

SZOTE Agykutató Intézet, MTA Biológiai Intézet, Szeged

A ³²P jelzett foszfát megoszlásának vizsgálata a vörösvér-
sejt in vitro foszfát anyagcseréjében, a folyamat
modellezése után

Latzkovits László, Fajszi Csaba, Szentistványi István

Ismeretes, hogy a biológiai rendszerek jellemzője kémiai szempontból, akár egyetlen sejtről, vagy izolált szövetrészletről, akár az élő szervezet egészéről beszélünk, hogy azokban egyidejűleg igen nagyszámu kompetitív és konszekutív folyamat játszódik le. A klasszikus biokémia ezen folyamatokat rendszerint izoláltan, azok kölcsönhatásait kisebb-nagyobb mértékben elhanyagolva vizsgálta. Bár a folyamatok mechanizmusának felderítése az ilyen módon nyert részeredmények alapján megtörténhet, azok regulációjáról kvantitatív adatokat csak szimultán vizsgálatuk szolgáltatathat. Az elemi lépések ilyen szimultán vizsgálata nélkülözhetetlenné teszi azok kölcsönhatásainak figyelembe vételét. Azt mondhatjuk tehát, hogy a modern biokémia központi problémája, a reguláció kérdése nélkülözhetlenné teszi nagyszámu folyamat egyidejű kvantitatív vizsgálatát. Ilyen esetben azonban a kémiai folyamatokat leíró reakciókinetikai egyenletek kezelhetetlenül bonyolultak lesznek. A feladat megoldása csak úgy lehetséges, ha a vizsgált rendszert reprezentáljuk egy nála egyszerűbb, jobban kezelhető rendszerrel, a megfeleltetést egyértelműen meghatározva: azaz megadjuk a rendszernek valamely modelljét, és a továbbiakban kísérleti adatainkat ezen modell segítségével értékeljük.

Ismeretes, hogy a kémiai reakciókinetika hidrodinamikai modelleket használ, melyek az egymással reagáló vegyületeket egy-egy folyadék tartállyal, a kémiai reakciót pedig ezek közötti folya-

dék áramlással reprezentálják. A bonyolult reakciókinetikai egyenletek megoldása ilyen "hidrointegrátorral" egyszerűen elvégezhető. A modern kémia, illetve biokémia ugyanakkor reakciókinetikai problémák vizsgálatára is eredményesen alkalmazza a rádióaktív izotópokkal történő jelzés technikáját. A rádióaktív izotóp bevitele a rendszerbe lehetővé teszi, hogy a kísérletek során lényegesen több adat birtokába jussunk: míg a klasszikus kémiai reakciókinetika csak az egyes vegyületek koncentráció változását méri, rádióaktív izotóp alkalmazása esetén mérjük az összaktivitás, illetve fajlagos aktivitás változását is. Ez esetben a rendszert reprezentáló hidrodinamikai modell valamelyik tartályába "színes folyadék" kerül és újabb paraméterként jelentkezik ennek a "színes anyagnak" a mennyisége az egyes tartályokban az idő függvényeként. /Neiman, M.B., Gál Dezső, 1967./

Biokémiai folyamatok /anyagcsere, vagy transzport/ a fentiek értelmében elvégzett modellezése, amennyiben a folyamatot úgy vizsgáljuk, hogy valamelyik vegyületet rádióaktív izotóppal jelzett formában alkalmazzuk /"prekursor pool"/, az irodalomban compartment analysisként, vagy újabban tracer kinetikai modell analízisként számon tartott önálló módszer. /Solomon, A.K.; 1960; Brownell, G.L.; Berman, M.; and Robertson, J.S., 1968./ Bár a compartment analízis modellje elvi rokonságot mutat a kémiai reakciókinetika hidrodinamikai modelljével, attól mégis lényeges vonásokban eltér. /Latzkovits, L.; 1967./ Ennek oka az, hogy míg kémiai rendszerek esetében a hidrodinamikai modell a rendszert tökéletesen reprezentálhatja, biológiai rendszerek esetében az egyes vegyületek vagy éppenséggel vegyületcsoportok homogén compartmentként történő kezelése több-kevesebb elhanyagolást jelent. A compartment analízis alapproblémája ebből adódóan éppen annak a feladatnak a megoldása, hogy kiválasszuk a rendszert, a vizsgált folyamatot legtökéletesebben reprezentáló modellt.

A compartment modelleket legegyszerűbben heurisztikus modellként kezelhetjük. Ez esetben a folyamatot egy n csucsu gráf reprezentálja, melynek csucsai az egymással kölcsönhatásban álló kom-

partmenteket, az élek azokat a kölcsönhatásokat adják, melyek nem eredményeznek koncentráció változást /a továbbiakban ezen kölcsönhatásokat "kicszerélőlésnek" nevezzük/. A koncentráció változás ugyanis a mérési adatok alapján mindig egyértelműen adott, ezért a koncentráció változással járó folyamatok nem befolyásolják annak a kérdésnek az eldöntését, hogy a lehetséges modellek közül melyik reprezentálja a vizsgált folyamatot. Zárt folyamat, zárt rendszer esetén /az in vitro kísérletek többsége/ a gráf bármely csúcsa elvben összeköttetésben lehet bármely másik csucssal. Minden egyes kompartmenthez tartozik egy összaktivitás és fajlagos aktivitás idő függvény. A modell azonban nem szükségképpen tartalmazza az összes lehetséges kölcsönhatásokat. /A valóságban rendszerint nem játszódik le valamennyi elvben lehetséges folyamat/. Ezért azt mondhatjuk, hogy n kompartment esetén ${}_2 \binom{n}{2}$ kombinatorikai modell változat lehetséges. Ezek közül reálisan lehetségesnek fogadjuk el azt a modellt /esetleg modelleket/, melyekre vonatkozóan az izotóp eloszlást leíró BRANSON egyenletek a kísérleti adatok behelyettesítésével /összaktivitás-, fajlagos aktivitás idő függés, koncentráció/ pozitív és jó közelítéssel időben állandó sebességértékeket szolgáltatnak. /Branson, H.; 1961./

A vörös vérsejt in vitro foszfát anyagcsereje esetében viszonylag egyszerű rendszert vizsgálunk. Ismeretes, hogy a vörösvérsejt csak glikolitikus anyagcsérével rendelkezik. Az extracellularis mediumból a sejtbe transzportálódó foszfát rövid 150 perces kísérlet során csak az u.n. "savoldható" vegyületekbe inkorporálódik. Ezért viszonylag egyszerű, zárt rendszerrel van dolgunk, amely azonban mégis 20-25 foszfátészter között elvben lehetséges kémiai folyamatokat involvál. 20 vegyületet figyelembe véve, ez azt jelenti, hogy ${}_2 \binom{20}{2}$ kompartment modell változat lehetséges. Ennek a ${}_2 190$ modell változatnak az ellenőrzése, azaz a BRANSON egyenletek megoldása a kísérleti adatokkal, gyakorlatilag megoldhatatlan feladatot jelent, még számítógép birtokában is. Ezért az említett "savoldható" pool szerves vegyületeit a foszfátészter kötés energiája alapján két nagy csoportba osztottuk:

a./ a nagyenergiájú, könnyen hydrolyzálható: u.n.

"savlabil" vegyületek;

b./ alacsony energiájú, nehezen hydrolyzálható; u.n.

"savresistens" vegyületek.

A rendszerünk ilyen módon négy kompartment segítségével leírható:

A: Extracelluláris anorganikus foszfát kompartment

B: Intracelluláris anorganikus foszfát kompartment

C: Savlabil kompartment

D: Savresistens kompartment.

Ezen 4 kompartment megadása azt jelenti, hogy $2^6 = 64$ modell változat lehetséges, melyek a vizsgált rendszert elvben reprezentálhatják.

Kísérleteinket oly módon végeztük, hogy emberi mosott vörösvérsejteket 37°C hőmérsékleten KREBS-RINGER foszfátban inkubáltunk 150 percig. A Krebs-Ringer foszfát tartalmazta a ^{32}P -jelzett foszfátot /A kompartment/, ezen kívül a kielégítő anyagcsere fenntartására 100 mg % glukozet. Különböző időpontokban: 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 perc után mintát vettünk. A mintákból rendre izoláltuk a fenti 4 kompartment foszfát vegyületeit és meghatároztuk azok koncentrációját, illetve összaktivitását; ebből számítással a fajlagos aktivitást /Martyn, J.B.; Doty, D.; 1949.; Pfleger, K., Seifen, E. 1962/. Az eredményeket az idő függvényeként ábrázoltuk. Az így nyert görbék grafikusán differenciáltuk. A fajlagos aktivitás-, ill. az összaktivitás görbék differenciálhányadosainak értékeit helyettesítettük be a BRANSON egyenletekbe, melyek 4 kompartment esetében a következőképpen írhatók fel:

$$\frac{dI_A}{dt} - \frac{dA}{dt} S_A = W_{AC}/S_C - S_A/ + W_{AB}/S_B - S_A/ + W_{AD}/S_D - S_A/ \quad /1/$$

$$\frac{dI_B}{dt} + \frac{dA}{dt} S_A = W_{AB}/S_A - S_B/ + W_{BC}/S_C - S_B/ + W_{BD}/S_D - S_B/ \quad /2/$$

$$\frac{dI_C}{dt} = W_{AC}/S_A - S_C/ + W_{BC}/S_B - S_C/ + W_{CD}/S_D - S_C/ \quad /3/$$

$$\frac{dI_D}{dt} = W_{AD}/S_A - S_D/ + W_{BD}/S_B - S_D/ + W_{CD}/S_C - S_D/ \quad /4/$$

ahol:

I_A, I_B, I_C és I_D : az A, B, C ill. D kompartmentek összaktivitása /c.p.m./ml mosott vörösvérsejt, vagy 4 ml Krebs-Ringer oldat/

S_A, S_B, S_C, S_D : az A, B, C ill. D kompartmentek fajlagos aktivitása /c.p.m./ / μg foszfor/

W_{XY} : az index által jelzett két kompartment közötti "kicserélődés" sebessége / μg foszfor/perc/ml mosott vörösvérsejt, vagy 4 ml Krebs-Ringer oldat/.

A: az extracelluláris kompartmentben a foszfát mennyisége / μg foszfor/4 ml Krebs-Ringer oldat/

Az 1. illetve 2. egyenletekben szereplő $\frac{dA}{dt} S_A$ tag a koncentráció változást eredményező foszfát transzportot veszi figyelembe és értékét a vizsgált időpontokban az extracelluláris foszfát mennyiségi- idő görbéjének grafikus differenciálásával nyertük. Az egyenletekben szereplő W sebességek a kompartment modelleket leíró gráf /jelen esetben tetraeder/ éleihez tartozó numerikus értékek, melyek az egyes modell változatokban természetesen váltakozva zérus értéket vesznek fel.

A kísérletek során nyert adatok alapján, melyek közül a fajlagos aktivitás, ill. az összaktivitás görbéket az 1. ill. a 2. ábra szemlélteti, az említett 64 lehetséges modell variáció egy részét ki lehetett zárni a következő megfontolások alapján:

Az első ábrából látható, hogy S_C görbéje kifejezetten emelkedik még ott is, ahol:

$$S_C > S_B > S_D \quad /5/$$

Miután ez esetben csupán az A kompartment fajlagos aktivitása nagyobb S_C -nél, ennek növekedése szükségképpen azt jelenti, hogy a reális modellnek tartalmaznia kell a W_{AC} kicserélődést. A továbbiakban szintén a kísérletekben mért adatok alapján kiszámítottuk,

hogy a B kompartmentbe a transzport által közvetített összaktivitás érték az S_B ill. S_C görbék kereszteződése után nagyobb, mint a B compartment összaktivitása. Ez azt jelenti, hogy a B compartment szükségképpen kicserélődésben áll egy nála alacsonyabb fajlagos aktivitású kompartmenttel, ami az /5/ egyenlőtlenség miatt csak D lehet. Tehát a W_{BD} kicserélődésnek léteznie kell.

A továbbiakban összegezzük az /1/, ill. /3/ egyenleteket:

$$\frac{dI_A}{dt} - \frac{dA}{dt} S_A + \frac{dI_C}{dt} = W_{AB}/S_B - S_A/+ W_{AD}/S_D - S_A/+ W_{BC}/S_B - S_C/+ W_{CD}/S_D - S_C/$$

Ezen utóbbi egyenletbe helyettesítve a kísérleti adatokat azon intervallumra vonatkozóan, ahol $S_B > S_C$ az egyenlet bal oldala pozitív előjelűnek adódik. Ugyanakkor a jobboldali tagok közül az 1., 2., ill. 4. nem lehet pozitív / $S_A > S_B$; $S_A > S_D$ és $S_C > S_D$ /. Így a 3. tagnak: $W_{BC} / S_B - S_C /$ mindenképpen pozitív előjelűnek kell lennie, ami azt jelenti, hogy $W_{BC} > 0$. A W_{BC} kicserélődés tehát szükségképpen létezik.

A fentiek alapján azt mondhatjuk, hogy a rendszert reálisan reprezentáló modell tehát szükségképpen tartalmazza a következő kicserélődéseket:

$$W_{AC} ; W_{BC} ; W_{BD}$$

Ezzel a megállapítással a lehetséges modellváltozatok száma igen lényegesen lecsökken:

$$1 + \binom{3}{1} + \binom{3}{2} + \binom{3}{3} = 8$$

Az /1/-/4/Branson egyenletek megoldása az általunk végzett 50 kísérlet 8 időpontjára, mind a 8 modell variációt feldolgozva azt jelenti, hogy igen nagyszámú egyenletrendszer megoldását kellett elvégeznünk. Kézenfekvő, hogy ezt a feladatot számítógép nélkül nem tudtuk volna megoldani. Munkánk során a JATE Minszk 22 típusú digitális számítógépet használtuk.

A számítások eredményeként a 8 lehetséges modell változat közül csak egy esetben kaptunk pozitív és időben állandó sebességértékeket. Ennek sémáját demonstrálja a 3. ábra, ahol a szaggatott vonal a transzportot jelzi, az ellentétes irányu nyilak a kicserélődést. A sebességek numerikus értékeit az I. Táblázat adja. Látható, hogy azok igen jó közelítéssel időben állandóak.

Eredményeinket értékelve azt mondhatjuk, hogy sikerült olyan négy kompartmentes modellt találnunk, melynek segítségével a ^{32}P -jelzett foszfát megoszlása a vörösvérsejt in vitro anyagcseréjében leírható. Nagy mértékben félrevezető lenne azonban, ha modellünk elemeit, a kicserélődéses folyamatokat a négy kompartment között megkísérelnénk direkt kapcsolatba hozni meghatározott anyagcsere folyamatokkal anélkül, hogy erre vonatkozóan kimerítő vizsgálatokat végeznénk. Mégis, figyelembe véve az alkalmazott négy kompartment kémiai jelentését, már modellünk pusztán formális értékelése lehetővé tesz néhány óvatos következtetést.

Az irodalomban általánosan elfogadott, hogy a foszfát ion passzív transzport útján jut be a vörösvérsejtbe. /Passow, H. 1969/ Számos adat van azonban arra vonatkozóan is, hogy az intracelluláris ATP, mely a "savlabil" kompartment 80 %-át adja, a membránon keresztül közvetlen kicserélődésben állhat az extracelluláris anorganikus foszfáttal. /Gourley, D. R. H., 1952; Latzkovits, L.; Huszák, I.; Széchenyi, F. 1966./ Az irodalom általában ellentétesnek tartja ezt a két mechanizmust. A modellben szereplő W_{AC} kicserélődés azt fejezi ki, hogy a kísérleti eredmények logikailag nem zárják ki a két mechanizmus egyidejű létezését. Természetesen ezt a tényt célszerű más módon is valószínűsíteni. A modell formális tulajdonságai azonban ez esetben hasznos utmutatásként értékelhetők.

A W_{BC} , ill. W_{BD} kicserélődéses folyamatok sebességének numerikus megadásával quantitative tudjuk jellemezni az organikus foszfát észterek anyagcseréjét. Figyelembe véve a "savlabil", ill. a "savresistens" kompartment vegyületeinek biokémiai és kémiai karakterét, várható, hogy W_{BC} az energiaigényes folyamatokat, W_{BD} pedig a glykolysist representálja. Újabb kísérleteink, melyek során elvé-

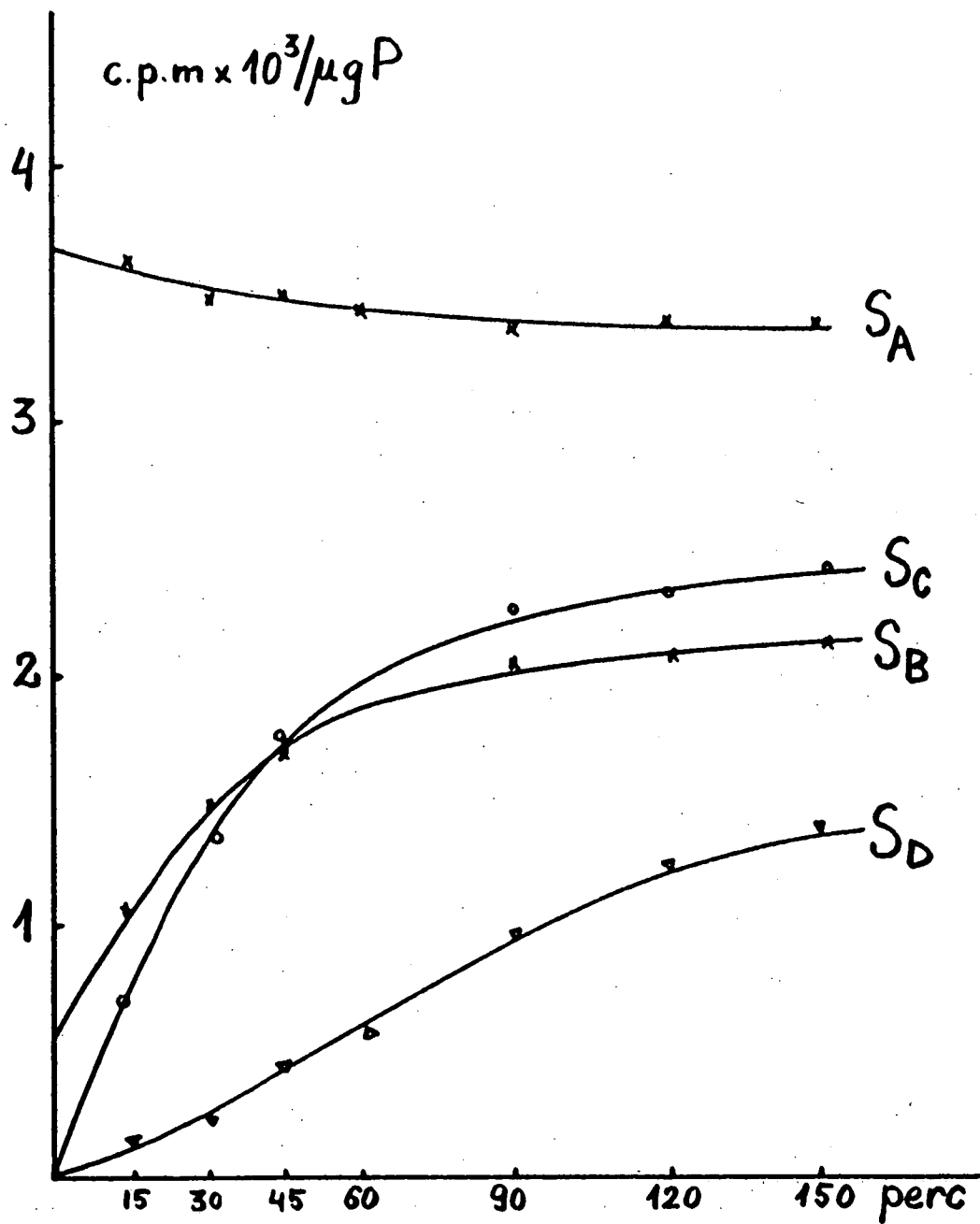
geztük a modell analízist olyan körülmények között, amikor a vörösvérsejt anyagcserét mesterségesen befolyásoltuk, igazolni látszanak ezt a következtetést.

Megállapíthatjuk tehát, hogy komoly reményünk van arra vonatkozóan, hogy modellünk formális tulajdonságait kapcsolatba hozhatjuk biokémiai, élettani realitásokkal.

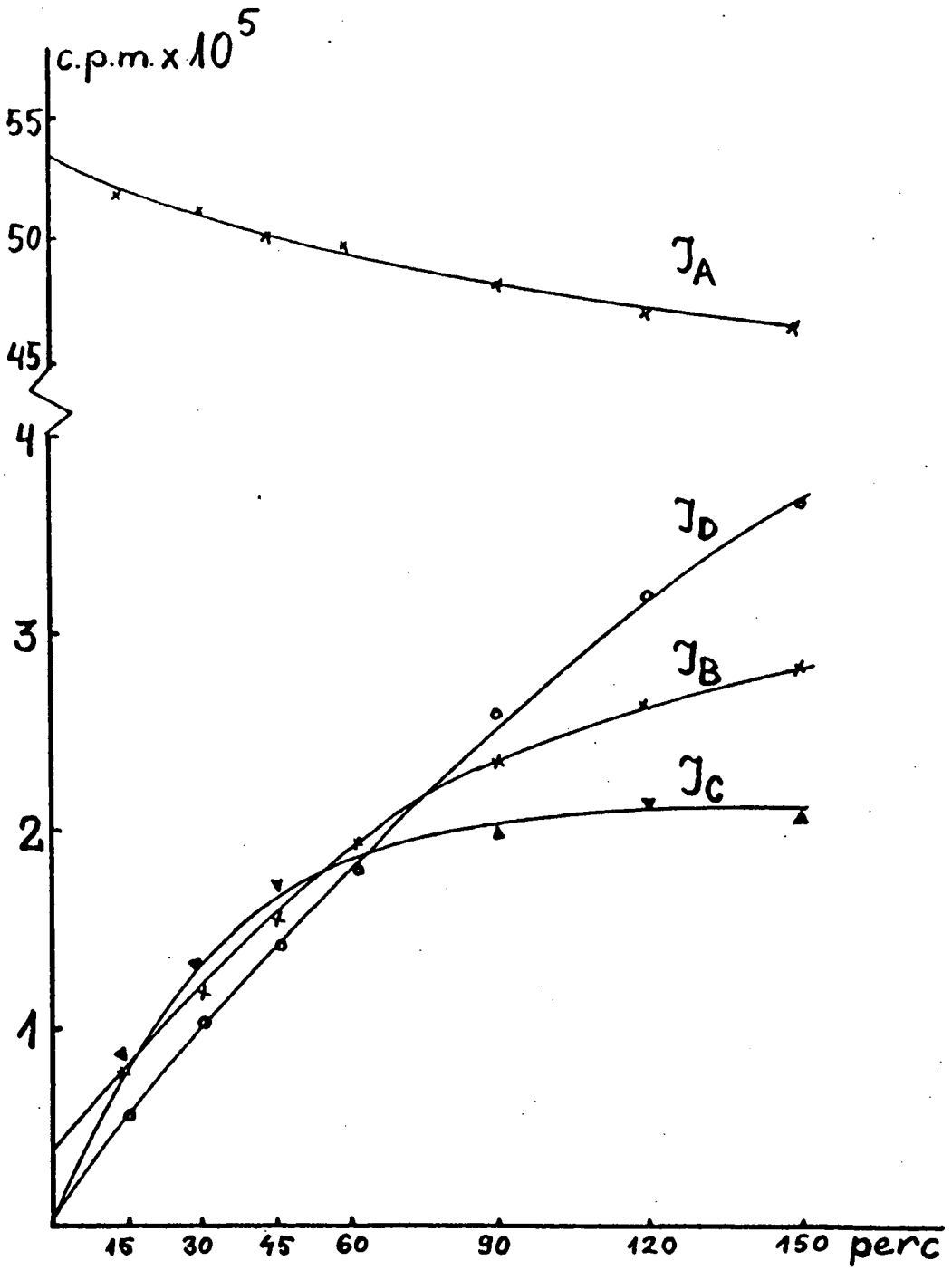
I R O D A L O M

- Branson, H.: Quantitative treatment of metabolic processes; in *Künstliche Radioaktive Isotope in Physiologie, Diagnostik und Therapie* /K.Scheiser, Springer Verlag 1961./ Vol. 1., 596. S.
- Brownell, G.L.; Berman, M. and Robertson, J.S.: Nomenclature for tracer kinetics. *J. Appl. Rad.* 19. 249, /1968./
- Gourley, D.R.H.: The role of ATP in the transport of phosphate in the human erythrocyte. *Arch. Biochem. Biophys.* 40. 1. /1952./
- Latzkovits, L.; Huszák, I.; and Széchenyi, F.: In vitro examination of phosphate exchange between plasma and erythrocytes in the blood of multiple sclerotic patients. *Brain* 89. 831. /1966./
- Latzkovits, L.: A kinetikus izotóp módszer biológiai és biokémiai alkalmazásai; a Kinetikus Izotóp Módszer és Alkalmazásai-ban. /M.B. Neiman és Gál Dezső, Akadémiai Kiadó 1967./ 267. old.
- Martyn, J.B., and Doty, D.: Determination of phosphorus in biological material. *Anal. Chem.*, Washington, 21. 965. /1949./

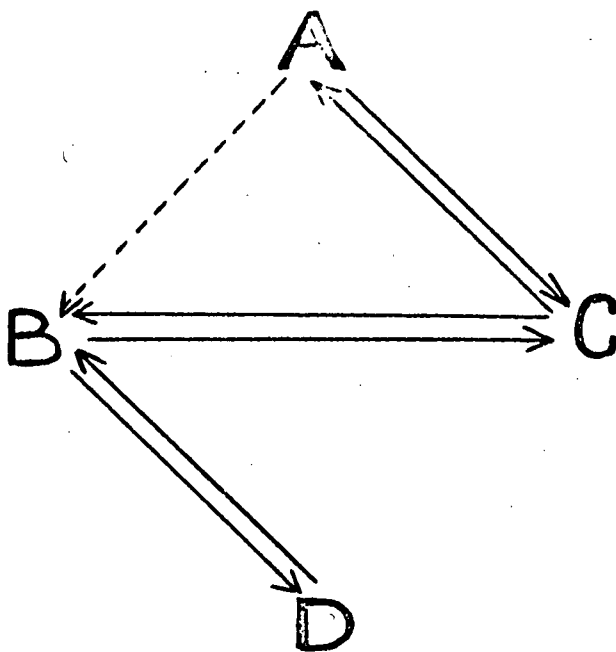
- Neiman, M.B., és Gál D.: A Kinetikus Izotóp Módszer és Alkalmazásai. Akadémiai Kiadó. /1967./
- Passow H.: Passive ion permeability of the erythrocyte membrane. Progress in Biophysics and Molecular Biology Vol. 19., Part 2., pp. 425. /1969/
- Pfleger, K., und Seifen, E.: Phosphat Stoffwechsel der menschlichen Erythrocyten. Biochem. Z. 335. 596. /1962./
- Solomon, A.K.: Compartmental methods of kinetic analysis; in Mineral Metabolism /C.L. Comar and F. Bronner, Academic Press 1960./ Vol. 1. Part A pp. 119.



1. ábra



2. ábra



3. ábra

Idő	w_{AC}	w_{BC}	w_{BD}
0	1,27	1,31	3,8
15	1,20	2,94	2,45
30	1,20	2,13	2,29
45	1,25	2,47	2,65
60	1,23	6,62	2,61
90	1,26	6,97	2,69
120	1,20	7,55	2,62
150	1,02	6,26	1,56

I. Táblázat

