики ферментативной реакции. За монотонным уменьшением

концентрации субстратов, следует монотонное увеличение концентрации продукта.

В данном разделе также были исследованы выход продукта ферментативной реакции и поведение фермент-субстратных комплексов при различных отношениях констант скоростей. Рассматривались случаи, когда константа скорости образования двойного комплекса превышала константу скорости образования тройного комплекса ($k_1 > k_2$), и наоборот ($k_2 > k_1$). При испытании моделей учитывалась также константа скорости образования продукта, т.е. каталитическая константа (k_3).

При всех рассмотренных отношениях, двойной комплекс $[ES_1]$ быстро достигал своего максимального значения, после чего уменьшался до минимального стационарного значения. Изменения отношений констант скорости приводили лишь к изменению предстационарных максимальных значений концентраций комплекса $[ES_1]$ (таблица 1). Изменения значений всех рассмотренных отношений не приводили к изменению как значения стационарной концентрации, так и поведения тройного комплекса.

Примечательно, что разница даже на один порядок между рассмотренными отношениями констант скоростей k_1 и k_2 , не влияет на выход субстрата, который, согласно полученным результатам, зависит только от каталитической константы скорости k_3 .

Таблица 1. Предстационарные максимальные значения концентраций комплекса $[ES_1]$ при разных отношениях констант скоростей

Значения отношений констант скоростей		Значения концентраций комплекса $[ES_1]$
k_2/k_1	3	2,39
	5	1,75
	10	1,03
k_1/k_2	3	6,45
	5	7,37
	10	8,46

Моделирование двусубстратной ферментативной реакции с механизмом ПИНГ-ПОНГ.

Как и в случае последовательного механизма, испытания моделей в обоих пакетах дают идентичную картину кинетики ферментативной реакции с

механизмом пинг-понг. На основании этого можно заключить, что для подобных исследований может быть использован любой из пакетов.

Большой интерес представляет рассмотрение поведения двух фермент-субстратных комплексов, а также промежуточной модифицированной формы фермента каталитического цикла двусубстратных ферментативных реакций с механизмом пинг-понг. Были рассмотрены несколько отношений каталитических констант, определяющих скорость образования продуктов ферментативной реакции.

С целью детального изучения поведения фермент-субстратных комплексов, а также модифицированной формы фермента, была рассмотрена кинетика ферментативной реакции как в предстационарном, так и в стационарном режиме. Было показано, что при различных отношениях каталитических констант меняются как стационарные концентрации комплексов, так и характер их изменений (рис. 1). В частности, при равных значениях констант скоростей, концентрация первого комплекса $[ES_1]$ после достижения определенного максимума, начинает уменьшаться до определенного – стационарного состояния. Концентрация же второго комплекса $[FS_2]$ с началом реакции начинает увеличиваться до своего стационарного значения, которое довольно близко к стационарному значению первого фермент-субстратного комплекса $[ES_1]$ (рис. 1-В). При увеличении значения константы скорости образования первого продукта, т.е. при $k'/k_3=5$, увеличивается значение стационарной концентрации первого комплекса, а значение стационарной концентрации второго комплекса, наоборот, уменьшается (рис. 1, кр. 1-2). При обратном отношении, т.е. при $k_3/k'=5$, предстационарное поведение комплексов меняется, а именно: стационарная концентрация второго комплекса увеличивается, тогда как первого – уменьшается (таблица 2.).

Таблица 2. Значение стационарных концентраций фермент-субстратных комплексов

Отношения констант скоростей	$[ES_1]$ (μmol)	$[FS_2]$ (μmol)	Условные временные единицы
$k'/k_3=1$	5.03	4.88	700
$k'/k_3>1$	8.32	1.55	160
$k'/k_3<1$	1.68	8.19	300

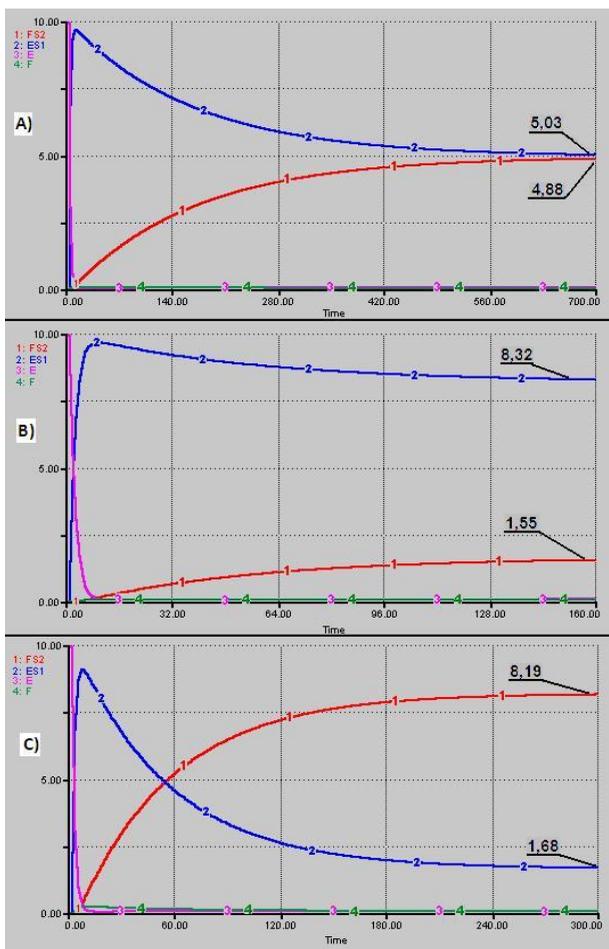


Рис. 1. Поведение фермент-субстратных комплексов при различных отношениях констант скоростей. (A) $k' = k_3$; (B) $k' < k_3$ и $k_3/k' = 5$; (C) $k' > k_3$ и $k'/k_3 = 5$

Важно отметить, что фермент в свободном состоянии, а также промежуточная модифицированная F форма фермента в виртуальной среде не обнаруживаются (рис. 1, кр. 3,4).

Исследование влияния различных ингибиторов на кинетику дусубстратных ферментативных реакций с последовательным механизмом.

С целью выяснения влияния различных ингибиторов на кинетику дусубстратных ферментативных реакций с последовательным механизмом, были

созданы пять моделей, соответствующих каждому типу ингибирования. Симуляции моделей осуществлялись с помощью пакета динамического моделирования “STELLA”, а также с помощью компьютерного пакета “Mathematica”. В таблице 3 приведены начальные значения кинетических параметров, введенные в пакеты моделирования.

Таблица 3. Начальные значения кинетических параметров для двусубстратных ферментативных реакций с последовательным механизмом

-	Константы скоростей для прямых реакций	Константы скоростей для обратных реакций
$E=10 \mu\text{mol}$	$k_1=2 \times 10^{-3} (\text{sec} \times \mu\text{mol})^{-1}$	$k_{-1}=1 \times 10^{-3} (\text{sec})^{-1}$
$S_1=300 \mu\text{mol}$	$k_2=3 \times 10^{-3} (\text{sec} \times \mu\text{mol})^{-1}$	$k_{-2}=1.5 \times 10^{-3} (\text{sec})^{-1}$
$S_2=310 \mu\text{mol}$	$k_3=5 \times 10^{-3} (\text{sec})^{-1}$	-
$I=30 \mu\text{mol}$	$k_i=1 \times 10^{-3} (\text{sec} \times \mu\text{mol})^{-1}$	$k_{-i}=7 \times 10^{-4} (\text{sec})^{-1}$

Для удобства дальнейшего представления, модели двусубстратных ферментативных реакций с последовательным механизмом были обозначены следующим образом:

- модель без ингибитора (контрольная модель) – SQMb (от английского: sequential-model-baseline)
- модель с конкурентным ингибитором по отношению к первому субстрату (S_1) - SQM1 (sequential-model-1)
- модель с конкурентным ингибитором по отношению ко второму субстрату (S_2) – SQM2
- модель с неконкурентным ингибитором – SQM3
- модель с бесконкурентным ингибитором по отношению к первому фермент-субстратному комплексу $[ES_1]$ - SQM4
- модель с бесконкурентным ингибитором по отношению ко второму фермент-субстратному комплексу $[ES_1S_2]$ – SQM5

Симуляция моделей с помощью двух пакетов моделирования как в отсутствии, так и в присутствии ингибиторов, дает идентичную картину кинетики ферментативных реакций. На рис. 2 приведены кривые изменения концентрации продукта в моделях как без ингибитора, так и с наличием различных ингибиторов.

Естественно, что динамика изменений концентрации продукта в моделях с наличием любого типа ингибитора заметно отличается от характера изменений концентрации продукта в контрольной модели SQMb. Вместе с тем необходимо отметить, что конкурентные, неконкурентный и бесконкурентные ингибиторы при одинаковых начальных концентрациях, по-разному действуют на образование продукта в ходе ферментативной реакции (рис. 2). В моделях с конкурентными

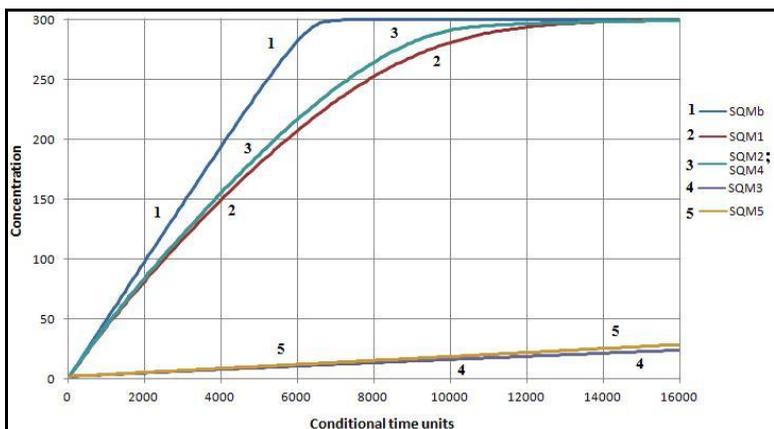


Рис. 2. Выход продукта двусубстратной ферментативной реакции с последовательным механизмом в присутствии различных ингибиторов (кривая 1 – контрольная модель SQMb, кр. 2 – модель SQM1, кр. 3 – модели SQM2 и SQM4, кр. 4 – модель SQM3, кр. 5 – модель SQM5)

ингибиторами по первому и второму субстрату динамика образования продукта довольно близка к динамике образования продукта из контрольной модели, в то время как при одинаковых начальных концентрациях неконкурентного и бесконкурентных ингибиторов, в соответствующих моделях, скорость образования продукта резко снижается (рис. 2, кривые 4, 5). Этот факт свидетельствует о том, что по сравнению с конкурентными ингибиторами, неконкурентный и бесконкурентные ингибиторы при одинаковых начальных концентрациях и сродству к ферменту, проявляют более глубокий ингибирующий эффект, и поэтому являются более эффективными ингибиторами двусубстратных ферментативных реакций с последовательным механизмом.

Таким образом, при одинаковых кинетических параметрах, влияние конкурентных ингибиторов выражается слабее, чем влияние неконкурентного и бесконкурентных ингибиторов. В то же время нужно отметить, что в моделях SQM1 и SQM2, рассмотренные два вида конкурентных ингибиторов в свою очередь также отличаются по уровню влияния на ферментативную реакцию (рис. 2. кривые 2, 3). Как можно убедиться из рис. 2, ингибиторный эффект конкурентного ингибитора по отношению к первому субстрату более выражен по сравнению с ингибиторным эффектом конкурентного ингибитора по отношению ко второму субстрату, что выражается более низкой скоростью образования продукта. Последнее является следствием того, что конкурентный ингибитор по отношению

к первому субстрату взаимодействует с ферментом раньше, чем второй конкурентный ингибитор, и это приводит к более значительному снижению скорости образования тройного комплекса $[ES_1S_2]$ и, следовательно, к снижению общей скорости ферментативной реакции.

Интересен тот факт, что в модели с конкурентным ингибитором по отношению ко второму субстрату, динамика изменения концентрации продукта совпадает с динамикой изменения концентрации продукта в модели (SQM4) с наличием бесконкурентного ингибитора по первому комплексу $[ES_1]$ (рис. 2, кр. 3). Это совпадение и соответственное наложение кривых друг на друга математически объясняется тем, что в эти модели входят одинаковые системы дифференциальных уравнений, не говоря уже о тождестве начальных кинетических параметров. Следовательно, рассуждения о модели с наличием конкурентного ингибитора по отношению ко второму субстрату, будут справедливы и относительно модели с наличием бесконкурентного ингибитора по первому комплексу $[ES_1]$. Однако стоит отметить, что совпадение данных из моделей SQM2 и SQM4 имеет количественный характер, т.е. относится только к кинетическим особенностям моделей, в то время как биологически эти два вида ингибиторов отличаются по механизму действия [Келети, 1990]. Если конкурентные ингибиторы могут связываться непосредственно с ферментом, то бесконкурентные ингибиторы связываются только после формирования фермент-субстратного комплекса. Кроме того, в биологических системах бесконкурентные ингибиторы встречаются довольно редко по сравнению с конкурентными ингибиторами [Cornish-Bowden, 1986].

На рис.-3 приведены кривые зависимости изменения концентрации субстратов от времени для моделей двусубстратных ферментативных реакций с последовательным механизмом при наличии различных ингибиторов. Как можно убедиться из рис.-3, кривые изменения концентраций субстратов являются зеркальным отображением кривых изменений концентрации продуктов (рис. 2), что говорит о взаимосогласованности этих параметров и о четкости работы моделей. В случае сдвигов концентрации субстратов имеет место та же ситуация, т.е. наиболее быстро расходуются молекулы субстрата в моделях соответствующих конкурентному ингибированию, в то время как наиболее медленный процесс расхода субстрата наблюдается в модели с наличием неконкурентного ингибитора. Расход же субстрата в модели бесконкурентного ингибирования по тройному комплексу занимает промежуточное положение между моделями с наличием конкурентных и неконкурентным ингибитором.

Были рассмотрены также изменения концентраций различных ингибиторов в течении ферментативной реакции. Из рис. 4 заметно медленное снижение концентрации конкурентных ингибиторов, а также бесконкурентного ингибитора по отношению к двойному комплексу (кр. 1, 2). Однако концентрация конкурентного ингибитора по отношению ко второму субстрату, и соответственно концентрация бесконкурентного ингибитора по отношению к двойному комплексу с некоторого момента начинают расти. Рост концентрации обусловлен тем, что на конечных этапах рассмотренных ферментативных реакций концентрация комплекса $[ES_1]$ выходит из стационарного состояния и уменьшается. При этом начальная концентрация первого субстрата с течением ферментативной реакции также уменьшается, что и приводит к тому, что к концу ферментативной реакции все больше молекул ингибиторов переходят в раствор в свободном состоянии.

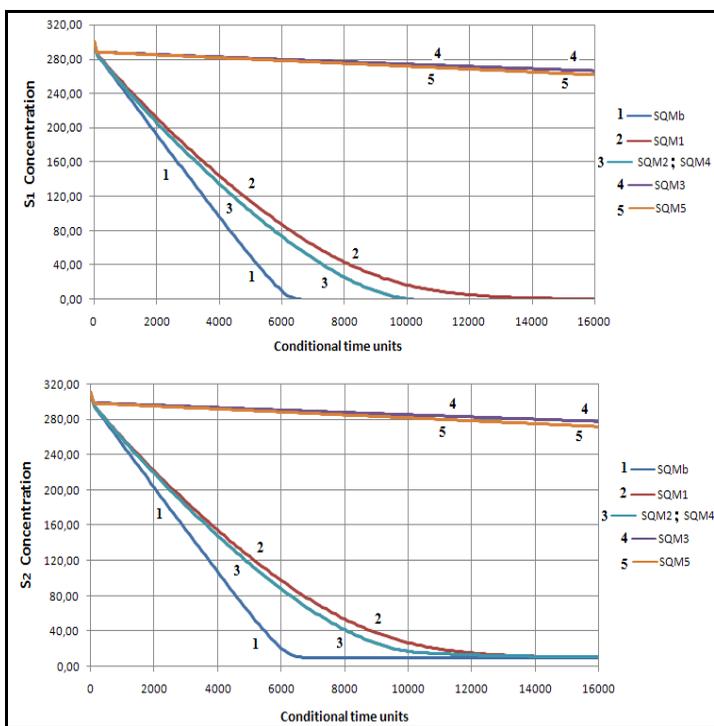


Рис. 3. Изменение концентрации субстратов двусубстратной ферментативной реакции с последовательным механизмом при наличии разных ингибиторов

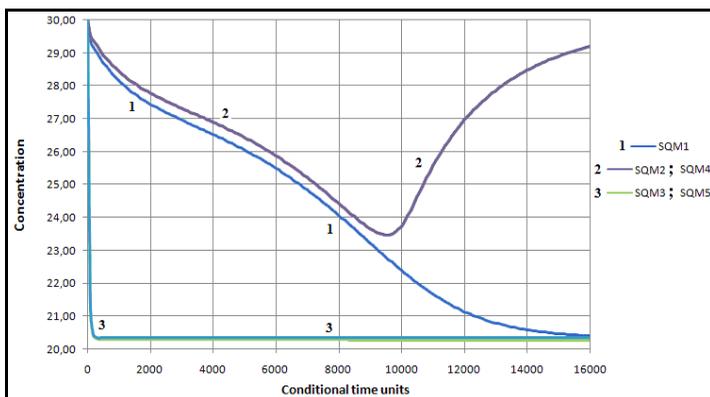


Рис. 4. Динамика изменения концентрации ингибиторов в рассмотренных моделях при последовательном механизме

Исследование влияния различных ингибиторов на кинетику двусубстратных ферментативных реакций с механизмом пинг-понг

Аналогичным образом были созданы и соответственно обозначены модели разных типов ингибирования для механизма пинг-понг. Так, модель без ингибитора (контрольная модель) – PPMb (от английского: ping-pong-model-baseline); модель с конкурентным ингибитором по отношению к первому субстрату (S_1) – PPM1 (ping-pong-model-1); модель с конкурентным ингибитором по отношению ко второму субстрату (S_2) – PPM2; модель с неконкурентным ингибитором – PPM3; модель с бесконкурентным ингибитором по отношению к комплексу $[ES_1]$ – PPM4; модель с бесконкурентным ингибитором по отношению к комплексу $[FS_2]$ – PPM5. Необходимо отметить, что все кинетические параметры, использованные для последовательного механизма, были использованы также для испытаний моделей с механизмом пинг-понг. К имеющимся кинетическим параметрам добавляется каталитическая константа скорости ($k'_1=5 \times 10^{-3}(\text{sec}^{-1})$), ответственная за скорость образования первого продукта реакции.

Эффект влияния рассмотренных ингибиторов определялся по выходу первого и второго продуктов в течении ферментативной реакции (Рис. 5.). На рис. 4 отчетливо видно различие между эффектами ингибирования разных ингибиторов. Как можно убедиться из рис. 4, наиболее сильное влияние на скорость ферментативной реакции оказывает неконкурентный ингибитор модели PPM3 (кр. 3). Уменьшение скорости ферментативной реакции ощутимо также в присутствии бесконкурентных ингибиторов (модели PPM4 и PPM5, кр. 4, 5). Вместе с тем необходимо отметить, что кривые выхода второго продукта в случае

бесконкурентного ингибирования по обоим комплексам накладываются (рис. 5В, кр. 4). Это означает, что эти ингибиторы одинаково действуют на выход второго продукта, в то время как их влияние на выход первого продукта разное (рис. 5А, кр. 4, 5). Из рассмотренных типов ингибирования двусубстратных реакций, протекающих по механизму пинг-понг, наименьшим воздействием обладают конкурентные ингибиторы, что подтверждается графическим расположением соответственных кривых (Рис 5, кр. 1, 2). При этом необходимо отметить, что

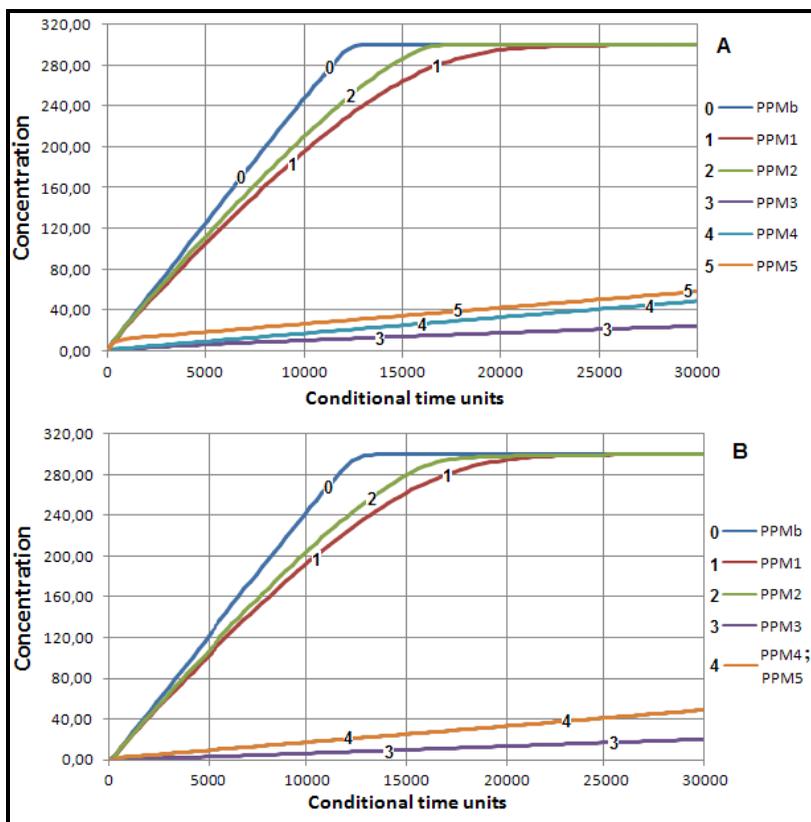


Рис. 5. Изменения концентрации первого (А) и второго (В) продуктов двусубстратной ферментативной реакции с механизмом пинг-понг в присутствии различных ингибиторов.

конкурентный ингибитор по отношению к первому субстрату (модель PPM1) действует более эффективно, нежели конкурентный ингибитор по отношению ко второму субстрату (модель PPM2). Этот факт имеет такое же объяснение как и в случае конкурентного ингибирования реакций, протекающих последовательным механизмом [Gevorgyan et al., 2012]. Для количественной оценки и сравнения ингибирующего эффекта рассмотренных ингибиторов были получены значения концентраций продуктов, соответствующих условному времени симуляций, при котором выход продуктов в контрольной (без ингибиторов) модели асимптотически стремится к своему максимальному значению, т.е. к насыщению. Полученные результаты обобщены в таблице 4.

Таблица 4. Количественная оценка выхода продуктов для двусубстратных ферментативных реакций с механизмом пинг-понг

Модели	Значения концентраций и выход продуктов			
	P ₁ (13.730-ая един. усл. врем.) (μmol)	Выход (%)	P ₂ (14.250-ая един. усл. врем.) (μmol)	Выход (%)
PPMб	299.99	99.99	299.99	99.99
PPM1	250.09	83.36	253.85	84.61
PPM2	271.22	90.40	271.04	90.34
PPM3	13.53	4.51	9.30	3.10
PPM4	23.51	7.83	24.02	8.00
PPM5	32.83	10.94	23.98	7.99

Как видно из таблицы 4, среди рассмотренных ингибиторов при одинаковых начальных концентрациях, наиболее эффективным оказывается неконкурентный ингибитор. Следующими по эффективности действия являются бесконкурентные ингибиторы. Конкурентные же ингибиторы, проявляют самый слабый ингибирующий эффект.

Сравнительный анализ между реакциями, протекающими с последовательным механизмом и механизмом пинг-понг в присутствии ингибиторов разных типов.

С целью проведения сравнительного анализа двусубстратных реакций с последовательным и пинг-понг механизмами в присутствии различных ингибиторов, нами были осуществлены серии виртуальных экспериментов с различными концентрациями ингибиторов, без изменения концентраций субстратов и фермента. Модели были испытаны при отношении концентраций фермента и ингибиторов, равных соответственно 1) $[E]/[I]=1/3$ (при $[E]=10 \mu\text{mol}$; $[I]=30 \mu\text{mol}$) 2) $[E]/[I]=2/3$ (при

[E]=10 μmol ; [I]=15 μmol) и 3) [E]/[I]=2 (при [E]=10 μmol ; [I]=5 μmol). Смысл такого выбора отношений концентраций заключается в том, чтобы рассмотреть как можно больше случаев, которые могут встречаться в *in vivo* исследованиях. Было показано, что изменение концентрации конкурентных ингибиторов не влияло на характер ингибирования как при последовательном, так и при пинг-понг механизмах. При увеличении концентрации конкурентных ингибиторов по отношению как к первому, так и ко второму субстратам, разность значений концентраций продуктов при последовательном и пинг-понг механизмах изменялась монотонно и незначительно (рис. 6).

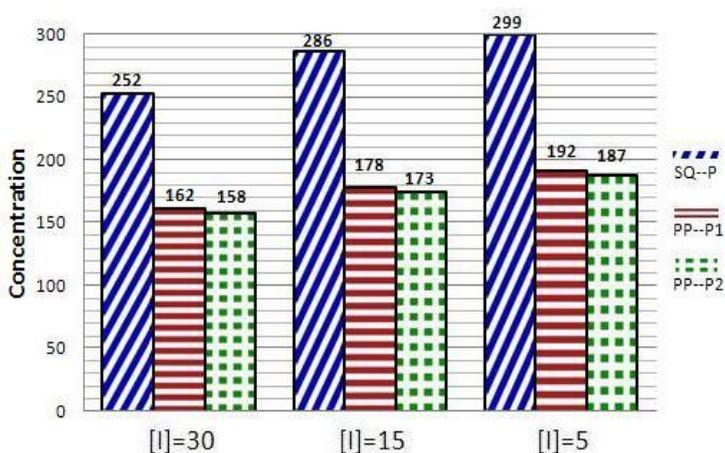


Рис. 6. Зависимость выхода продукта от концентрации конкурентного ингибитора по отношению к первому субстрату.

SQ-P – продукт, получаемый в модели последовательного механизма;

PP-P₁ – первый продукт, получаемый в модели механизма пинг-понг;

PP-P₂ – второй продукт, получаемый в модели механизма пинг-понг.

Иная картина получалась при изменении концентрации неконкурентного ингибитора. Во-первых, уменьшение концентрации неконкурентного ингибитора приводило к резкому увеличению выхода продукта при обоих механизмах. Во-вторых, разность значений концентраций продуктов при обоих механизмах заметно изменялась, причем при уменьшении концентрации неконкурентного ингибитора эта разность увеличивалась (рис. 7).

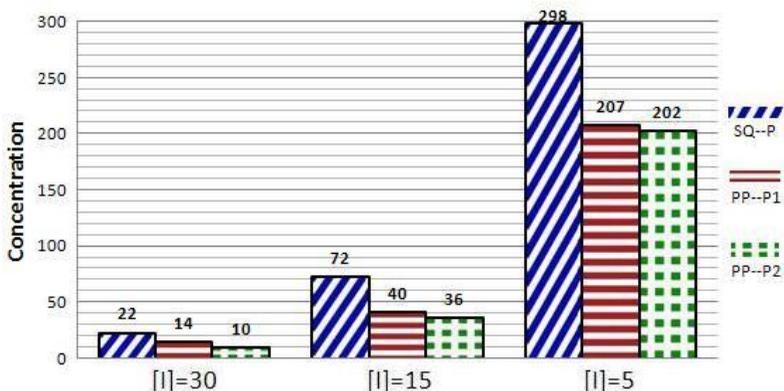


Рис. 7. Зависимость выхода продукта от концентрации неконкурентного ингибитора.

SQ-P – продукт, получаемый в модели последовательного механизма;

PP-P1 – первый продукт, получаемый в модели механизма пинг-понг;

PP-P2 – второй продукт, получаемый в модели механизма пинг-понг.

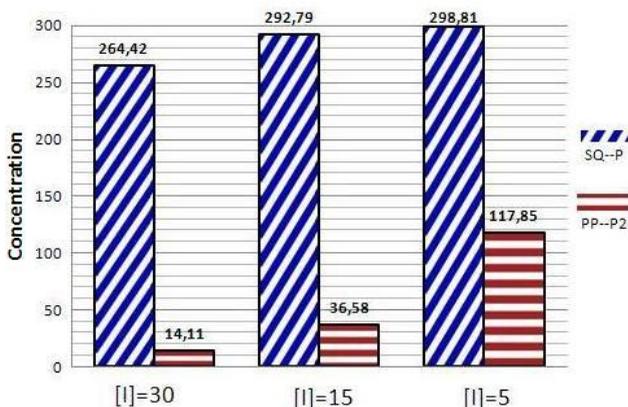


Рис. 8. Зависимость выхода продуктов от концентрации бесконкурентного ингибитора по отношению к комплексу $[ES_1]$.

SQ-P – продукт, получаемый в модели последовательного механизма;

PP-P1 – первый продукт, получаемый в модели механизма пинг-понг;

PP-P2 – второй продукт, получаемый в модели механизма пинг-понг.

Интересные результаты были получены при изучении выхода продуктов, получаемых в моделях бесконкурентного ингибирования. При наличии бесконкурентного ингибитора по отношению к комплексу $[ES_1]$ повышение

концентрации ингибитора существенно влияло на выход продукта ферментативной реакции с механизмом пинг-понг, тогда как в случае последовательного механизма изменение выхода продукта было незначительным (рис. 8).

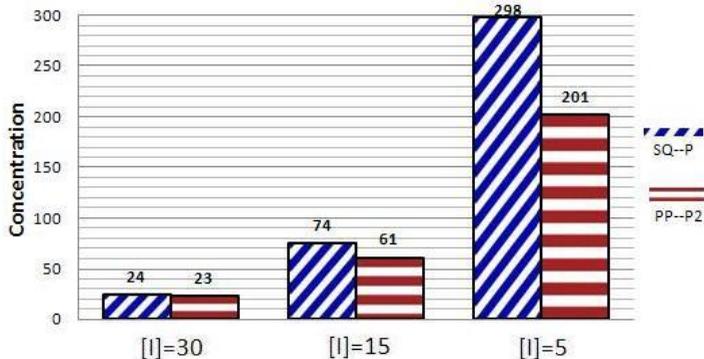


Рис. 9. Зависимость выхода продуктов от концентрации бесконкурентного ингибитора по отношению ко второму комплексу.

SQ-P – продукт, получаемый в модели последовательного механизма;

PP-P₁ – первый продукт, получаемый в модели механизма пинг-понг;

PP-P₂ – второй продукт, получаемый в модели механизма пинг-понг.

Наличие бесконкурентного ингибитора по отношению ко второму комплексу по-разному влияет на концентрацию продуктов реакций с последовательным механизмом и с механизмом пинг-понг (рис. 9). Относительно высокие концентрации ингибитора почти в равной степени угнетают выход продуктов при обоих механизмах, в то время как при низких концентрациях ингибитора концентрация продуктов реакции с последовательным механизмом почти на 50% превышает концентрацию продуктов реакции с механизмом пинг-понг (рис. 9).

Таким образом, сравнительный анализ двусубстратных ферментативных реакций, протекающих последовательным механизмом и механизмом пинг-понг показывает, что во всех рассмотренных моделях, при одинаковых условиях и концентрациях ингибитора, скорость образования продукта в реакциях с последовательным механизмом превышает скорость образования продукта в реакциях с механизмом пинг-понг, что объясняется особенностями этих механизмов, их спецификой.

ВЫВОДЫ

1. Компьютерное моделирование двусубстратных ферментативных реакций, протекающих последовательным и пинг-понг механизмами, с помощью пакета динамического моделирования “STELLA” и пакета “Mathematica” дает идентичную картину кинетики ферментативных реакций.
2. При симуляции моделей двусубстратных ферментативных реакций с последовательным механизмом становится ясно, что даже при разнице между константами скорости связывания субстратов на один порядок, скорость образования продукта зависит только от каталитической константы скорости.
3. Испытание моделей с механизмом пинг-понг показывает, что при различных значениях констант скоростей, промежуточная модифицированная форма фермента F не обнаруживается в виртуальной среде.
4. Сравнительный анализ влияния трех типов ингибиторов на кинетику ферментативных реакции показывает, что как при последовательном, так и при механизме пинг-понг, наиболее эффективным оказывается неконкурентный ингибитор.
5. Вторыми по эффективности угнетения следуют бесконкурентные ингибиторы, а именно: для последовательного механизма – бесконкурентный ингибитор по второму фермент-субстратному комплексу, а для механизма пинг-понг – бесконкурентный ингибитор по первому фермент-субстратному комплексу.
6. Среди рассмотренных типов ингибирования, наименее эффективными для обоих механизмов являются конкурентные ингибиторы. Причем в случае последовательного механизма модель конкурентного ингибирования по отношению ко второму субстрату повторяет поведение модели бесконкурентного ингибирования по отношению к первому фермент-субстратному комплексу.
7. Во всех рассмотренных моделях, при одинаковых начальных кинетических параметрах, скорость образования продукта при последовательном механизме превышает скорость образования продукта при механизме пинг-понг.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Azizyan R.A., Gevorgyan A.E., Arakelyan V.B., Gevorgyan E.S. // Computational Modeling of Kinetics of the Bisubstrate Enzymatic Reaction with Sequential Mechanism. *Electronic Journal of Natural Sciences*, 1:(18), 2012, pp. 3-8.
2. Azizyan R.A., Gevorgyan A.E., Arakelyan V.B., Gevorgyan E.S. // Computational Modeling of Kinetics of the Bisubstrate Enzymatic Reaction With Ping-pong Mechanism. *Biological Journal of Armenia*, 2:(64), 2012, pp. 85-93.
3. Gevorgyan A.E., Azizyan R.A., Arakelyan V.B., Gevorgyan E.S.// Computer-based Comparative Study of Influence of Various Types of Inhibitors On Kinetics of Bisubstrate Enzymatic Reaction With Sequential Mechanism. *Electronic Journal of Natural Sciences*, 2:(19), 2012, pp. 7-13.
4. Azizyan R.A., Gevorgyan A.E., Arakelyan V.B., Gevorgyan E.S. // *In silico* approach for describing influence of different types of inhibitors on the kinetics of bisubstrate enzymatic reactions with ping-pong and sequential mechanisms. International Conference on Bioinformatics and Computational Biology: *BIOCOMP BG 2012*. September 20-21, Varna, Bulgaria, 2012, p. 72.
5. Azizyan R.A., Gevorgyan A.E. // Mathematical Modeling of Bi-Substrate Enzymatic Reactions with Sequential Mechanism in The Presence of Competitive Inhibitors. International Young Scientists Conference: *Perspectives for Development of Molecular and Cellular Biology* III. September 26-29, Yerevan, Armenia, 2012, pp. 53-57.
6. Gevorgyan A.E., Azizyan R.A., Arakelyan V.B., Gevorgyan E.S. // Study of the Influence of Various Types of Inhibitors on Kinetics of Bisubstrate Enzymatic Reactions With Ping-Pong Mechanism Through Mathematical Modeling. *Electronic Journal of Natural Sciences*, 1:(20), 2013, pp. 11-16.
7. Ազիզյան Ռ.Ա. // Հաջորդական եվ պինգ-պոնգ մեխանիզմներով ընթացող երկսուբստրատ ֆերմենտային ռեակցիաների կինետիկայի դինամիկան ոչ մրցակցային արգելաչի ներկայության դեպքում: *Հայաստանի կենսաբանական հանդես*, 1:(65), 2013, էջ. 16-20:
8. Azizyan R.A., Gevorgyan A.E., Arakelyan V.B., Gevorgyan E.S. // Mathematical Modeling of Bi-Substrate Enzymatic Reactions with Ping-Pong Mechanism in the Presence of Competitive Inhibitors. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 74, 2013, pp. 966-968.

ԱԶԻԶՅԱՆ ՌԱՖԱՅԵԼ ԱՐՄԵՆԻ

ԵՐԿՄՈՒԲՍՏՐԱՏ ՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ ՌԵԱԿՑԻԱՆԵՐԻ ՀԱՄԱԿԱՐԳՉԱՅԻՆ
ՍՈՂԵԼԱՎՈՐՈՒՄԸ ՏԱՐԱԲԵՆՈՒՅԹ ԱՐԳԵԼԱԿԻՉՆԵՐԻ ԱՌԿԱՅՈՒԹՅԱՄԲ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր. Երկուրեստրատ ֆերմենտային ռեակցիաներ, հաջորդական մեխանիզմ, պինգ-պոնգ մեխանիզմ, համակարգչային մոդելավորում:

Կենսաբանական համակարգերում ընթացող ֆերմենտային ռեակցիաները բարդ, բազմաստիճան գործընթացներ են, որոնք մտնում են կենդանի բջշի կենսագործունեության համար կարևորագույն հանդիսացող մի շարք մետաբոլիկ ուղիների մեջ: Կինետիկական տեսանկյունից, առանձնահատուկ հետաքրքրություն են առաջացնում բազմաուրեստրատ և մասնավորապես երկուրեստրատ ֆերմենտային ռեակցիաները, որոնք, ըստ էության, կազմում են բոլոր հայտնի ֆերմենտային ռեակցիաների մեծամասնությունը:

Հայտնի է, որ տարբեր համակարգչային փաթեթների միջոցով համակարգչային փորձը՝ *in silico* հետազոտությունները, թույլ են տալիս հայտնաբերել հետազոտվող օբյեկտների մի շարք առանձնահատկություններ, որոնք երբեմն բավականին դժվար է լինում հայտնաբերել *in vitro* հետազոտություններով: Այսպես, կիրառելով համակարգչային մոդելավորման մեթոդը, նպատակ դրվեց ուսումնասիրել հաջորդական և պինգ-պոնգ մեխանիզմներով ընթացող երկուրեստրատ ֆերմենտային ռեակցիաների կինետիկական տարբեր տիպի արգելակիչների առկայության դեպքում, ինչպես նաև համեմատություն անցկացնել երկու մեխանիզմների միջև:

Հաջորդական և պինգ-պոնգ մեխանիզմներով ընթացող երկուրեստրատ ֆերմենտային ռեակցիաների կինետիկայի ուսումնասիրությունը իրականացվել է դետերմինիստիկ մոդելավորման շրջանակներում, օգտագործելով «STELLA» և «Mathematica» համակարգչային փաթեթները: Ստեղծված և փորձարկված բոլոր մոդելներում օգտագործվել են ֆերմենտային ռեակցիաների կինետիկ պարամետրերի միևնույն սկզբնական արժեքները: Հարկ է նշել, որ դիտարկված բոլոր մոդելներում օգտագործվել է պայմանական ժամանակային միավոր (ՊԺՄ) հասկացությունը: ՊԺՄ գաղափարի ներմուծումը նմանատիպ ուսումնասիրություններում դիտարկվող մեծությունների դինամիկ վարքը բնութագրելու համար արդարացված է, քանի որ իրական կենսաբանական պրոցեսների, այդ թվում նաև ֆերմենտային ռեակցիաների, իրագործման ժամանակահատվածը կարող է չհամապատասխանել մոդելներում օգտագործվող ժամանակահատվածներին:

Հաջորդական և պինգ-պոնգ մեխանիզմներով ընթացող երկուրեստրատ ֆերմենտային ռեակցիաների մաթեմատիկական մոդելավորումը «STELLA» դինամիկ մոդելավորման փաթեթով և «Mathematica» համակարգչային ծրագրով հանգեցնում է ռեակցիաների կինետիկայի նույնական պատկերի: Աշխատանքում հետազոտվել է ինչպես սուրստրատների ու պրոդուկտների վարքը, այնպես էլ

կրկնակի և եռակի կոմպլեքսների վարքը կինետիկայի ընթացքում՝ արագության հաստատունների տարբեր հարաբերությունների դեպքում: Երկուստորատ ֆերմենտային ռեակցիաների մոդելների փորձարկման արդյունքում պարզ է դառնում, որ արագության լոկալ հաստատունների միմյանցից նույնիսկ մեկ կարգով տարբերվող արժեքների դեպքում պրոդուկտի ձևավորման արագությունը հաջորդական մեխանիզմով ընթացող ռեակցիայի դեպքում որոշվում է միմիայն ռեակցիաների k_3 , իսկ պինգ-պոնգ մեխանիզմով ընթացող ռեակցիայի դեպքում k' և k_3 կատալիտիկ հաստատուններով:

Աշխատանքում նկարագրվել է նաև հաջորդական և պինգ-պոնգ մեխանիզմներով ընթացող երկուստորատ ֆերմենտային ռեակցիաների վրա տարբեր տիպի արգելակիչների ազդեցության առանձնահատկությունները, ինչպես նաև իրականացվել է արգելակիչների ազդեցության համեմատական վերլուծություն: Մասնավորապես դիտարկվել են՝ մրցակցային արգելակիչներ (առաջին և երկրորդ սուբստրատների նկատմամբ մրցակցային արգելակիչներ), ոչ մրցակցային արգելակիչ և անմրցակցային արգելակիչներ (առաջին և երկրորդ ֆերմենտ-սուբստրատային կոմպլեքսների նկատմամբ անմրցակցային արգելակիչներ): Համապատասխան մոդելների փորձարկումները, ինչպես նաև տարբեր տիպի արգելակիչների ազդեցության համեմատական վերլուծությունը, վկայում են, որ ինչպես հաջորդական, այնպես էլ պինգ-պոնգ մեխանիզմներով ընթացող երկուստորատ ֆերմենտային ռեակցիաների կինետիկայի վրա առավել արդյունավետ են ոչ մրցակցային արգելակիչները:

Արգելակման արդյունավետության տեսանկյունից, ոչ մրցակցային արգելակիչներից հետո ֆերմենտային ռեակցիաների առավել արդյունավետ արգելակում են դրսևորում անմրցակցային արգելակիչները (բացառությամբ հաջորդական մեխանիզմով ընթացող ռեակցիայի՝ առաջին կոմպլեքսի նկատմամբ անմրցակցային արգելակչի): Ընդ որում, հաջորդական մեխանիզմով ընթացող երկուստորատ ֆերմենտային ռեակցիաների դեպքում առավել արդյունավետ է գործում եռակի $[ES_2S_2]$ կոմպլեքսի նկատմամբ անմրցակցային արգելակիչը, իսկ պինգ-պոնգ մեխանիզմի դեպքում՝ առաջին $[ES_1]$ կոմպլեքսի նկատմամբ անմրցակցային արգելակիչը:

Ինչ վերաբերում է մրցակցային արգելակիչներին, ապա պետք է նշել, որ միևնույն սկզբնական կոնցենտրացիաներով տարբեր տիպի արգելակիչներից առավել նվազ արգելակում դիտվում է հենց մրցակցային արգելակիչների առկայության ժամանակ: Պետք է նշել, որ հաջորդական մեխանիզմով ընթացող ռեակցիայի դեպքում երկրորդ՝ S_2 սուբստրատի նկատմամբ մրցակցային արգելակչի ազդեցությունը ֆերմենտային ռեակցիայի վրա համընկնում է առաջին կոմպլեքսի նկատմամբ անմրցակցային արգելակչի ազդեցության:

Երկու մեխանիզմների համեմատական վերլուծության արդյունքում պարզ է դառնում, որ դիտարկված բոլոր մոդելներում, միևնույն կինետիկ պարամետրերի դեպքում, հաջորդական մեխանիզմով ընթացող ֆերմենտային ռեակցիայի պրոդուկտի առաջացման արագությունը գերազանցում է պինգ-պոնգ մեխանիզմով ընթացող ռեակցիայի պրոդուկտի առաջացման արագությանը, ինչը պայմանավորված է այդ մեխանիզմների սպեցիֆիկ առանձնահատկություններով:

COMPUTER BASED MODELING OF BI-SUBSTRATE ENZYMATIC REACTIONS IN
THE PRESENCE OF VARIOUS TYPES OF INHIBITORS

SUMMARY

Enzymatic reactions that take place in biological systems, are quite difficult and multistage processes involved in various important biochemical pathways, which are necessary to vital functionality of living cells. From the viewpoint of the study of the reaction kinetics, a bisubstrate enzymatic reaction appears to be a very interesting case, since it represents majority of all known enzymatic reactions.

It is well known, that *in silico* investigations, through the different software packages, allow to find such features of objects under consideration, which are whether impossible to determine via physical experiments, i.e. via *in vitro* studies, or require quite valuable methodologies and technics. Therefore, the investigation of the bisubstrate enzymatic reactions with sequential and ping-pong mechanisms in the presence of various types of inhibitors using mathematical modeling approach, as well as comparative analysis of the results of simulations have been targeted.

Study of bisubstrate enzymatic reactions with sequential and ping-pong mechanisms have been carried out in the framework of deterministic models, through using «STELLA» dynamic modeling package and «Mathematica» software. In all constructed and then tested models the same values of initial kinetic parameters were applied. It should be mentioned, that in all considered models, during the simulations, the concept of conditional time units was used. Introducing the concept of conditional time units to describe dynamic behaviour of studied parameters in such investigations is justified, due to the fact that the duration of real biological processes, including enzymatic reactions, does not coincide with time units in the models.

The simulations of the constructed models of bisubstrate enzymatic reactions with sequential and ping-pong mechanisms by «Mathematica» and «STELLA» software packages leads to identical picture of kinetics. The behavior of binary and ternary complexes and product release before steady-state at the different ratios of rate constants has been investigated. Simulations of bisubstrate enzymatic reactions show, that even at the ten times difference between local rate constants, the release of product for sequential

mechanism is directly proportional to k_3 catalytic rate constant, while for the ping-pong mechanism it is directly proportional to both, k_3 and k' catalytic rate constants.

In addition to baseline simulations, the computer-based models of bisubstrate enzymatic reactions with sequential and ping-pong mechanisms in the presence of various types of inhibitors, using “STELLA” dynamic modeling package and “Mathematica” software were designed. Particularly, models with the presence of competitive inhibitors (to the first S_1 and the second S_2 substrates), noncompetitive inhibitors and uncompetitive inhibitors (to the first and the second enzyme-substrate complexes) have been considered. Simulations of appropriate models show, that compared to the effects of other types of inhibitors, the non-competitive inhibitor shows the strongest inhibition effect on bisubstrate enzymatic reactions with both sequential and ping-pong mechanisms.

In the terms of effectiveness, after noncompetitive inhibitors the uncompetitive inhibitors demonstrate the second strongest effect (except uncompetitive inhibitor to the first binary $[ES_1]$ enzyme-substrate complex for sequential mechanism). Based on the results of simulations, it can be concluded that for sequential mechanism, the uncompetitive inhibitor to the second ternary $[ES_1S_2]$ enzyme-substrate complex is more effective among uncompetitive ones, while in the case of ping-pong mechanism the uncompetitive inhibitor to the first binary $[ES_1]$ enzyme-substrate complex shows more effectiveness.

Out of all inhibitors under consideration, the inhibition effect of competitive inhibitors is the lowest one. Interestingly, that inhibition effect of the competitive inhibitor to the second S_2 substrate coincides with inhibition effect of uncompetitive inhibitor to the first binary $[ES_1]$ enzyme-substrate complex for sequential mechanism. In terms of product generation of the bisubstrate enzymatic reactions with both sequential and ping-pong mechanisms, the competitive inhibitor to the first S_1 substrate acts a bit more effectively than the competitive inhibitor to the second S_2 substrate.

According to the comparative analysis of the results of simulations of all constructed models using the same initial kinetic parameters, the rate of product generation at the sequential mechanism is greater than the rate of product generation at the ping-pong mechanism. This fact could be interpreted due to specific differences between the mechanisms.

