

# MÉRÉSI EREDMÉNYEK ANALÍZISE A KÖTÉSKINETIKÁBAN

KANYÁR BÉLA

Semmelweis OTE Számítástechnikai Csoport, Budapest

A biokémiai reakciók vizsgálatánál a reakcióséma felállítása és a mérések végrehajtása mellett egyre fontosabb szerepet kap a kiértékelés, a mérési eredmények és a reakciómodell összehasonlítása. Sok esetben ez az összehasonlítás csak egy egyszerű logikai művelet, amikor például egy reakció végtermékének színe választ ad kérdésünkre. Máskor viszont sok mérési pontot, egy vagy több görbe vonalat kapunk a kísérlet eredményeként. Így pl. a membrántranszport vizsgálatoknál előfordulhat, hogy a membrán mindkét oldalán mérhető a koncentrációk, a feszültségviszonyok vagy izotóp alkalmazásakor a radioaktivitás időbeli alakulása. Az így kapott görbevonalak értelmezése rendszerint a biológiai modell alapján kapott matematikai függvényekkel történik. Annak eldöntése pedig, hogy a mért értékek valóban a feltételezett modelltől származhatnak, sok számolást igényelhet. Természetesen ha a biológiai folyamat minden egyes részletét mérni tudnánk a sok számolás elkerülhetővé válna. Jelenleg azonban a mérések költségei növekedési, a számolásoké pedig erősen csökkenő tendenciát mutatnak. Ezért várható, hogy a kvantitatív módszerek alkalmazása tovább terjed. Az újabb módszerek lehetőségét már célszerű figyelembe venni a kísérletek tervezésénél is. Ugyanis sok esetben matematikai, fizikai stb. megfontolásokkal eleve eldönthető, hogy a tervezett mérésünk valóban válaszolhat-e kérdésünkre. Másrészt a modell és a mérési hiba számítógépi szimulálása becslést adhat, hogy mit és milyen pontossággal kell mérni a sejtett effektus kimutatása érdekében. Ezért először — elsősorban kötéskinetikai példákon — a modellt leíró függvény alakjának, majd a mérési hiba hatásának vizsgálatáról lesz szó. A második részben a kiértékelés, a modellillesztés módszereire kerül sor, kiemelve a sok számolással járó eseteket.

## 1. Modellfüggvény alakjának vizsgálata

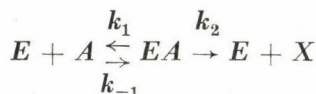
A kísérletek elvégzése előtt rendszerint ki tudjuk választani azt a néhány modellt, reakciósémát, amelyet igen valószínűnek tartunk. Ezután figyelembe véve a kísérleti lehetőségeket egyenként meghatározhatjuk azt a modellfüggvényt, amely leírja a mért adatokat.

A *steady-state enzimkinetikában* modellfüggvény lehet pl. a produktum keletkezési sebessége. Az egyszerű Michaelis–Menten-féle [6, 9] esetben a sebesség

$$v = \frac{K_1 [A]}{K_2 + [A]} \quad (1)$$

alakú, ahol  $[A]$  a szubsztrát koncentrációja,  $K_1$  és  $K_2$  paraméterek, jelen esetben a maximális sebesség ( $K_1$ ) és az ún. Michaelis–Menten állandó ( $K_2$ ).

A produktum keletkezési sebességére a  $v = k_2[EA]$ -ra kapott fenti képlet azonban nemcsak az

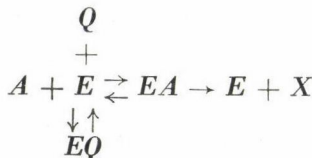


reakció esetén áll fenn, hanem az



esetben is. ( $A$ : szubsztrát,  $E$ : enzim,  $EA$  és  $EA'$ : enzim-szubsztrát komplexek,  $X$ : produktum). Sőt, ha az  $EA'$  komplexen felül további közbenső (intermediér) komplexképződést is megengedünk az eredmény újra az (1) alakú függvény lesz. Természetesen a  $K_1$  és  $K_2$  konstansok ilyenkor más-más függvényei a  $k_1, k_{-1}, \dots$  reakciósebességi tényezőknek, de ez utóbbiak már nem számolhatók egyértelműen. Tehát, ha csak a végterméket tudjuk mérni a szubsztrát koncentráció függvényében és *steady-state*-ről lehet szó (jelen esetben  $\frac{d[EA]}{dt} = 0$ , gyakorlatban  $[E] < [A]$ ), eleve reménytelen pl. az intermedierek számának, vagy akár a  $k_1, k_{-1}, \dots$  reakciósebességek meghatározása, a szerkezeti azonosítás.

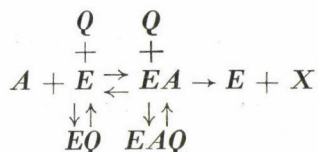
Az inhibitorok alkalmazása további információt szolgáltathat a kötési mechanizmusok vizsgálatában. Egy inhibitor és egy szubsztrát esetén két független változóval rendelkezik a modellfüggvény, ami növeli a különböző függvények közötti diszkriminálhatóság lehetőségeit. Amennyiben a  $Q$ -val jelölt inhibitor az



reakció szerint egy  $EQ$  stabil komplexet képez, akkor *steady-state*-ben a reakciósebesség

$$v = \frac{K_1 [A]}{1 + K_2 [A] + K_3 [Q]} \quad (2)$$

alakú lesz. A fenténél bonyolultabb esetben, az



reakciónál a  $Q$  inhibitor az  $EQ$  komplex egy részét is leköti, ami a reakciósebességi képlet nevezőjében egy pozitív tag megjelenésében mutatkozik meg. A függvény pontos alakja

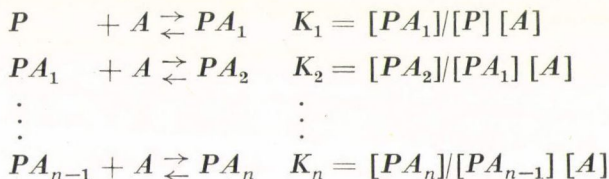
$$v = \frac{K_1[A]}{1 + K_2[A] + K_3[Q] + K_4[A][Q]} \quad (3)$$

A (2) és (3) alapján elvileg nincs akadály, hogy a két mechanizmust a  $v$  méréssel megkülönböztessük.

Különböző reakciósémák esetén kapható reakciósebességi függvények — egymással összehasonlítva is — találhatók LAIDLER és BUNTING (1973) könyvében, ahol szinte minden alapvető típusú reakció tárgyalására sor kerül.

A nagyszámú molekulákból felépülő és *konformáció változásra hajlamos proteinek* esetén nem meglepő, ha a kísérleti eredmények magyarázatára több kötőhelyet is fel kell tételezni és egy szubsztrát molekula kötődése befolyásolja a következő kötődését.

ADAIR (1925) feltételezése szerint a  $P$  proteinhez egymás után kötődhetnek az  $A$  szubsztrát molekulák, miközben a kötési állandók megváltoznak. A reakcióséma az asszociációs állandókkal:



Egysúly esetén a proteinhez kötött szubsztrát molekulák aránya a protein kötőhelyeihez viszonyítva

$$J = \frac{K_1[A] + 2K_1K_2[A]^2 + \dots + nK_1K_2 \dots K_n[A]^n}{1 + K_1[A] + K_1K_2[A]^2 + \dots + K_1K_2 \dots K_n[A]^n} \quad (4)$$

alakú lesz. A (4) kifejezésben levő  $K$  konstansok jelentése megegyezik a reakciósémánál levő asszociációs állandókkal.

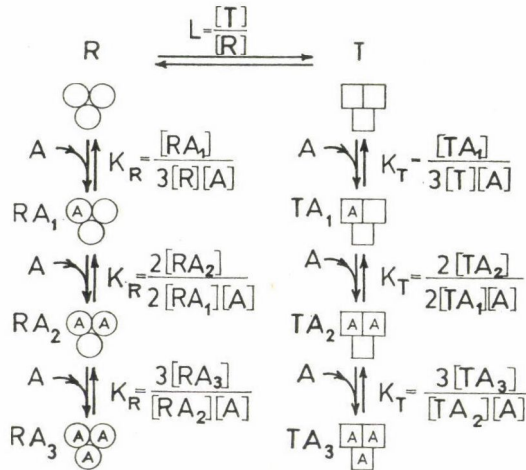
MONOD, WYMAN és CHANGEUX (1965) modellje szerint:

a) a proteinek két módosulatban lehetnek jelen ( $R$  és  $T$ ),

b) a proteinek alegységekből (kevésbé pontosan: kötőhelyekből) állnak és

c) az alegységek csak egyszerre változtathatnak módosulatot.

A modell illusztrálására nézzünk egy három alegységből álló proteint (az eredeti közlemény 4 alegységből álló rendszert tárgyal).



I. ábra. MONOD et al. (1965) modellje három alegység esetén.  $R$  és  $T$ : a protein két módosulata;  $A$ : szubsztrát,  $RA_i$  és  $TA_i$ : komplexek,  $L$ : a két módosulat egyensúlyára jellemző,  $K_R$  és  $K_T$ , asszociációs állandók

Az 1. ábrán körrel és négyzettel jelöljük a két módosulatot. Az  $R$  és  $T$  állapot közötti egyensúlyra az  $L$  jellemző,  $K_R$  és  $K_T$  pedig a két módosulat esetén az ún. mikroszkopikus asszociációs állandó, mely a kötődések során nem változik, azaz az alegységek közötti kölcsönhatás elhanyagolható. A  $K$  kifejezésekben található 3 és 2 tényezők a szabadon levő, ill. már betöltött helyek számával kapcsolatosak, ui. ha pl. 2 szabad hely van, az  $A$  kötődési lehetősége kétszerese az 1 szabad helyhez képest. Hasonlóan pl. 3 betöltött hely esetén a disszociáció valószínűsége nő meg.

A fentiek figyelembevételével a megkötött  $A$  szubsztrát molekulák részaránya az összes kötőhelyhez viszonyítva

$$J = \frac{(K_R + LK_T)[A] + 2(K_R^2 + LK_T^2)[A]^2 + (K_R^3 + LK_T^3)[A]^3}{1 + (K_R + LK_T)[A] + 3(K_R^2 + LK_T^2)[A]^2 + (K_R^3 + LK_T^3)[A]^3} \quad (5)$$

alakú. Általánosan,  $n$  alegység esetén pedig

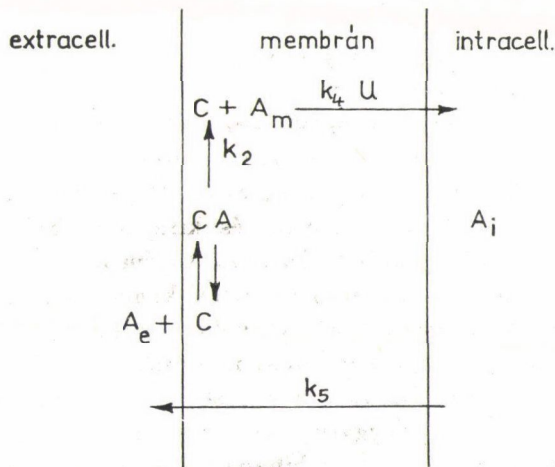
$$J = \frac{\alpha(1 + \alpha)^{n-1} + Lc\alpha(1 + c\alpha)^{n-1}}{(1 + \alpha)^n + L(1 + c\alpha)^n} \quad (6)$$

ahol:  $\alpha = [A]K_R$  és  $c = K_T/T_R$ .

Az (5) kifejezésből belátható (KOSHLAND et al. 1966), hogy illesztése során csak három paraméter határozható meg. Ez éppen elég is, hiszen az eredeti modell is csak három paramétert ( $K_R$ ,  $K_T$  és  $L$ ) tartalmazott. Viszont, ha csak két alegységből indultunk volna ki — az  $[A]^3$ -ös tag nem szerepelne — elvileg is csak két paraméter kiszámolására volna lehetőség, éspedig az  $L$  mellett a  $K_T/K_R$  hányadost lehet megkapni.

A (4) és (5) kifejezések összehasonlításából kitűnik, hogy az ADAIR valamint a MONOD et al. modellek alakilag azonos modellfüggvényre vezetnek. A négy vagy több alegységből álló MONOD-féle modell esetén azonban  $J$  méréséből és illesztéséből négy vagy több paraméter számolható. Mivel a kiinduló biológiai modellben csak három független paraméter van, ezért az illesztésnél kapott paraméterek között összefüggésnek kell fennállni. Amennyiben ez a képletben kifejezhető összefüggés nem áll fenn, a MONOD-féle modellt el kell vetni. MAGAR (1972) kiszámította, hogy a MONOD et al., a KOSHLAND et al. (1966) és a SCATCHARD-féle (1949) modellfüggvények is az ADAIR által kapott (4) kifejezés speciális eseteiként tekinthetők, ahol azonban a  $K_1, K_2, \dots$  paraméterek között egy adott összefüggés áll fenn. Ez az összefüggés már mindegyik esetben más és így ez alapján lehet diszkriminálni a modellek között.

Eddig a mérésnek megfelelő függvény mindig egy algebrai kifejezés volt. Viszont a mai számolási eszközök birtokában már elképzelhető pl. *differenciálegyenletekkel leírható mérések* illesztése is. A transzport és más, időben lejátszódó folyamatok többségében a biológiai modell első matematikai megfogalmazása éppen differenciálegyenlet. A 2. ábrán látható modell példaként szerepel differenciálegyenletek alkalmazásához. Az extracelluláris térben levő  $A_e$  szubszt-rát a membrán külső szélén egy  $C$  carrierrel kölcsönhatásba lép és  $CA$  komplex képződés majd elbomlás révén  $A_m$  produktumként jelentkezik. Ez az  $A_m$



2. ábra. A példaként szereplő (7) differenciálegyenlet-rendszer kiinduló transzportsémája

termék ezután pl. elektromos tér hatására transzportálódik az intracelluláris térfogatba. A kifelé irányuló transzportot csak a koncentráció gradiens tartja fenn. A vázolt modellt leíró differenciálegyenletek a következők:

$$\begin{aligned} \frac{d[A_e]}{dt} &= -k_1[A_e][C] + k_{-1}[CA] + k_5([A_i] - [A_e]) \\ \frac{d[C]}{dt} &= -k_1[A_e][C] + (k_{-1} + k_2)[CA] \\ \frac{d[CA]}{dt} &= k_1[A_e][C] - (k_{-1} + k_2)[CA] \\ \frac{d[A_m]}{dt} &= k_2[CA] - k_4 U[A_m] \\ \frac{d[A_i]}{dt} &= k_4 U[A_m] - k_5([A_i] - [A_e]). \end{aligned} \quad (7)$$

A fenti kifejezésben a  $k$  állandók a transzport, ill. reakciók sebességére, az  $U$  pedig az elektromos térre jellemző. Az  $[A_e]$ ,  $[A_i]$  és  $U$  időbeli változásának méréséből és a modell illesztéséből elképzelhető, hogy a  $k$  paraméterek, majd a  $[C]$ ,  $[CA]$  és  $[A_m]$  változók alakulása számolható. Ehhez azonban pontos mérésekre van szükség.

Differenciálegyenleteket kapunk az anyagcsere feed-back mechanizmusának leírásánál is [16, 17].

## 2. Mérési hiba hatásának elemzése

Gyakran előfordul, hogy a régebbi mérésekből, vagy más tapasztalat alapján durván becsülni tudjuk a modell paramétereit. Ez esetben célszerű kiszámítani a modellben szereplő függvényeket, hogy lássuk ezek alakulását. Így például a membrántranszporttal kapcsolatos (7) differenciálegyenlet-rendszert becsült  $k_1$ ,  $k_{-1}$  stb. paraméterek és adott  $[A_e(0)]$ ,  $[A_m(0)]$  stb. kezdeti koncentrációk mellett megoldhatjuk és kirajzolva kaphatjuk minden egyes koncentráció időbeli lefutását. Jó számítógépi lehetőségek birtokában több szóbjöhető modellt több paraméterérték kombinációkkal is ilyen módon vizsgálhatunk. A kísérleti körülményekhez jobban igazodunk akkor, amikor a számolt „kísérleti” görbére hibát is adunk.

A különböző nagyságú szórással generált véletlen hibával „megterhelt” modellfüggvényt ezután mért függvényként tekinthetjük és először ennek az illesztésével foglalkozunk. Lesz olyan hibanagyság, melynél az illesztés után visszakapjuk az ismert kiinduló paraméterértékeket és ezek hibája 20–30%-

nál nem lesz nagyobb. Ekkora paraméterhiba rendszerint még elfogadható és azt mondjuk, hogy az adott és mesterségesen generált mérési hibánál lényegesen pontatlanabban nem szabad mérni.

Vizsgálható a paraméterek változtatásának hatása a szimulációnál kapott görbékre. Ezt a hatást összehasonlítva a megfelelő mérési hibával becsülhetők azok a helyek, ahol az egyes paraméterek meghatározhatósága érdekében célszerű pontosabban mérni és több pontot felvenni. Több modell közötti diszkriminálásnál elképzelhető, hogy sikerül azokat a helyeket „kijátszani”, amelyeknél a mért érték sokkal fontosabb mint más esetekben.

Természetesen a modellek szimulációjának célszerűségét az adott feladat és a lehetőségek határozzák meg. Gyakran logikai meggondolásokkal, kísérleti tapasztalattal, vagy egyenesek szerkesztésével pótolható a viszonylag nagy előkészítést jelentő számítógépi szimuláció. Továbbá a szimuláció nem a mérést pótolja, hanem csak egy közbenső módszer. Ugyanis rendszerint mind a számolás előtt (mint kiindulás, tapasztalat), mind utána (mint elméleti eredmények bizonyítása) szükség van kísérletekre.

### 3. Modellillesztés, nemlineáris regresszió

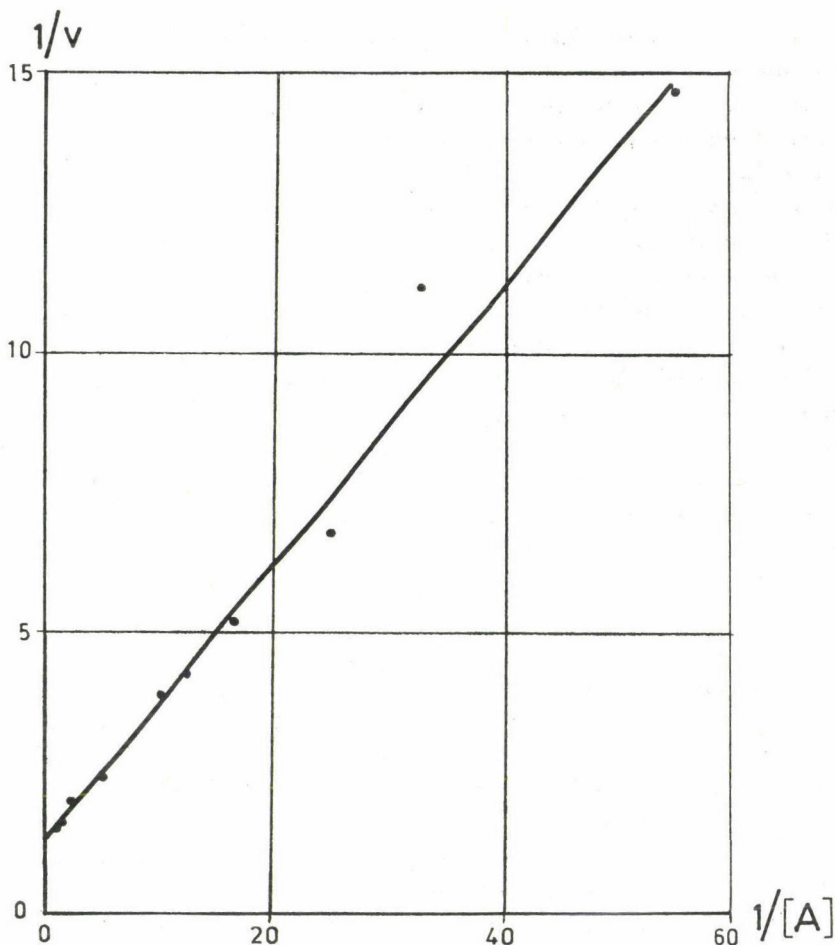
A modellillesztés lényegében azt jelenti, hogy a modell paramétereit — ha szükséges magát a modell szerkezetét is — addig változtatjuk, amíg a mért görbék és a megfelelő, számolt görbék nem egyeznek. A biokémiai szakirodalomban ezek a kérdések rendszerint „mérési eredmények analízise” címszó alatt találhatók (pl. KELETI 1970, NEAME és RICHARDS 1972, LAIDLER és BUNTING 1973). A matematikai jellegű közleményekben már konkrétan; modellillesztés, modelldiszkrimináció, nemlineáris regresszió és paraméterbecslés tárgyszavakkal találkozunk (pl. REICH et al. 1972, MAGAR 1972, BÁRTFAI és MANNÉVIK 1972).

#### 3.1. Linearizálás és kézi szerkesztés hibalehetőségei, korlátai

Michaelis–Menten-féle kinetika esetén a sebesség mérési adatok és az (1) modellfüggvény illesztésénél a  $K_1$  és  $K_2$  paraméterek meghatározása érdekében rendszerint linearizáljuk a függvényt. A Lineweaver–Burk-féle linearizálásnál az  $y = 1/v$  és  $x = 1/[A]$  bevezetésével kapjuk az

$$y = \frac{K_2}{K_1} x + \frac{1}{K_1} \quad (1)$$

egyenes egyenletet. Ha az  $x_i = 1/[A]_i$  szerint ábrázoljuk az  $y_i = 1/v_i$  értékeket a 3. ábrán látható egyenest húzhatunk a pontok közé. Az egyenes segítségével a  $K_1$  és  $K_2$  könnyen számolható. Az ábrán levő adatokat  $K_1 = 0,80$  és  $K_2 = 0,20$  paraméterek mellett kaptuk, miközben a számolt  $v$  értékekhez



3. ábra. Lineweaver–Burk-féle ábrázolás. Az adatok az (1) kifejezésből véletlen generált,  $\sigma = 0,01$  szórású és normális eloszlású zaj hozzáadásából származnak

$\sigma = 0,01$  állandó szórású zajt adtunk. A linearizálás esetén két hibaforrással lehet számolni: 1. az igen gyakori kézi (szemmérték szerinti) szerkesztés nem objektív, 2. a változók transzformációja során a mért pontok súlyozása is megváltozik, amit rendszerint nem veszünk figyelembe még a legkisebb négyzetek módszerének alkalmazásakor sem. Ez utóbbi hibalehetőség következménye, hogy más-más transzformációnál eltérő paraméterértékeket kapunk.

A fenti hibákat kiküszöbölhetjük a súlyozott legkisebb négyzetek módszerének alkalmazásával. Ekkor az egyenes szerkesztésénél a pontosabbnak mért értékeket jobban figyelembe vesszük. Amennyiben egy pontban több mért érték van és hibát tudunk számolni, akkor a súlytényezők a szórásnégyzet reciprokai, ellenkező esetben pl. a mérések hibatermészete (relatív hiba



állandó, radioaktív mérésnél a hiba a mért érték négyzetgyöke stb.) alapján is lehet súlytényezőket találni. Koordináta-transzformációnál a súlyfaktorokat is át kell alakítani. Ha  $g$ -vel jelöljük az eredeti súlytényezőt és  $F(y)$ -nal a koordináta-transzformáció során az  $y$ -ból kapott függvényt (azaz az  $F(y)$ -t fogjuk illeszteni az  $y$  helyett), akkor BEVINGTON (1969) szerint az új súlytényező jó közelítéssel

$$g' = g / \left( \frac{dF(y)}{dy} \right)^2, \quad (2)$$

ahol  $dF(y)/dy$  az  $F(y)$   $y$  szerinti deriváltja. Előző esetünkben  $F = 1/v$  (ugyanis  $v$  az eredeti függő változó) és

$$d(1/v)/dv = -1/v^2, \text{ így}$$

$$g'_i = g_i v_i^4, \text{ vagy } g'_i = g_i / \left( \frac{1}{v_i} \right)^4$$

Ebből látszik, hogy az új súlytényező bevezetése a 3. ábrán levő egyenes esetén a kisebb  $y_i = \frac{1}{v_i}$  pontokat súlyozza a nagy  $y_i$  pontokkal szemben.

A fentiek illusztrálására a 3. ábrán található adatokkal összehasonlítottuk a különböző módszerek révén kapott eredményeket. Az I. táblázat szerint a kiinduló  $K_1 = 0,800$  és  $K_2 = 0,200$  értékeket a helyesen alkalmazott súlytényezők esetén kaptuk vissza a legpontosabban. Az Eadie-féle [9] linearizálásnál ( $y_i = v_i/[A]_i$  és  $x_i = v_i$ ) a helyes súlytényezőknél ( $g_i = [A]_i^2$ ) sem kaptunk jobb eredményt mint  $g_1 = \text{állandó}$  esetén. Ez lehet a véletlen műve, de meg kell jegyezni, hogy az alkalmazott matematikai eljárások feltételezik, hogy az  $x$  változó beállított és nem mért értékekkel rendelkezik. Ez nem teljesül az Eadie-féle transzformáció után. Az egyes módszerek közötti különbségeket befolyásolja a paraméterek értéke és a mérési hiba nagysága is. Így legtöbbször nehezen becsülhető az a hiba, amit helytelen súlyozással követünk el.

#### I. táblázat

Illeszkedési eljárások összehasonlítása. A kézi (szemmel történt) egyenes szerkesztésénél öt személy által kapott maximális és minimális értékek láthatók

Módszerek	$K_1$	$K_2$
Kézi eljárás a Lineweaver-Burk egyenesből	0,74—0,89	0,18—0,24
Súlyozás nélküli számolás a Lineweaver-Burk egyenesből	0,977	0,268
Helyes súlyozással a Lineweaver-Burk egyenesből	0,804	0,198
Eadie linearizálással súlyozás nélkül	0,829	0,213
Eadie-féle linearizálással helyes súlyozással	0,824	0,215
Kiinduló értékek (pontos eredmények)	0,800	0,200

Amennyiben nem az abszolút, hanem a relatív mérési hiba állandó (példánknál az előbbi volt) akkor már az eredeti súlytényező ( $g$ ) is arányos az  $1/v^2$ -tel, tehát az új súlytényező ( $g'$ )  $v^4/v^2 = v^2$ -tel lesz arányos.

Az előzőkből kitűnik, hogy a linearizálásból származó hibák helyes súlytényezők mellett a súlyozott négyzetek módszerével részben kiküszöbölhetők. Ennek ára a többlétszámolás, ami miatt számítógép alkalmazása tanácsos. Természetesen az eredmények pontosságának igénye viszonylagos, sokszor a kézi szerkesztés révén már a célnak megfelelő pontosságot tudunk elérni.

A linearizálás módszerének legnagyobb gyengesége, hogy bonyolultabb függvények rendszerint nem linearizálhatók. A görbék szakaszonkénti „ki-egyenestése” még segíthet ekkor, de ez a nagy hibalehetőség miatt ritkán használatos. Ez korlátozza a linearizálás további alkalmazását.

### 3.2. Nemlineáris regresszió (paraméterbecslés) elve

Matematikai szempontból egyszerűbb az illesztés, ha a modellfüggvény a paraméterektől lineárisan függ, pl.  $y = K_0 + K_1x + K_2x^2$  esetben. Az enzimkinetikában azonban a függvények a paraméterekben nemlineárisak [pl. az (1) függvény is], ezért a nemlineáris regresszió módszerét kell felhasználni. Ennek kinetikai alkalmazásával találkozunk a már említett REICH et al. (1972) és MAGAR (1972) munkáin kívül pl. MANNERVIK és BÁRTFAI (1973) esetén.

A nemlineáris regresszió alkalmazásának lépései a következők:

#### a) Vizsgálandó modellek kiválasztása

Rendszerint a korábbi ismeretek, a tapasztalat alapján erősen csökkenthetjük a szóba jöhető modellek számát. A maradék modelleknél a mérésnek megfelelő függvényt kell azután illeszteni. Célszerű megnézni azt is — mint az előzőkben már szó volt —, hogy a különböző modellfüggvények matematikai alakja nem egyforma-e? Ugyanis nem lehet meglepetés, ha az azonos alakú függvényeknél ugyanolyan jó vagy rossz illeszkedést kapunk.

#### b) Kezdő paraméterértékek megadása

A jelenlegi nemlineáris regressziós módszereknél a paramétereket először durván meg kell becsülni. Az eljárás ezután iterációval, lépésenként ezeket a durva értékeket javítja. Lineáris regressziónál kezdőértékek megadása nem szükséges.

#### c) Legkisebb négyzetek módszerének alkalmazása

A modell illesztése, a paraméterek javítása a

$$\Phi = \sum_{i=1}^N g_i [y_i(p) - \tilde{y}_i]^2 \quad (3)$$

különbségi négyzetek összegének minimalizálása révén történik. Az  $N$  a mérési pontok száma,  $y_i$  az  $x_i$  helyen mért érték,  $y_i(p)$  az előzőnek megfelelő számolt érték és a  $p$  paraméterek függvénye,  $g_i$  pedig a súlytényező. Általános esetben az  $x$  független és az  $y$  függő változó (modellfüggvény) is többfajta lehet. Pl. szubsztrát és inhibitor, vagy két különböző szubsztrát esetén két  $x$  változó van. Ha viszont egy reakciónál kétféle anyagot (pl. két terméket) is mérünk, kettő lesz a függő változók száma, azaz két modellfüggvényünk van egy modelltől.

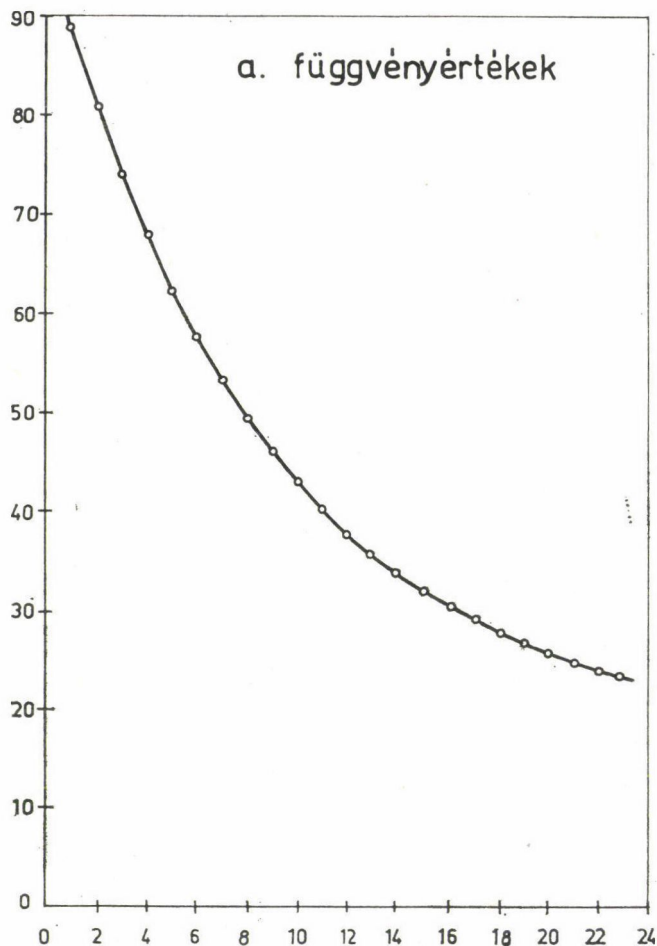
A  $\Phi$  négyzetösszeg minimalizálására használható módszerek közül elsősorban a MARQUARDT-féle (1963) eljárást tartja jónak REICH (1972), BÁRTFAI, ENDRÉNYI és RIEGLER (1974). Nemlineáris esetben a minimalizálásnál számítógép nélkül szinte nem lehet megmozdulni. Így a legtöbb eljárásról gépi programok állnak rendelkezésre [5, 7]. A programok egy része a minimalizálás végén a paraméterértékek mellett kiszámolja a paraméterek hibáját és a paraméterek közötti korrelációt is. Ez utóbbi eredmények azonban a matematikai feltételek nem teljesülése miatt eléggé pontatlanok lehetnek. Továbbá nemlineáris esetben az sincs kizárva, hogy lényegesen különböző paraméterértékeknél közel azonosan jó illeszkedést kapjunk. Előfordulhat, hogy a kapott minimumhely lokális jellegű és létezik egy sokkal kisebb is. A fenti kételyek rendszerint igen sok számolással csökkenthetők.

### 3.3. Kompatibilitás és egyértelműség vizsgálata

Az előző pontban vázolt eljárás alkalmazása után meg kell vizsgálni (hogy a számolt és mért értékek közötti eltérés vajon csak a véletlen hiba következménye-e) a modell és mérés kompatibilitását, adekvátságát. Az illeszkedés jószágának eldöntése céljából rendszerint egyazon ábrán vesszük fel a számolt görbét és a mérési pontokat (4a. ábra) és szemrevételezéssel döntünk. Ennél pontosabban dönthetünk, ha a számolt és mért értékek közötti különbségeket vesszük fel kinagyítva, mint az a 4b. ábrán látható. Így könnyebben észrevehetőek a súlyozott különbségekben (reziduálokban) megmutató tendenciák. A 4a. ábrán jó illeszkedést állapítanánk meg, a b. ábrán azonban ezeket a reziduálokat kinagyítva már gyanakodni kezdünk, hogy valami periodicitás mutatkozik, tehát az eltérések nemcsak a véletlen következményei.

Kételyek esetén természetesen már kvantitatív módszerhez kell folyamodni a döntést illetően, különösen azért, mert a szemrevételezés szubjektív. Jó illeszkedés esetén a súlyozott reziduálok átlaga 0 körül mozog (pontosabban a várható értékük zérus), nagyság szerinti gyakorisági eloszlásuk normális és a mérési pontok sorrendje szerint vizsgálva a szomszédos vagy másodsomszédos elemek között nincs kapcsolat, korreláció [15]. Összefoglalva, nem szabad semmilyen szabályosságot felfedezni a reziduálok között.

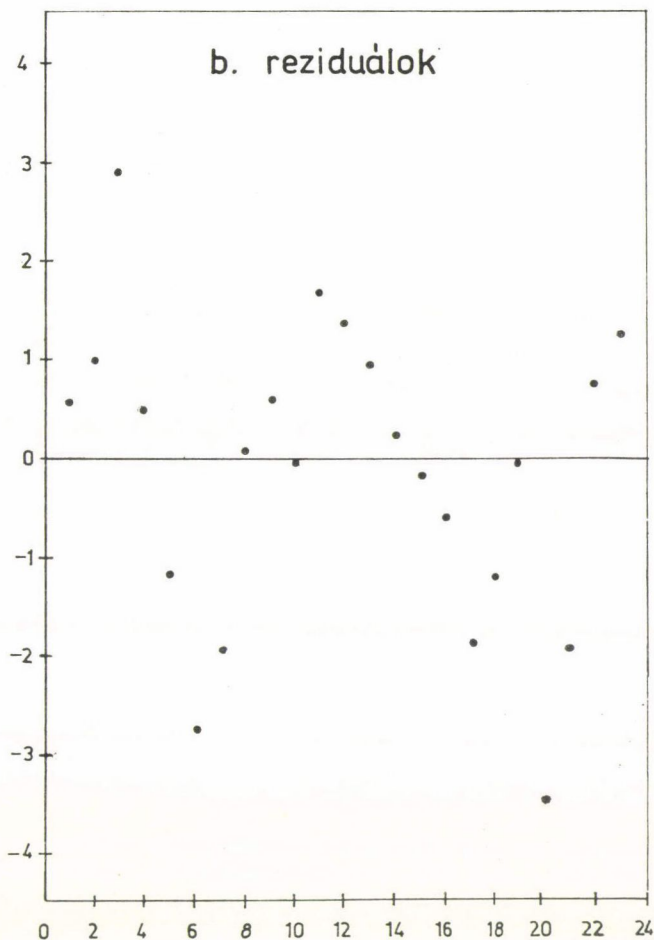
Az egyértelműség, a konzisztencia kérdése a kompatibilitásnál is több



4. ábra. Kétfajta ábrázolásmód a mért és számolt függvényértékek közötti különbségek vizsgálatához. a) kinagyítás nélküli — a szokásos — ábrázolás, b) a különbségek (reziduálok) kinagyítva

problémát okoz. Ugyanis egy éppen még illeszkedő függvénynél összetettebb függvény, egy bonyolultabb modell rendszerint szintén jó illeszkedést mutat. Ilyenkor megegyezés szerint a legegyszerűbb illeszkedő modellt fogadjuk el, bár a legtöbb problémát a közel azonos bonyolultságú esetek okozzák. Újabban a paraméterek hibáját és a közöttük levő korrelációs tényezőket próbálják felhasználni a legjobb modell kiválasztására, kevés eredménnyel [2]. Egyelőre úgy látszik, hogy ilyen esetben a továbblépést csak újabb mérések jelenthetik.

Az ismertetett eljárásokat elsősorban ott célszerű használni, ahol pontos eredményekre van szükség. Követelmény, hogy ekkor már a kiinduló mért értékek is kis hibával rendelkezzenek. Tájékoztató jelleggel azonban ez eset-



ben is célszerű ábrázolni a mért adatokat. Ugyanis a jelenlegi számítási módszerek nem mindig vezetnek helyes eredményre, s a durva hibákat, eltéréseket egy tapasztalt szakember könnyen felismeri. Így ezek az újabb módszerek szükség esetén mintegy kiegészítik a régebben használt kiértékelési eljárásokat. Pontos mérések és kiértékelések esetén azonban félő, hogy a modellezés során eddig alkalmazott feltevések már kevésbé teljesülnek. Így pl. a steady-state közelítés mellett esetleg már a tömeghatás törvényének érvényességét is célszerű megvizsgálni.

Látható, hogy az újabb és pontosabb kiértékelési eljárások a lehetőségek mellett újabb problémát is felvetnek a biológus számára. Ezért semmiképpen sem szabad kritika nélkül elfogadni a hosszú számolások — melyeket az orvos-biológus legtöbbször nem is tud követni — eredményét. Mindenképpen szükséges a közbenső lépések és az eredmények értelmezése biológiai, fizikai stb. szempontból is.

## Összefoglalás

A mérések kiértékelése, a modell és mérési adatok illesztése során alkalmazható matematikai módszereket már célszerű figyelembe venni a kísérlet tervezésénél. Elképzelhető, hogy a modellfüggvény alakjának vizsgálatával és a modell számítógépi szimulációjával meghatározhatjuk azokat a mérési pontokat, amelyeknél a mért érték döntő fontosságú lehet két különböző modell (mechanizmus) diszkriminálásához. Ezáltal a mérések száma csökkenthető, a lényeges pontokra nagyobb hangsúlyt helyezhetünk. A jelen számítástechnikai eszközök mellett már pl. differenciálegyenlet-rendszerrel leírható modellekkel is dolgozhatunk.

Az alkalmazható kvantitatív eljárásokkal rendszerint pontosabb eredményeket kaphatunk mint pl. a grafikus módszerekkel, de ez utóbbiak mindenképpen hasznosak maradnak a kiinduláshoz, a durva esetek elkülönítésére.

A matematikai és számítástechnikai módszerek bevezetése azonban nagy problémát is jelenthet. Mivel a kísérletező orvostól, biológustól stb. már nem követelhető meg a módszerek részletes ismerete, könnyen előfordul, hogy azokat egy általános séma szerint alkalmazzák, a speciális körülmények figyelembevétel nélkül. Így illesztés során a gyakran alkalmazott legkisebb négyzetek módszerében is helyesen kell megválasztani a súlytényezőket. A súlytényező hatása, mint az a tárgyalt példában is látható, erősen megváltoztatja a végeredményeket.

Amennyiben az illesztésre kerülő függvény nem linearizálható, alkalmazható a nemlineáris regresszió. Lényeges, hogy az illeszkedés után megvizsgáljuk a reziduálok tulajdonságát; átlagértéket, eloszlást és a szomszédos elemek közötti kapcsolatot (korrelációt).

A kiértékelés végén kapott eredményeket a biológiai, fizikai stb. tapasztalat alapján kell értelmezni, miközben ismerjük a számolások során alkalmazott feltevések biológiai értelmét is.

## IRODALOM

1. ADAIR, G. S.: *J. Biol. Chem.* **63**, 529 (1925).
2. BÁRTFAI, T., ENDRÉNYI, L., R. RIEGLE: Személyes közlések (1974).
3. BÁRTFAI, T., B. MANNERVIK: In: *Analysis and Simulation of Biochemical Systems* (ed. H. C. Hemker, B. Hess) pp. 197–209, North-Holland Publ., Amsterdam (1972).
4. BEVINGTON, P. R.: *Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences* pp. 124, McGraw-Hill Book Comp., New-York, London, Sydney (1969).
5. DIXON, W. J.: (ed.) *Biomedical Computer Programs (BMD)*, X-Series, Univ. of California Press, Los Angeles, London (1971).
6. KELETI, T.: *Enzimkinetika*, Magyar Biokémiai Társaság jegyzete, Budapest (1970).
7. KUESTER, J. L., J. H. MIZE: *Optimization Techniques with Fortran*, McGraw-Hill Book Comp., New York, St. Louis, London, Toronto (1973).
8. KOSHLAND, D. E., G. NÉMETHY, D. FILMER: *Biochem.* **5**, 365 (1966).
9. LAIDLER, K. J., P. S. BUNTING: *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, Clarendon Press, Oxford (1973).

10. MACAR, E. M.: *Data Analysis in Biochemistry and Biophysics*, Academic Press, New-York (1972).
11. MANNERVIK, B., T. BÁRTFAI: *Eur. J. Biochem.* **37**, 270 (1973).
12. MARQUARDT, D. W.: *J. Soc. Ind. Appl. Math.* **11**, 431 (1963).
13. MONOD, J., J. WYMAN, J. P. CHANGEUX: *J. Mol. Biol.* **12**, 88 (1965).
14. NEAME, K. D., T. G. RICHARDS: *Elementary Kinetics of Membrane Carrier Transport*, Blackwell Sci. Publ., Oxford, London (1972).
15. REICH, J. G., G. WANGERMANN, M. FALCK, K. ROHDE: *Eur. J. Biochem.*, **26**, 368 (1972).
16. WALTER, C.: *J. Theor. Biol.* **23**, 23 (1969).
17. Woo, K. B.: *Math. Biosci.* **13**, 9 (1972).