

A VÁZIZOM CA-KOMPARTMENTALIZÁCIÓJÁNAK MATEMATIKAI ANALÍZISE SZÁMÍTÓGÉPES PROGRAMMAL*

KÉRINÉ FÜLÖP ILDIKÓ, JÓNA ISTVÁN és KÓNYA LÁSZLÓ

Debreceni Orvostudományi Egyetem Központi Kutató Laboratóriuma

Bevezetés

Az izom összehúzódásában nagy szerepe van a lokális Ca-koncentráció változásnak. Az izom felépítését tekintve strukturált, tehát inhomogén és ez a Ca megoszlására is igaz. Steady-state rendszerben a fázishatárokon belül az anyag eloszlása egyenletes, az ekvilibrium gyorsan beáll, míg a fázishatárokon keresztül történő anyagtranszport lassú — kinetikai állandóval jellemezhető — nettó fluxus nincs.

A béka vázizom Ca-megoszlására vonatkozó izotóp kinetikai kísérletek kiértékelésénél abból indultunk ki, hogy steady-state rendszerünket időfüggetlen paraméterű kompartment rendszerrel jól közelíthetjük.

Cikkünkben a ^{45}Ca kimosásával (állandó Ca_{total}) kapott deszaturációs görbék Fourier-transzformációs módszerrel történő dekonvolúcióját ismertetjük. A görbékre kapott paraméterek segítségével ki lehet számítani a kompartmentekre jellemző mennyiségeket attól függően, hogy mely kompartmentek között áll fenn anyagtranszport.

Kompartmentalizálás

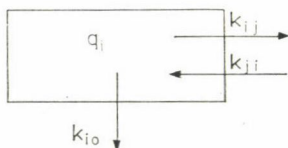
Egy biológiai rendszer kompartmentalizálása egy olyan absztrakt modell kifejlesztése, amely egy adott anyag megoszlását és kinetikáját reprezentálja az adott rendszerben. A kompartment valamely vizsgált anyagnak az a része, amely egységes, de az anyag többi részétől elkülönült kinetikával rendelkezik. Jellemzője a benne található anyagmennyiség (q) és az anyag mozgását jellemző kinetikai állandó (k), ill. felezési idő ($t_{1/2} = \ln 2/k$).

Egy több kompartmentes rendszer lehet nyitott vagy zárt. Ha anyagáramlás csak a kompartmentek között jön létre, a rendszert zártnak nevezzük. Nyitott rendszer a környezetével is közlekedik és steady-state-ben az anyag mozgással párhuzamosan koncentráció változás nem következik be, azaz nincs nettó anyagvándorlás. A béka vázizom Ca-kompartmentalizációjára vonatko-

* IX. Membrán Transzport Konferencián 1979. május 15–18. között Sümegen elhangzott előadás.

zó kísérleteinkben az izom nyitott rendszerként viselkedik. Környezete a homogénnek tekinthető medium, ide, ill. innen történik a jelzett anyag leadása, ill. felvétele.

Egy N kompartmentból álló rendszerben az i -ik kompartment az alábbi módon reprezentálható:



ahol q_i a bentlévő anyagmennyiség, k_{ij} az i -edikből a j -edikbe történő transzport, k_{ji} az ellenkező irányú transzport, k_{i0} a rezervoár és a kompartment közti anyagtranszport sebességi állandója.

A kompartmentben levő anyagmennyiség időbeni változása:

$$\frac{dq_i}{dt} = \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^N k_{ji} q_j - \sum_{\substack{i=1 \\ i \neq i}}^N k_{ij} q_i - k_{i0} q_i. \quad (1)$$

A rendszer minden tagjára felírva ezt az összefüggést, a kapott lineáris differenciál egyenletrendszer megoldása a következő:

$$q_i(t) = \sum_{j=1}^N B_{ij} \exp(-\lambda_j t) \quad (i = 1, \dots, N). \quad (2)$$

Ahol λ_j -k a sebességi állandók mátrixának, $[k_{ij}]$ -nek a sajátértékei és $B_j = [B_{1j}, \dots, B_{Nj}]$ vektorok a megfelelő sajátvektorok.

Technikai okokból csak az izomban levő jelző összes mennyiségét tudjuk mérni, melyet q -val jelölve, időfüggése a következő módon írható:

$$q(t) = A_1 \exp(-\lambda_1 t) + A_2 \exp(-\lambda_2 t) + \dots + A_N \exp(-\lambda_N t) \quad (3)$$

ahol $A_i = \sum_{j=1}^N B_{ij}$.

Ezen $q(t)$ ismeretében megfelelő matematikai eljárással meg tudjuk határozni a benne szereplő exponenciális tagok számát, azaz a komponensek számát, és az A , ill. λ paramétereket. Mivel ezen paraméterek nem közvetlenül jellemzik a kompartmenteket, hanem csak a kompartmentek jellemzőinek függvényei, ezért a továbbiakban kompartmentek helyett komponensekről beszélünk. A ^{45}Ca leadási kísérletekben a $q(t)$ függvényt deszaturációs görbének nevezzük; a λ -k sebességi állandó és az A -k mennyiségi dimenziójúak.

Matematikai módszer

Az exponenciális komponensek meghatározására a Fourier-transzformációs módszert dolgoztuk ki, ennek FORTRAN nyelvű programját, mely a komponensek számát és paramétereit határozza meg R-20 és/vagy R-30 számítógépen futtattuk.

A módszer lényege: a $q(t) = \sum_{i=1}^N A_i \exp(-\lambda_i t)$ függvényt fel tudjuk írni egy Laplace-integrál alakban

$$q(t) = \int_0^{\infty} \exp(-\lambda t) g(\lambda) d\lambda, \quad (4)$$

ahol

$$g(\lambda) = \sum_{i=1}^N A_i \delta(\lambda - \lambda_i) \quad (5)$$

δ a Dirac-delta függvény, amely $\lambda = \lambda_i$ helyen ∞ és $\lambda \neq \lambda_i$ helyeken 0 értéket vesz fel, a számegyenesen vett integrálja 1. Ebből következik, hogy a $g(\lambda)$ elvileg olyan, hogy a λ_i értékeknél kimagasló csúcsokkal rendelkezik, a többi helyen pedig zéró. Minden valódi csúcs egy komponenst jelent, tehát a csúcsok száma megmutatja, hogy a függvény hány komponensre bontható. A csúcsok abszcisszái a keresett λ_i értékek és magasságai arányosak az A_i értékekkel. A számítási és mérési hibák miatt azonban több kis, ún. hibaesúcs is keletkezik, melyek közül a valódi csúcsok kiemelkednek.

A $g(\lambda)$ függvényt a kísérletileg mérhető $q(t)$ függvény segítségével a (4) egyenletről számíthatjuk ki, Fourier-transzformáció és annak inverze alkalmazásával. Bevezetve a $t = \exp(x)$ és $\lambda = \exp(-y)$ transzformációt, legyen

$$F(\mu) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} \exp(x) q(\exp(x)) \exp(i\mu x) dx. \quad (6)$$

Az $\exp(x)q(\exp(x))$ függvény Fourier transzformáltja. K a komplex gamma függvény az $(1 + i\mu)$ helyen és $i = \sqrt{-1}$, ekkor $g(\exp(-y))$ az $\frac{F(\mu)}{K(\mu)}$ inverz Fourier transzformáltja:

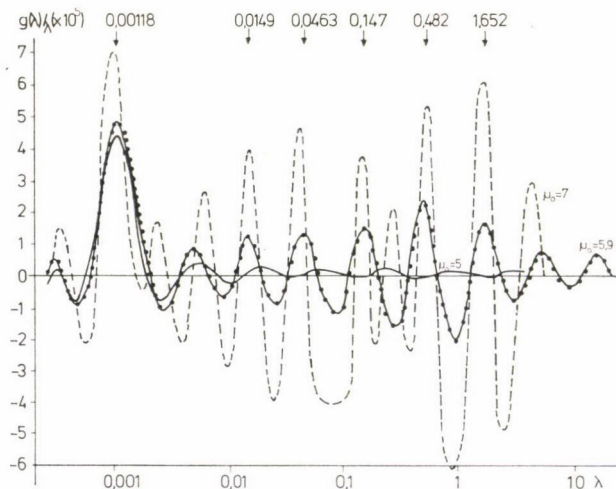
$$g(\exp(-y)) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{F(\mu)}{K(\mu)} \exp(-i\mu y) d\mu. \quad (7)$$

A numerikus megoldás során $F(\mu)$ és a $g(\exp(-y))$ -ban szereplő integrálokban nehézséget jelent, hogy $-\infty$ -tól ∞ -ig terjed az integrációs határ, így a numerikus számításkor egy véges x_0 és μ_0 valós számot kell választani

úgy, hogy $-x_0$ -tól $+x_0$ -ig, ill. $-\mu_0$ -tól $+\mu_0$ -ig történő integrálásnál a levágásból keletkező hiba elég kicsi legyen. A számítógépes program a $q(t)$, ill. az $\frac{F(\mu)}{K(\mu)}$ függvény vizsgálata alapján maga határozza meg az integrációs határokat. Mivel x szerint a $-\infty$ -tól ∞ -ig terjedő függvény értékeket kellene figyelembe vennünk, a t időre bevezetett helyettesítés miatt t -ben 0 -tól ∞ -ig terjedő mérési adatokra volna szükség.

Biológiai okokból azonban nem lehet olyan hosszú ideig mérni, mint amennyi az integrál érték megfelelő pontosságához szükséges, ezért az adatok extrapolálására van szükség, másrészt a mérési pontok nem ekvidisztánsak és ritkábban helyezkednek el, mint ahogy azt a numerikus integrálásoknál a megfelelő pontosság elérése megkövetelné, így a mérési adatok interpolációjára is szükség van.

A g függvény meghatározása után a program megkeresi annak lokális maximum helyeit, tehát a csúcsok helyeit és kiírja azokat. Ezután már a csúcsok magasságai alapján meg tudjuk becsülni a valós csúcsokat és ezek abszcisszái lesznek a λ_i értékek. Ha a számítási hibák és az integrál határok levágása miatt a hibacsúcsok nagyok, a μ_0 érték változtatása a hibacsúcsok helyét megváltoztatja. A komponenseknek megfelelő valódi csúcsok helye bizonyos hibaforráson belül változatlan marad. Ezzel ellenőrizhetjük a valódi csúcsok helyességét. Az 1. ábrán egy kísérleti görbe értékelésénél kapott $g(\lambda)/\lambda$ függvény látható $\mu_0 = 5$, $\mu_0 = 5,9$ és $\mu_0 = 7$ -re.



1. ábra. 60 perces ekvilibrálást követő deszaturációs görbéből számított $g(\lambda)/\lambda$ függvény $\mu_0 = 5$, $\mu_0 = 5,9$ és $\mu_0 = 7$ esetén. A nyílal jelzett csúcsok a valódi csúcsok helyét jelzik, az adott λ helyeken. A $\mu_0 = 5$ -höz tartozó függvény jól mutatja az integrálási határ levágásából származó hibát. A $\mu_0 = 5,9$ és $\mu_0 = 7$ -re számított függvényeket összehasonlítva a valódi (helyileg nem változó) és hibacsúcsok (melyek helye és száma μ_0 -tól is függ) elkülöníthetők

Ha meghatároztuk a λ_i értékeket és behelyettesítjük a (3) egyenletbe, figyelembe véve a mérési értékeket, egy olyan lineáris egyenletrendszer kapunk, ahol az ismeretlenek, azaz az A_i -k száma a komponensek számával, az egyenletek száma a mérési pontok számával egyezik meg. Az egyenletrendszer megoldását a túlhatározottságán kívül megnehezíti, hogy minden tagja hibát tartalmaz. Az egyenletrendszer megoldva A_i -re, megkapjuk a deszaturációs görbék amplitudóit.

A számításokhoz szükséges gépidő R—30-as számítógépen 25—30 perc.

A Fourier-transzformációs módszer előnye más függvény illesztési eljárásokkal szemben, hogy választ ad a komponensek számára, elvileg végtelen számú komponensből álló görbét képes felbontani. A paraméterekre kezdőértékek megadását nem kívánja meg, figyelembe veszi minden egyes paraméter kiszámításánál az összes mérési adatokat. A számítógépes program működésének helyességét 3, 5, és 6 komponenseket tartalmazó teszt adatsorozatokkal ellenőriztük, ahol a legközelebb eső komponensekre a $\frac{\lambda_{i+1}}{\lambda_i} = 2,25$ volt. A teszt függvények értékei $\pm 10\%$ -os véletlenszerű hibával terhelve a paramétereket $\pm 3\%$ -tól $\pm 6\%$ -ig terjedő hibával kaptuk vissza.

Deszaturációs görbék analízise

Kísérleteinkben a béka vázizom ^{45}Ca -deszaturációs görbét mértük különböző izmokon és különböző ideig tartó inkubálási időt alkalmaztunk. Hasonló kísérletekben általában az extracelluláris tér és a szövetet tartó rendszerhez tapadó aktivitás zavaró hatása adja a legnagyobb problémát. Ez az aktivitás izmonként eléggé változó és nagysága ismeretlen. A nehézségek kiküszöbölésére különböző módszereket alkalmaznak, ilyen, hogy a kezdeti mosási értékeket nem veszik figyelembe, vagy úgy, hogy mossák és a kezdeti mosási értékeket nem határozzák meg, vagy úgy, hogy meghatározzák, de különböző mértékben veszik figyelembe. (Az extrapolálás nem a 0., hanem a 15. vagy 30. másodpercben történik.) Ehelyett mi azt láttuk jónak, hogy minden esetben pontosan megmérjük és analízis után értékeljük a szerepét. A matematikai számításokat megkönnyítette volna a mintavételi idő ekvidisztanciája, azonban a gyors komponensek kimutatása céljából a mérési pontokat sűrűbben kellett felvenni az aktivitás kimosásának kezdetén. Ennek következtében a deszaturációs görbék értékeit 0-nál, 10., 30. másodpercnél 1., 2., 4., 10. percnél, a továbbiakban 10 percenként határoztuk meg.

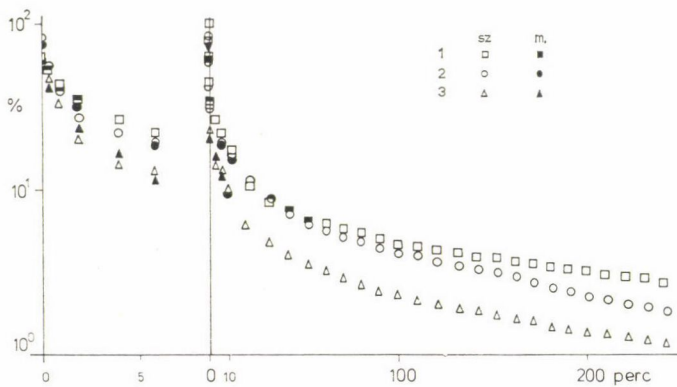
Az izom működésére vonatkozó más jellegű kísérletek arra utalnak, hogy a La bizonyos kompartmentekre specifikus hatással van, a Ca-mal mutatott kémiai hasonlóság alapján. A steady-state-ben mérhető kinetikai változások, a kompartment rendszer paramétereinek megváltozása összevetve a fiziológiai kísérletek eredményeivel, ötleteket adhat a kompartment-

I. táblázat

komp. szám	I.	II.	III.	átlag
1.	91,3	114,8	130,8	112,3
2.	32,5	34,3	36,8	34,5
3.	11,1	10,9	12,8	11,5
4.	3,75	3,42	4,4	3,86
5.	1,26	1,21	1,48	1,32
6.	0,41	0,42	0,47	0,43

rendszer belső szerkezetére vonatkozóan. Így bizonyos kísérleteket La jelenlétében s távollétében is elvégeztünk.

A görbék a számítógépes programmal elemezve minden esetben 6 komponenszt kaptunk. Az 1. táblázat 3 db 60 perces inkubálást követő leadási görbe sebességi állandóinak megfelelő átlagos tartózkodási időket tünteti fel.



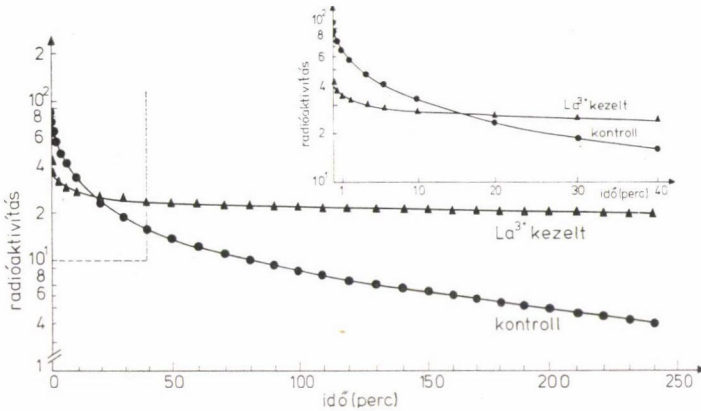
2. ábra. A három görbe a 60 perces inkubálási időhöz tartozó desaturációs görbék. Az üres jelek a meghatározott paraméterekkel számított görbe értékeit jelölik. A telt jelek a mérés során meghatározott radioaktivitást jelölik a kimosási idő függvényében

A 2. ábrán látható a számított paraméterek segítségével meghatározott görbék illeszkedése a desaturációs görbékre 60 perces inkubálási idő esetén.

A 2. táblázatban különböző idejű ekvibrálási időt követő desaturációs görbék $t_{1/2}$ -jei láthatók, valamint a La jelenlétében számított hasonló érték.

2. táblázat

komp. szám	5'	60'	120'	La ³⁺
1.	128,8	139,3	151,7	501
2.	46,2	35,9	40,7	47,4
3.	15,2	12,5	13,7	15,5
4.	4,7	4,1	4,57	4,48
5.	1,45	1,35	1,47	1,45
6.	0,46	0,44	0,45	0,43



3. ábra. A La jelenlétében és távollétében felvett deszaturációs görbék 60 perces inkubálás után. A függőleges tengelyen ábrázoltuk az izomban levő radioaktivitást (relatív %) a kimosási idő függvényében. A jobb felső inzert a görbe kezdeti szakaszát (---) ábrázolja kinagyítva

Külön figyelmet érdemel, hogy a La távollétében a különböző idejű felvételt követő leadásra jellemző $t_{1/2}$ -ek függetlenek az inkubáció idejétől, ami alapvetően támasztja alá modellünk és matematikai eljárásunk helyességét.

A La jelenlétében végzett kísérletekből kapott görbékből a 60 perces inkubálási idejűt analizáltuk. Itt az eltérés az első komponens λ paramétereiben jelentkezett, amelyet az intracelluláris tér megfelelőjének tételezünk fel, és ezért esetleg a La specifikus hatása a felelős. A 3. ábrán látható a 60 perces inkubálási idejű La távollétében és jelenlétében felvett deszaturációs görbék közti különbség. Az adatok alapján nagyobb pontosságú mérések esetén remény van arra, hogy a 2. komponensben mutatkozó „gyengébb” La effektus szignifikanciája eldönthető.

IRODALOM

- BROWNELL, G. L., CALLAHAN, A. B.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **108**, 172 (1963).
 GARDNER, D. G., GARDNER, J. C., LAUSH, G., MEINKE, W. W.: *J. Chem. Physiol.* **31**, 978 (1959).
 GARDNER, D. G.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **108**, 195 (1963).
 JACQUEZ, J. A. in: *Compartmental analysis in biology and medicine*. Elsevier, Amsterdam (1972).
 KÓNYA, L., KÖVÉR, A.: *Symp. Biol. Hung.* p. 17 (1974).
 MEDGYESSY, P.: *Decomposition of superpositions of density functions and discrete distribution*. Akadémiai Kiadó, Budapest (1977).
 PIZER, S. M., ASHARL, A. B., CALLAHAN, A. B., BROWNELL, G. L.: in: *Concepts and Models of Biomathematics*, ed: Heinmets, F. Marcel Dekker, New York (1969).
 RALSTON, A.: *Bevezetés a numerikus analízisbe*. Műszaki Könyvkiadó, Budapest (1973).