

A Kinetikus Izotóp Módszer alkalmazása a foszfát-
anyagcsere és transzport szimultán vizsgálatára
vörösvérttest esetében

ANDRÁS GIZELLA

okleveles vegyész

egyetemi doktori disszertációja

Készült:

a Szegedi Orvostudományi Egyetem Agykutató Intézetében
és József Attila Tudományegyetem Radiokémia Tanszékén

1970.



Diss. | B 671



Tartalomjegyzék

	Oldalszám
1. A Kinetikus Izotóp Módszer	4.
2. A biológiai rendszerek sajátosságai a kémiai rendszerekkel szemben kinetikai szempontból	12.
3. Tracer kinetikai alapfogalmak	16.
3.1. A vizsgálandó rendszerre vonatkozó definíciók	17.
3.2. A nyomjelzőre vonatkozó definíciók	21.
4. Tracer kinetikai modellanalízis	24.
5. Néhány biológiai probléma tracer kinetikai kezelése	29.
6. A vörösvértest és anyagcseréje	34.
7. A vörösvértest foszfát-anyagcseréje és abban szerepet játszó foszfátvegyületek csoportosítása	37.
7.1. Triklórecetsavban nem oldható vegyületek	37.
7.2. Triklórecetsavban oldható vegyületek	38.
8. A vörösvértest transzport folyamatai	41.
9. A probléma felvetése	46.
10. Az alkalmazott metodikák	51.
10.1. A kísérlet menete és metodikái	51.
10.2. A számítási technika és az izomorf modell kiválasztásának menete az adott esetben	60.

11. Egyszerű tracer kinetikai modell a "tipusos" kísérletek leírására	65.
12. A "tipusos"-tól eltérő kísérletek modellanalízise	83.
13. Eltérő fiziológiai viszonyok tanulmányozása	87.
13.1. Hipotóniás közeg alkalmazása	87.
13.2. Fiziológiástól eltérő pH-k alkal- mazása	93.
13.3. Anyagcsere csökkentése glukóz meg- vonással	100.
13.4. Citrát ion hatása	106.
14. Eredmények megbeszélése	110.
15. Irodalom	118.

1. A Kinetikus Izotóp Módszer

A kémiai folyamatok a valóságban ritkán mennek végbe pontosan úgy, ahogy a sztöchiometriai egyenlet feltünteti. A kémiai reakciók jelentős hányada így összetett, komplex reakció, mely mindig felbontható egymás után /konszekutív/ vagy részben egymás mellett /szimultán/ lefolyó egyszerű reakciók rendszerére. Ezen egyszerű reakciókat reakciólépéseknek vagy elemi reakcióknak nevezik. Az elemi reakciók kapcsolata felvilágosítást ad a termékek közti genetikus összefüggésekre. A reakciómechanizmus tisztázása jelenti az egyszerű elemi reakciók felderítését, valamint azok közötti kapcsolatok megállapítását. A kémiai folyamat reakciómechanizmusának ismerete elméleti jelentősége mellett lehetővé teszi a reakció irányítását. Ilyen komplex kémiai folyamatok közé sorolhatók pl.: a termikus bomlásreakciók, az oxidációs és polimerizációs átalakulások, a heterogén katalitikus folyamatok stb.

Ismeretes, hogy a bonyolult mechanizmusú, komplex kémiai reakciók izotópok alkalmazásával lefolytatott kinetikai tanulmányozása olyan paraméterek meghatározását teszi lehetővé, melyek más módszerrel nem nyerhetők. Ilyen módon a folyamatok mechanizmusának merőben újszerű vizsgálata válik lehetővé. Kémiai folyamatok esetében ezt az eljárást NEJMAN szovjet professzor dolgozta ki, és Kinetikus Izotóp Módszernek nevezte /továbbiakban röviden KIM/. /1/a./

Amíg tehát a klasszikus kinetikai vizsgálat a bruttó reakció egészére ad felvilágosítást, addig a KIM segítségével a reakciók mechanizmusa részleteiben is megismerhető. A KIM kidolgozása zárt rendszerekben végbemenő kémiai folyamatokra történt. A módszer előfeltételei a következők:

a/ Jöjjön létre a reakciótermékek összetételének és koncentrációjának homogenitása.

b/ Anyagátvitel a rendszeren kívülre ne következzen be.

A módszer lényege, hogy megfelelő izotóppal jelzett kiindulási anyagot vagy köztiterméket visznek a reakciórendszerbe és nézik az izotóp megoszlás kinetikáját. Mérni kell az egyes reakciótermékek koncentrációját, összaktivitás értékeit a reakció különböző időpontjaiban. Ezen kísérleti adatok alapján ismerjük az egyes reakciótermékek fajlagos aktivitásainak időbeli változását.

A vizsgált reakció során keletkező X köztitermék képződési és fogyási sebessége meghatározható akár az adott X köztitermék, vagy akár a prekursor jelzése útján. A következő képletekkel lehet kiszámítani jelzett X reakciórendszerbe való bevitele esetén a képződési sebességet $/w_1/$ és a fogyási sebességet $/w_2/$.

$$w_1 = - /X/ \frac{d \ln \alpha}{dt} \quad /1.1/$$

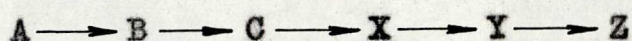
$$w_2 = - /X/ \frac{d \ln \alpha}{dt} - \frac{d/X/}{dt} \quad /1.2./$$

ahol:

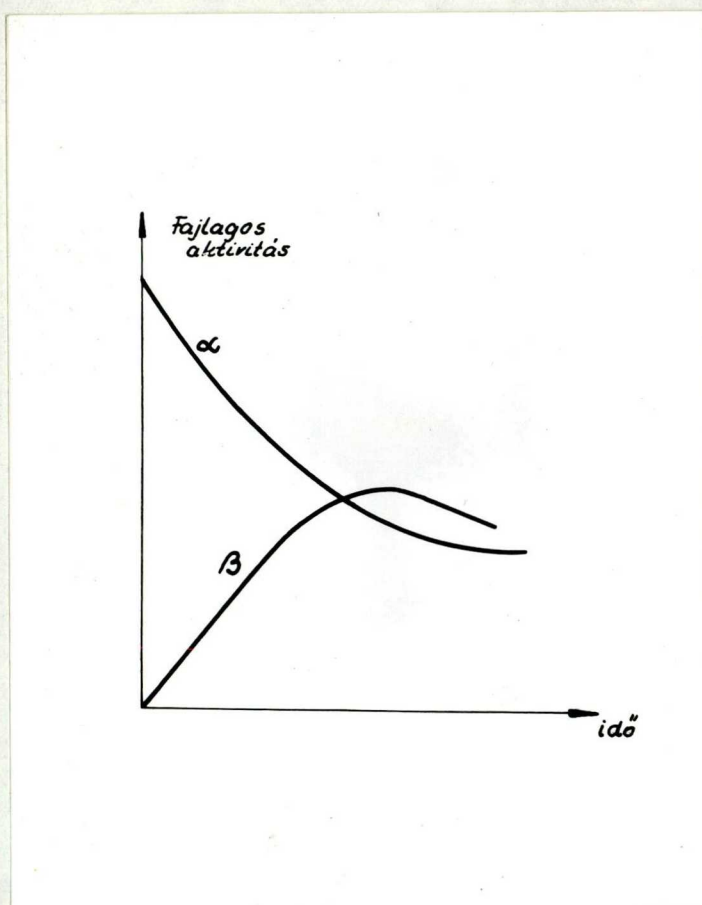
$/X/$ az X köztitermék koncentrációja,

α az X köztitermék fajlagos aktivitása.

A reakciólépések konszekutivitása is eldönthető a KIM segítségével. Álljon a reakció a következő elemi lépésekből:



Amennyiben az X köztitermék egyedüli prekursora Y-nak, valamint a jelzett X mellett inaktív Y-t is visznek a reakciórendszerbe, akkor az X és Y köztitermékek fajlagos aktivitásának időbeli változása megfelel az 1.1. ábrán látható görbék menetének.



1.1. ábra. Az X és Y köztitermékek fajlagos aktivitásának időbeli változása, ha X egyedüli prekursora Y-nak.

α : az X köztitermék fajlagos aktivitása,

β : az Y köztitermék fajlagos aktivitása.

Az X és Y köztitermékek fajlagos aktivitásának időbeli változása a következő összefüggések segítségével adható meg.

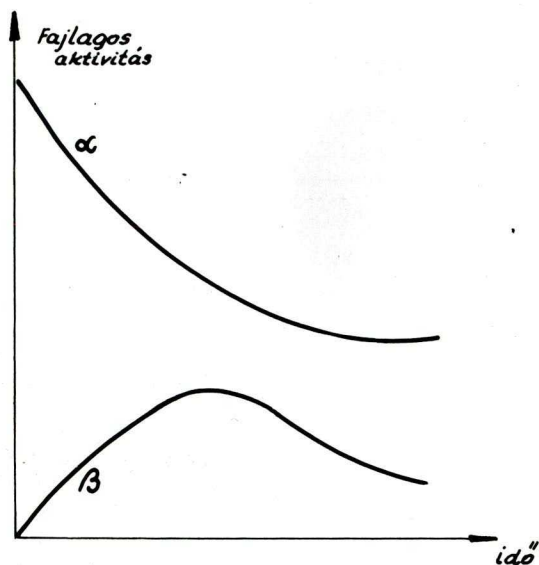
$$\frac{d\alpha}{dt} = - \frac{\alpha w_1}{X} \quad /1.3./$$

$$\frac{d\beta}{dt} = \frac{(\alpha - \beta) w_2}{Y} \quad /1.4./$$

Az 1.1. ábrán a β értéke kezdetben nő, maximumon megy át, majd csökken. A $\beta_{\max}$ az $\alpha = f/t$ görbén fekszik, így ebben a pontban $\alpha = \beta$, valamint az 1.4. egyenletből következik, hogy Y az X-ből képződik. Amennyiben az X és Y köztitermék fajlagos aktivitásának időbeli változását az 1.2. ábra görbéi adják, azaz a $\beta_{\max}$ alacsonyabban van az $\alpha = f/t$ görbe tetszőleges pontjánál, akkor X nem egyedüli prekursora Y-nak, hanem Y más inaktív prekursorból is keletkezik.

Ezen felvett általános jellegű példák is érzékeltetik a KIM előnyét a klasszikus kinetikai vizsgálatokkal szemben. A KIM alkalmazása tehát rendkívül jelentős kémiai rendszerek reakciókinetikai vizsgálataiban, melyet a következő konkrét példák is szemléltetnek.

ROGINSZKIJ és munkatársai /2./, valamint sok kutató /3., 4., 5./ számos vizsgálatot végzett a butén dehidrogénezésére és izomerizációjára vonatkozóan. A lehetséges elemi lépések ebben az esetben egy tetraéder modellen ábrázolhatók, melyet az 1.3. ábra mutat.



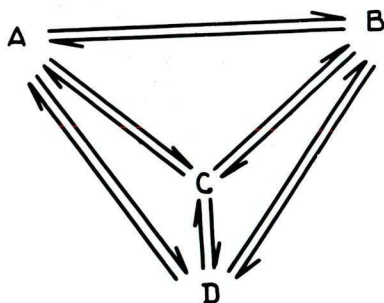
1.2. ábra

Az X és Y köztitermékek fajlagos aktivitásának időbeli változása, ha X nem egyedüli prekursora Y-nak.

1.3. ábra

A butén dehidrogénezésének és izomerizációjának a sémája, ahol

- A: butén - 1,
- B: transz-butén-2,
- C: cisz-butén-2,
- D: butadién.



A szintetikus uton előállított termékeket katalitikus reaktorba vezették, amelyek közül egyik minden alkalommal ^{14}C izotóppal volt jelezve. Megállapították többek közt, hogy a cisz-transz átmenet lényegesen gyorsabb mint a fordított folyamat, valamint a butadién képződése gyorsabb a cisz-butén-2-ből, mint transz-butén-2-ből. A szerzők nem értékelték kvantitatíve az egyes részsebességeket. Ennek oka a fajlagos aktivitás meghatározásának pontatlansága. Az így kapott félkvantitatív eredmények is jelentős felvilágosításokkal szolgáltak a reakciórendszerre nézve.

BEREZIN és munkatársai /6/ a ciklohexán folyadékfázisu oxidációját vizsgálták üvegreaktorban, mely a folyadékfázisu oxidációs reakciók tanulmányozásánál kitűnő modellreakciónak tekinthető. Ismeretes, hogy az ilyen típusu reakciók során hidroperoxidok, aldehidek, ketonok, savak, szén-monoxid és szén-dioxid képződhet. Viszont ezen köztitermékek konszekutivitása kevésbé ismert. A ciklohexán oxidációja során keletkező főbb köztitermékek a következők: ciklohexil-hidroperoxid, ciklohexanol, ciklohexanon és adipinsav. Jelzett ciklohexanolt vittek a rendszerbe a reakció megindulásától számított 2,5 óra elteltével. A bevitel időpontjában a ciklohexanon fajlagos aktivitása zérus, majd növekedni kezd, és maximumát akkor éri el, amikor a ciklohexanol és ciklohexanon fajlagos aktivitása megegyezik. Ebből egyértelműen következik, hogy a ciklohexanon prekursora a ciklohexanol. Az adipinsav fajlagos aktivitása a ciklohexanonéhoz hasonlóan

változik időben azzal a különbséggel, hogy maximuma a ciklohexanon fajlagos aktivitás görbéjére esik. A ciklohexanon tehát az adipinsav prekursora. A széndioxid fajlagos aktivitása viszont igen alacsony az egész mérési időtartam alatt. A hidroperoxid szerepének tisztázása céljából jelzett ciklohexánt vittek a rendszerbe 2,5 órával a reakció megindulása után. Az előbbiekhöz hasonló módon sikerült tisztázni a ciklohexil-hidroperoxid helyét a reakciósorban. Így végül is a főbb köztitermékek konszekutivitása az 1.4. ábrának megfelelően adódott.



ahol

A: ciklohexán

B: ciklohexil - hidroperoxid

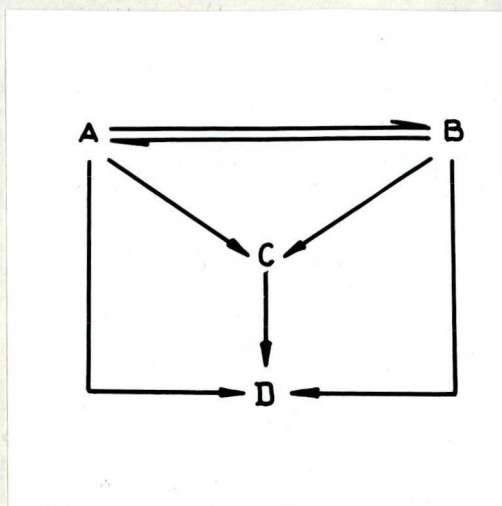
C: ciklohexanol

D: ciklohexanon

E: adipinsav

1.4. ábra. A ciklohexán folyadékfázisú oxidációjának a sémája

MINACSEV, MARKOV és munkatársai /7./ a ciklohexán szerepét vizsgálták a ciklohexán katalitikus dehidrogénezésében, holmium-oxid katalizátoron. A folyamat mechanizmusát az 1.5. ábrán látható séma szerint ábrázolták. A kokszképződés sebességeit nem vették figyelembe, mivel a keletkezett koksز mennyiségének és aktivitásának meghatározása nehézségekbe ütközött. Megállapították, hogy egyrészt megvalósul a közvetlen dehidrogénezés, másrészt képződik ciklohexén is, melynek viszont benzollá való alakulása igen gyors.



1.5. ábra. A ciklohexán katalitikus dehidrogénezésé-

nek a sémája, ahol

A: ciklohexán

B: ciklohexén

C: benzol

D: koks

2. A biológiai rendszerek sajátosságai a kémiai rendszerekkel szemben kinetikai szempontból

A biológiai rendszerek számos sajátosságukban különböznek a kémiai rendszerektől, mely magyarázza a biológiai rendszerek bonyolultabb szerkezetét, összetettebb, komplexebb folyamatait. /1/6, 8., 9./

A biológiai rendszerek általában nyitottnak tekinthetők. Az élő szervezetek ugyanis folyamatosan vesznek fel környezetükből, illetve adnak le környezetüknek különféle anyagcsere-termékeket, miközben környezetükkel dinamikus egyensúlyt alakítanak ki. A kémiai rendszerek ezzel szemben környezetüktől általában elszigeteltek. A kinetikus izotópanalízis szempontjából azonban a biológiai rendszerek mégsem tekinthetők a priori nyitottnak és a kémiai rendszerek zártnak. A vizsgálat céljától függ, hogy az adott rendszert nyitottnak vagy zártnak vesszük. Környezetétől elszigetelt kémiai rendszert, melyben pl. egy láncreakció játszódik le, zárt modell reprezentál, ha az egész folyamatot vizsgáljuk. Amennyiben a láncreakció egy vagy csak néhány elemi lépését tesszük vizsgálat tárgyává, a rendszerünknek megfelelő modell nyitott lesz. Ehhez hasonlóan bírálható el a biológiai rendszerek nyitott, illetve zárt volta. Tekintsük pl. a túlélő szövetszelet in vitro rendszert, melyben a szövet folyamatosan anyagcserét bonyolít le az inkubáló folyadékkal. Amennyiben a vizsgálatunk az egész anyagcsere-folyamatra kiterjed, a rendszert reprezentáló modell zárt, de ha csak egyes részfolyamatokat

tekintünk, a megfelelő modell nyitott.

Általában azt mondhatjuk, hogy stacioner állapotban vannak a biológiai rendszerek. Az in vitro kísérletek többségében zárt biológiai rendszerekre gyakran nem teljesül a stacionaritás feltétele.

Kinetikai vizsgálatoknál lényeges a rendszer heterogenitása. A heterogenitás fogalma a kémiai és biológiai rendszerekben nem azonos módon értelmezhető. A biológiai rendszer lényegesen bonyolultabb, összetettebb és határozott szerkezettel rendelkezik. Az egyes elemi folyamatok a rendszer más és más részéhez lokalizáltak, valamint lefolyásukat morfológiai faktorok is befolyásolják. Nagy a konszekutív és kompetitív reakciólépések száma, melynek következtében különösen bonyolulttá válnak a biológiai rendszerek. A biológus így kinetikai vizsgálatok során folyamatok összességével, egész "folymatháló"-val találkozók. A morfológiai faktorok befolyásoló szerepe tisztán kémiai rendszerekben is észlelhető. Pl.: a gázfázisban lejátszódó láncreakciók kinetikáját a falhatás jelentősen befolyásolja, amely függ természetesen a fal előkezelésétől, méretétől és alakjától.

Tehát a heterogenitás kettős értelmű a biológiai rendszerekben. Jelentheti a szerkezet heterogenitását, másrészt a folyamatok heterogenitását.

A kémiai és biológiai rendszerek előbbiekben vázolt különbségei érzékeltetik a biológiai folyamatok kinetikai vizsgálatának összetettebb voltát. Amíg a kémiai reakciók egyes

részfolyamatait általában lehetséges izolálni és külön vizsgálni, addig a biológiai folyamatok egyes reakciólépéseit sok esetben lehetetlen. Bár, ha lehetséges is izolált biológiai részfolyamatokat megvalósítani, nagyon kicsi a valószínűsége, hogy a kísérleti feltételek az in vivo körülményeknek megfelelnek. Amennyiben ezen utóbbi feltételek nem biztosíthatók, akkor valójában már az eredetihez képest egy módosult biológiai részfolyamattal találkozunk. Természetesen biológiai folyamatokban a kísérleti feltételek változtatása meg lehetőségen korlátozott. Kivételt képez ezen a téren az enzimbiológia, ahol a részreakciók izolálása lehetséges enzimpreparátumok alkalmazásával.

Biológiai, biokémiai rendszerek kinetikai problémáinak megoldása visszavezethető a kémiai rendszerek kinetikai problémájára. NEJMAN által a kémiai rendszerekre kidolgozott KIM-mel analóg leírásmódot már korábban alkalmazta ZILVERSMIT, ENTENMAN és REINER /10., 11./ biológiai rendszerekre. A KIM alkalmazása szempontjából alapvető kérdés a biológiai rendszerekben végbemenő folyamatok sebességének a definíciója. Erre vonatkozó terminológia szemlélteti a biológiai rendszer kinetikai problémáinak sajátosságait. A terminológia használatát illetően a biokémiai irodalom sajnos nem egységes.

Biológia rendszerek kinetikai problémáiban izotópok alkalmazása az elmúlt két évtizedben új tudományágazat kialakulásához vezetett, melyet különböző szerzők más és más névvel jelöltek. Az amerikai SOLOMON "compartment analysis"-ről /8./, BRANSON /12./ egyszerűen quantitativ anyagcsere-vizs-

gálatról beszél. A legutóbbi években megtörtént ezen tudomány-ágazat nemzetközileg hivatalos elnevezése, amelyben az International Commission on Radiation Units and Measurements /ICRU/ egy háromtagú amerikai bizottságot, BROWNELL-t és munkatársait /13./ megbísta egységes fogalomrendszer, valamint terminológia kidolgozásával. Ők "tracer kinetika" névvel jelölték ezen tudományágazatot.

A NEJMAN által kidolgozott KIM elve és eljárás módja teljes mértékben megfelel a tracer kinetika fogalomrendszerének.

3. Tracer kinetikai alapfogalmak

BROWNELL és munkatársai /13./ a "tracer kinetika" megjelöléssel arra utalnak, hogy a módszer a nyomjelző és a rendszer időbeli és térbeli kölcsönös viszonyának vizsgálatán alapszik. A cél a kutatott anyag, a rendszer tulajdonságainak kikövetkeztetése a jelzett anyag viselkedésének megfigyeléseiből. Ezért a tracer kinetikai vizsgálat rendszeranalízist jelent szükségképpen. Rendkívüli előnye az eljárásnak, hogy az izotóp nagyon kis mennyiségekben használható és könnyen kimutatható.

A tracer kinetikában a "rendszer" nagyon tág definíciójára van szükség. Rendszernek tekintjük az egyetemesnek azon részét a többtől megkülönböztetve, amely érdekel bennünket. /Pl. a test egy része./

A tracer kinetika a nyomjelző rendszerben való eloszlásának időbeli lefolyásával foglalkozik, mely a kísérlet időtartama alatt elérheti vagy nem éri el a rendszer minden részét. Miután a rendszert elhagyta a jelzett anyag, kinetikája megszűnik érdekes lenni. Az egyetemes rendszeren kívüli részét, azaz a "külső" világot a jelzett anyag szerkezet nélküli elnyelőjének, néha forrásának tekinthetjük.

A tracer kinetikában segítségül vett jelzett anyaggal szemben támasztott követelmények a következők lehetnek.

a/ A vizsgált anyaggal azonos fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságu legyen.

b/ Mennyisége elhanyagolható legyen a vizsgált anyag mennyiségéhez képest.

Ideális jelzett anyagtól való eltérést fokozhatja az izotópos effektus fellépése, vagy ha az alkalmazott izotóp a vizsgálat tárgyává tett rendszernek nem természetes alkotó eleme.

A tracer kinetikában használatos fogalmak meghatározására BROWNELL és munkatársai által javasolt definíciók az elfogadott használattal összhangban állnak, valamint pontosak és érthetőek. Külön tárgyalást nyernek a rendszerre és a nyomjelzőre vonatkozó meghatározások. A zárójelben álló jelek a dimenziókat jelentik éspedig:

a nyomjelző aktivitása	/A/
távolság	/L/
tömeg	/M/
térfogat	/L ³ /
idő	/T/

A javasolt definíciók a következők:

3.1. A vizsgálandó rendszerre vonatkozó definíciók.

3.1.1. Tömeg- és térfogatparaméterek

3.1.1.1. Kompartment

A rendszer anatómiai, fiziológiai, kémiai vagy fizikai része, amelyben a nyomjelző és a vizsgált anyag koncentrációinak hányadosa adott időben egyenletes. Ez magában foglalja azt, hogy az a sebesség, amellyel a kompartmentbe

belépő nyomjelző keveredik a nyomjelzett anyaggal nagyon gyors, szembeállítva azzal a sebességgel, amellyel az anyag a kompartmentet elhagyja.

3.1.1.2. Pool /jelentése itt nem fordítható/ /M/

Jelenti az összes anyagmennyiséget egy rendszerben vagy annak adott részében

Látszólagos kicserélhető tömeg /M/

Tömeg, amelyet megkapunk, ha elosztjuk a visszatartott nyomjelző mennyiségét a nyomjelző fajlagos aktivitásával a mintavétel helyén. Ezen érték időben növekedhet, ha a rendszerben levő anyag egy része lassan cserélődik összehasonlítva a folyamat időtartamával. A látszólagos cserélhető tömeg egyenlő az összes cserélhető tömeggel, ha a fajlagos aktivitások a rendszerben mindenütt egyenlők.

Nem-cserélődő /cserélhető/ tömeg /M/

Egy olyan anyag tömege, amely nem határozható meg /vagy meghatározható/ izotóp alkalmazásával, mert vagy nem hozzáférhető, vagy nem tükröződik /vagy tükröződik/ a nyomjelző észlelésében a kísérleti feltételek között.

Térbeli vagy térfogati eloszlás /L³/

Látszólagos térfogat, amelyet megkapunk, ha elosztjuk a visszamaradó nyomjelző mennyiségét a nyomjelző koncentrációjával a mintavétel helyén. A látszólagos kicserélhető tömegre vonatkozó kor-

látózások itt is érvényesek.

3.1.2. Transzfer paraméterek

Transzport

$/MT^{-1}/$

Annak az anyagnak a mennyisége, amely egységnyi idő alatt áthalad a rendszer határán vagy állapotot változtat. A transzport egy kompartmentes rendszerben jelenti az egyik kompartmentből a másikba időegység alatt átvitt anyag mennyiségét.

Nettó transzport

Két egymással ellentétes értelmű /irányban haladó/ transzport különbsége.

Beáramló, kiáramló transzport

$/MT^{-1}/$

Az időegység alatt egy rendszerbe belépő vagy azt elhagyó anyag tömege.

Áramlási sűrűség

$/LT^{-1}/$

Vektormennyiség, amely megadja az időegység alatt az egységnyi keresztmetszeten áthaladó térfogatot.

Áramlás

$/LT^{-1}/$

2π térszögben az áramlási sűrűség integrálja.

Csere, cserélődés

$/MT^{-1}/$

Az anyag két irányu szállítása a rendszer határán keresztül vagy két fázis között.

3.1.3. Sebesség paraméterek

$/T^{-1}/$

Tágabb értelemben az időegységre eső értékváltozások paraméterei.

Sebességi állandó

a/ $/T^{-1}/$

Egyensúlyi viszonyokra: a rendszerben vagy adott kompartmentben jelenlévő összes és a rendszert adott pillanatban éppen elhagyó anyag mennyiségek hányadosa. /Nem egyensúlyi viszonyok esetén ugyanez külön a belépő, illetve a rendszert elhagyó anyagmennyiségre./

b/ $/T^{-1}/$, $/L^3M^{-1}T^{-1}/$, stb.

Kémiai rendszereknél a sebességi állandó külön-külön definiálható az elsőrendű, másodrendű stb. reakciókra. A koncentráció változása következőképpen írható le.

Elsőrendű reakció:

$$\frac{dc}{dt} = k \cdot c \quad /3.1./$$

Másodrendű reakció:

$$\frac{dc}{dt} = k \cdot c^2 \quad /3.2./$$

ahol

c a koncentráció

k a sebességi állandó

Turnover rate

$/T^{-1}/$

megadja, hogy a nyomjelzett anyag hányad része, amely az időegységben a kompartmentet, vagy a rendszert elhagyja. A turnover rate reciproka a ciklus időtartamának, vagyis a közepes időnek.

3.1.4. Idő paraméterek

Turnover time

/T/

az az átlagos idő, amelyet adott molekula eltölt a rendszer valamely helyén. Ez egyenértékű azzal az időközzel, amire szükség van ahhoz, hogy a rendszer valamely részéből kivitt vagy abba bevezetett anyagmennyiség stacioner állapotban számszerűen egyenlő legyen a kérdéses részben jelenlevő mennyiséggel. A közepes idő a sebességi állandó reciproka elsőrendű kémiai reakcióknál vagy egy kompartmentből álló rendszerénél, mely kinetikailag elsőrendű.

3.2. A nyomjelzőre vonatkozó definíciók

Fizikai nomenklatura

Tracer /nyomjelző/

/A/

Egy populáció jelzett részecskéi vagy tagjai, amelyeket a rendszer bizonyos tulajdonságainak mérésére használnak. Radioaktív nyomjelzőt radioaktív elemmel jelölnék. Egy stabil nyomjelzőt pedig nem radioaktív elemmel jelölnék, de olyannal, mely különbözik a jelenlévőktől, hogy használható legyen az azonosításra és a mérésekhez.

Tracee /vizsgált anyag/

/M/

az az anyag, amelyet nyomjelzővel vizsgálnak, nyomon követnek.

Fajlagos aktivitás

/AM⁻¹/

a nyomjelző aktivitásának aránya a vizsgált anyag mennyiségéhez képest.

Hordozó /carrier/

/M/

- a/ A radioaktív nyomjelzővel együtt jelenlévő stabil izotóp. Egy hordozó hozzáadható a nyomjelzőt tartalmazó mintához mint a kémiai feldolgozás segítője.
- b/ Az aktív transzport terminológiájában olyan anyag, amely szállítóeszközként működik molekulák átszállítására egy membránon vagy fázishatáron keresztül.

A tracer kinetikai alapfogalmakat a BROWNELL és munkatársai /13./ által javasolt fogalmazásban a 3.1. táblázat tartalmazza. Könnyen belátható, hogy ezek igen jól megfeleltethetők a KIM fogalomrendszerének a sajátos biológiai problémakör figyelembevételével.

3.1. Táblázat

Tracer kinetikai fogalmak

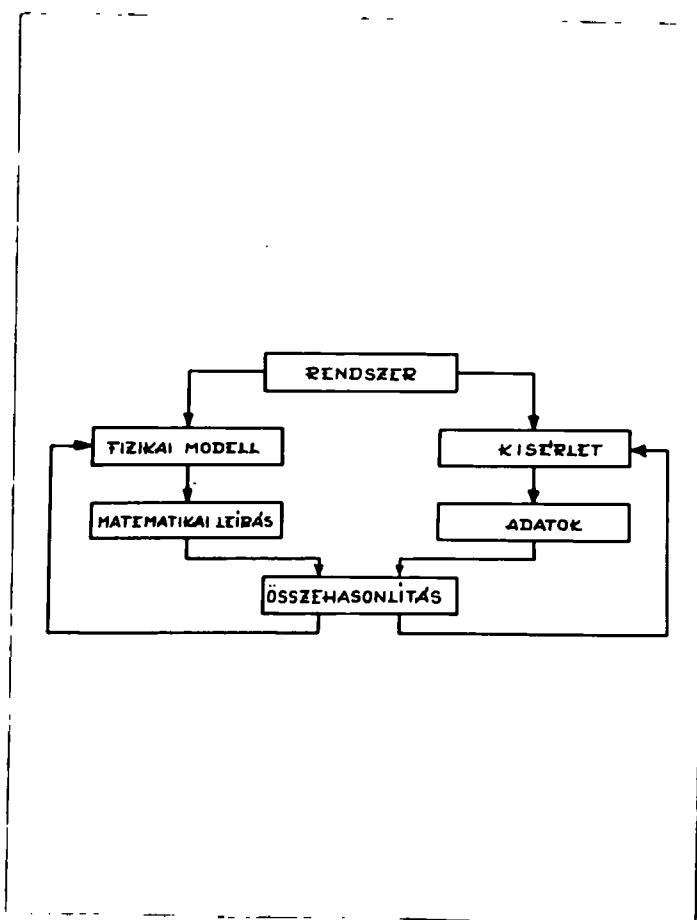
	Nyomjelző /1/	Vizsgált anyag /2/	Átlagos térfogat /3/	Fajlagos aktivitás /1/2/	A nyomjelző koncentrációja /1/3/
Mennyiség egy kompartmentben /j/	q_j	Q_j	V_j	$a_j = \frac{q_j}{Q_j}$	$c_j = \frac{q_j}{V_j}$
Transzport sebességi állandó az <u>i</u> kompartmentből <u>j</u> -be	k_{ij}	k_{ij}	k_{ij}		
Transzport az <u>i</u> kompartmentből <u>j</u> -be	$r_{ij}=k_{ij}q_j$	$R_{ij}=k_{ij}Q_j$	$F_{ij}=k_{ij}V_j$		
Transzport a rendszerbe az <u>i</u> kompartmentnél	r_{i0}	R_{i0}	F_{i0}		

4. Tracer kinetikai modellanalízis /13., 14./

A tracer kinetika célja a rendszerbe bevitt izotóp megoszlásának egzakt leírása. Ez egy sajátos ellentmondáshoz vezet. Az izotóp megoszlásának egzakt leírása csak a folyamat mechanizmusának, a rendszer szerkezetének ismeretében lehetséges. Ha viszont mindez ismert, rendszerint nincs értelme elvégezni a vizsgálatot. Ennek az ellentmondásnak a feloldása csak úgy lehetséges, hogy a vizsgált rendszert a rendelkezésre álló analitikai adatok alapján többé-kevésbé önkényesen leírjuk egy első közelítésben valószínű fizikai modellel. A cél olyan modell megalkotása, amely a legjobban képviseli a rendszert szerkezetében, tulajdonságaiban, a rendelkezésünkre álló adatok alapján. Ezt a modellt nevezzük a rendszerrel izomorf modelleknek. BROWNELL és munkatársai az izomorf modell kiválasztásának logikai sémáját a 4.1. ábrán látható módon szemléltetik /13./.

A fizikai modell a rendszernek egy egyszerűsített leírása, mely megtartja azokat a szerkezeteket és folyamatokat, amelyek szükségesek ahhoz, hogy a kísérlet útján nyert adatokkal összeegyeztethető eredményeket adjanak, azaz képes a rendszer viselkedését szimulálni. Az élő, biológiai rendszer tanulmányozása egyidejűleg minden részlet figyelembevételével lényegében lehetetlen. Ezért természetesen csak szükségszerű és célszerű egyszerűsítések bevezetésével végezhetjük egy adott rendszer elemzését, vizsgálatát. Az első közelítésben a rendszer leírására felvett fizikai modell közvetlenül matematikai alakban való kifejezéshez vezet.

Másrészt kísérleteket végzünk a kérdéses reakciórendszerrel, melynek célja, hogy közvetlen információkat nyerjünk a rendszerről. A kísérletből nyert adatok a vizsgált anyag és az izotóp koncentrációiból állnak a rendszer különböző helyeire és a kísérlet különböző időpontjaira vonatkozóan.



4.1. ábra. Adott rendszerrel izomorf modell kiválasztásának logikai sémája

A modellépítésnek leglényegesebb lépése az összehasonlítás, pontosan a feltételezett fizikai modell matematikai kifejezéseinek a kísérleti adatokkal való közvetlen össze-

hasonlítása. Ez a következőképpen történhet: a kísérleti adatokat a fizikai modell által meghatározott matematikai kifejezésekbe helyettesítjük. Amennyiben nem lép fel ellentmondás, a modell izomorfnek tekinthető. Ilyen ellentmondás lehet pl. az, hogy negatív sebesség értékek adódnak a számolás eredményeként. Ha nem kaptunk kielégítő egyezést, akkor felül kell vizsgálni a fizikai modellt és megfelelően módosítani, míg nem az ismételten elvégzett, valamint szintén felülvizsgált kísérletek útján nyert adatokkal kielégítő egyezés mutatkozik. Ebben az esetben mondhatjuk, hogy a fizikai modell által megadott mechanizmus alkalmas a vizsgált reakciórendszerünk folyamatainak leírására, azt tudja szimulálni, azaz a rendszerrel izomorf.

A vizsgált rendszerek jellemzésére lehet determinisztikus vagy stochasztikus modelleket alkotni. A determinisztikus modellek matematikai kifejezései nagy számú részecskék átlagos viselkedését írják le, a stochasztikus modellek pedig kis számú részecske várható viselkedését. A determinisztikus modell előnye az egyszerűség, amely fontos a modell bonyolultabbá válása esetén. A stochasztikus modell segítségével pedig tudomást szerzünk véletlenszerű ingadozásokról /fluktuálásokról/ is.

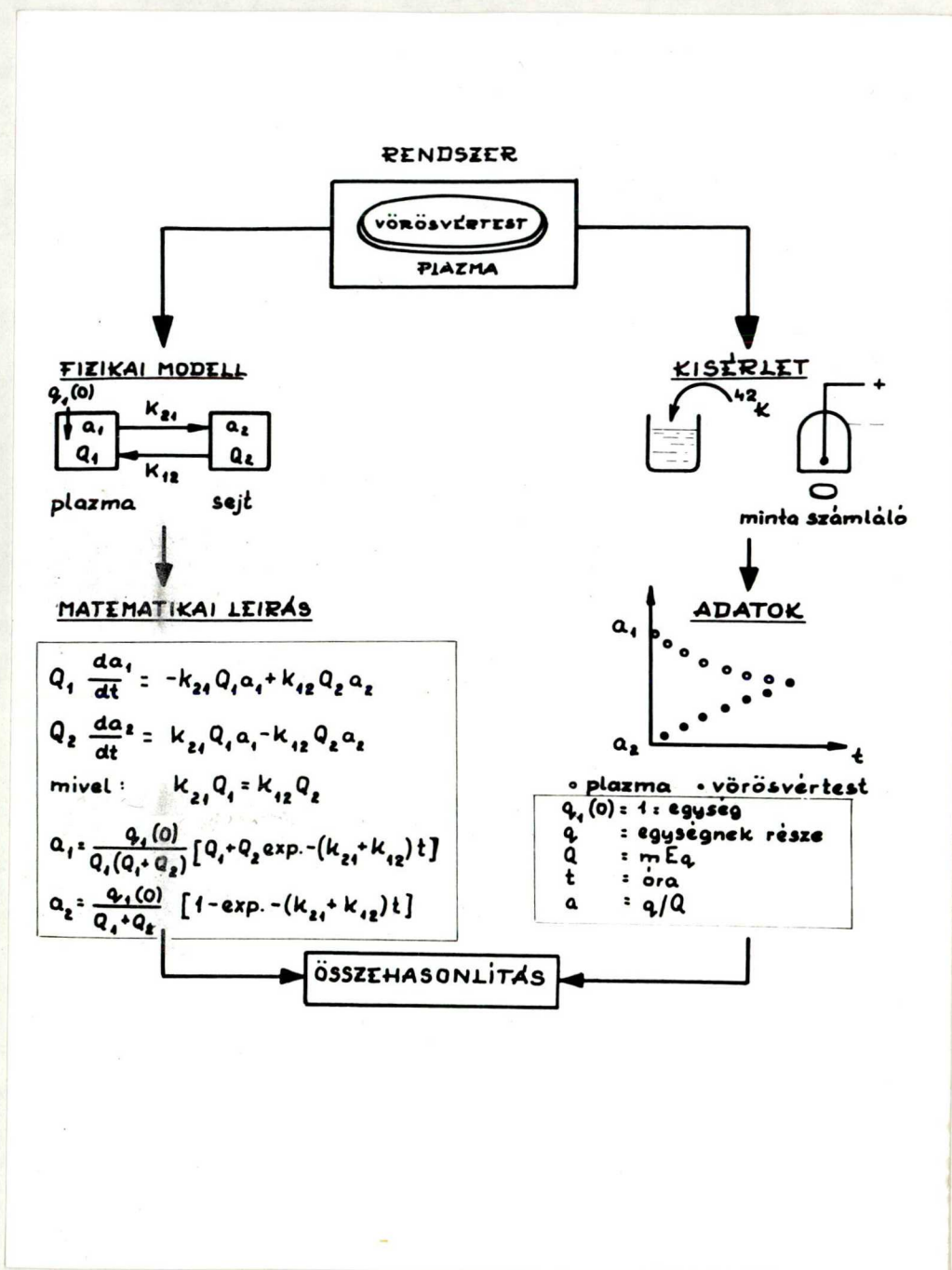
A fizikai modell általában egy sor kompartmentből áll, melyek megfelelő kapcsolatban állhatnak egymással. Ilyen modellhez tartozó matematikai kifejezés egy differenciál egyenletrendszer. Természetesen a kompartmentek számát és a közöttük fennálló kapcsolatok megválasztását a vizsgált rendszerünkről rendelkezésre álló adatok befolyásolják.

Kompartmentes elemzést gyakran használnak ionok membránokon való áthatolhatóságának tanulmányozására. Erre jó példaként szolgálhat a vörösvérsejtek membránján K^+ ionok áthatolhatóságának vizsgálata, melyet a 4.2. ábra szemléltet.

A felvett fizikai modell két kompartmentet tételez fel, mégpedig pontosan egyet a plazma, és egyet a vörösvérttest számára. Nyomjelzőként ^{42}K izotópot alkalmaztak. Feltételezték, hogy a fajlagos aktivitás a vörösvérttesteken belül egyenletes, valamint a vizsgált anyag stacionárius állapotban van.

A kísérletet úgy végezzük, hogy csekély mennyiségű ^{42}K izotópot adunk a plazmához és különböző időpontokban mintát veszünk a plazmából és a vörösvérttestekből. A mintákat elemzik kálium tartalom szempontjából mennyiségileg és a radioaktivitás mérése útján. Így megkaphatók a fajlagos aktivitás értékek, mely értékeket az idő függvényében ábrázolják.

A matematikai kifejezés a fizikai modell definíciójából adódik. Ebben az esetben két lineáris, elsőrendű differenciál egyenlet írja le a fajlagos aktivitás változását.



4.2. ábra. Modellanalízis

5. Néhány biológiai probléma tracer kinetikai kezelése

Anyagcsere folyamatok mechanizmusának tisztázásában jelzett vegyületeket már az izotóptechnika meghonosodásának korai szakaszában alkalmaztak. Különböző vegyületeket, gyakran különböző helyen jelzett vegyületeket is felhasználtak ilyen jellegű vizsgálatokban. Ennek ellenére kvantitatív eredményhez nem jutottak az egyes elemi lépésekre vonatkozóan. A tracer kinetika bevezetése jelentős szerepet töltött be, melyet a következő példák jól mutatnak.

NEJMAN és munkatársai /15./ meghatározták patkányok, illetve békák különböző szerveiben a foszfát turnover sebességét, jelzett szervetlen foszfát bevitele útján; továbbá megvizsgálták a kámfor és a tetrametil-ammóniumjodid görcsokozó dózisának bevitele esetén hogyan változnak ezen sebesség értékek.

A foszfát-anyagcsere jelzi a sejtek állapotát, ugyanis a sejtek finom károsodása már megváltoztatja az ép állapotra jellemző sebesség értékeket. Különböző gyógyszerék támadáspontját ismerhetjük meg, amennyiben megvizsgáljuk, hogy mely szervben vagy szervekben változtatják meg a foszfát turnover sebességét.

Kísérleti eredmények igazolták, hogy a plazma foszfát poolja egyetlen és közvetlen prekursora a szervek foszfátjának, ugyanis a maximumnak megfelelő időpontokban a szerv-

foszfát fajlagos aktivitása megegyezik a plazma foszfátéval.

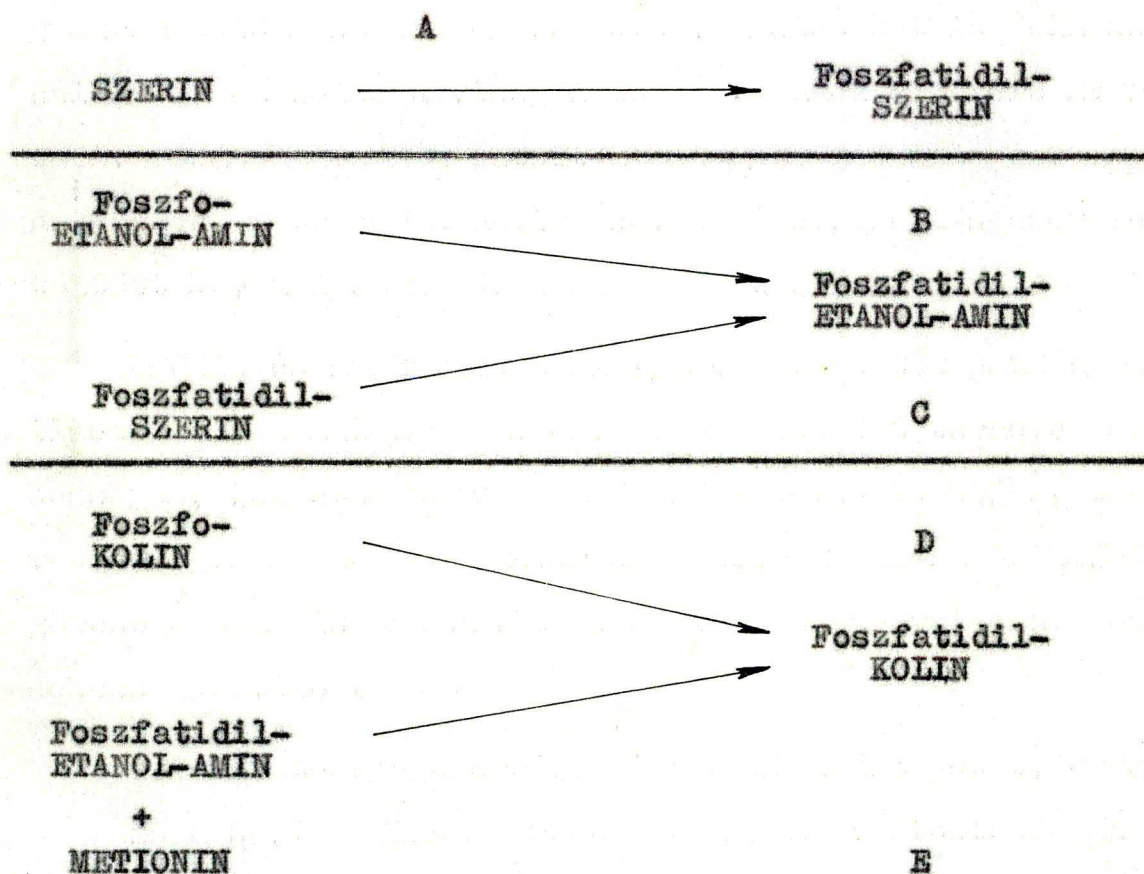
A szerzők megadták az összfoszfát turnover rate-t, illetve turnover time-t az egyes szervekben. Természetesen ezen sebesség érték több faktor eredője, azaz függ a szervben lejtászó foszfát anyagcsere_folyamatoktól, a foszfát felvétel, illetve leadás sebességétől, valamint a foszfát pool kémiai heterogenitásától. Mindezek figyelembevételével elhanyagolható, mivel összehasonlító vizsgálatokat végeztek. Mérték a foszfát turnover rate megváltozását kámfor és tetrametil-ammónium-jodid hatására, kezeletlen kontrollokhoz viszonyítva.

A turnover time a központi idegrendszerben meglehetősen lecsökkent, a turnover rate pedig megnőtt. Ez a változás nagyságrendekkel nagyobb más szervekhez viszonyítva, tehát a kámfor, a központi idegrendszeren keresztül fejti ki hatását. A tetrametil-ammónium-jodid pedig a kámforral ellentétben kizárólag perifériásan hat.

WISE és ELWYN /16./ tanulmányozták a foszfátidaszintézis mechanizmusát a turnover rate meghatározása alapján a májban és a vékonybélben. A foszfátidaszintézis vizsgált lépéseit az 5.1. ábra mutatja.

Mindkét szervből izolálták a szerint, metionint, fosfoetanol-amint, foszfokolint, lipid-szerint, lipid-etanol-amint, lipid-kolint. Meghatározták ezen vegyületek koncentrációinak és fajlagos aktivitásainak időbeli változását. A prekursor minden lépésnél jelzett, mivel kezdetben a jel-

zett szerin bevitele után a foszfoetanol-amin, foszfo-kolin és metionin fajlagos aktivitásai magasabbak, mint a lipid-foszfátida fajlagos aktivitása. A lipid-szerin képződése csak egy uton, míg a lipid-etanol-aminé és a lipid-koliné két uton lehetséges.



5.1. ábra. A foszfátidaszintézis WISE és ELWYN által vizsgált lépései.

A turnover rate meghatározására az alábbi egyenletet alkalmazták a szerzők.

$$\Delta \beta = \beta(t_2) - \beta(t_1) = \frac{\left[\sum_{i=1}^n w_{1,i} \int_{t_1}^{t_2} \alpha_i dt \right] - w_2 \int_{t_1}^{t_2} \beta dt}{[X]} \quad /5.1/$$

ahol α_i az i prekursor fajlagos aktivitása,
 $w_{1,i}$ az adott X vegyület képződési sebessége az i -edik prekursorból,
 w_2 az X fogyasztási sebessége,
 β az X fajlagos aktivitása,
 $[X]$ az X vegyület koncentrációja

A szerzők felvették az analitikai adatok alapján elképzelhető valamennyi mechanizmust. A fenti formula alapján minden mechanizmushoz meghatározták az "elméleti" fajlagos aktivitás görbéket digitális számítógép segítségével. Azt a mechanizmust fogadták el reálisnak, melynek megfelelő elméleti görbék egyeztek a kísérletileg meghatározott fajlagos aktivitás görbékkel.

GÁL és VÁGÓ /17./ az *Azotobacter Chroococcum* foszfát-transzportáló sebességét határozta meg szilárd agar táptalajon. A passzív diffúzió figyelembe vétele céljából baktériummentes táptalajon is végeztek vizsgálatokat, természetesen az előbbivel azonos körülmények között. A baktérium foszfát-transzportáló sebességét a következő egyenlet alapján adták meg:

$$\frac{X}{w} \frac{d\beta}{dt} = \alpha - \beta \quad /5.2./$$

ahol

X az adott komponens /foszfát/ összmenyisége,

w a turnover rate,

α a prekursor /agar korong/ fajlagos aktivitása,

β a vizsgált komponens /foszfát/ fajlagos aktivitása.

A transzport sebességét $\frac{X}{w} = \tau_t$ értékkel jellemezték. Különböző foszfát koncentrációk alkalmazása esetén tapasztalták, hogy a turnover time nő a foszfát koncentrációval.

6. A vörösvérttest és anyagcséréje /18./

Ha a frissen levett vér alvadását meggátoljuk /pl. citrát ionokkal/ és a vért lecentrifugáljuk, akkor egy tiszta vagy opálos sárgás színű felső oldatra, a plazmára és a kiülepedő alakos elemekre válik szét. Az alakos elemek jelentős része vörösvérttest. A centrifugált vérben a vörösvérttestek vannak alul és erre ülepednek vékony rétegben a fehér vérsejtek. A vörösvérttest szuszpenzió jól ülepidhető, valamint újból szuszpendálható. A vörösvérttestek nagy számban nyerhetők tisztán az élő szervezetből, in vitro vizsgálatra alkalmas formában.

A vörösvérttest 7-10 átmérőjű lapos korong. A többi sejthez képest felépítését tekintve is egyszerűbb, sejt-mag és mitochondrium nélküli sejt. A vérben lévő fehérjék többsége a vörösvérttestekben található, így ezek fehérje tartalma 33-35 %, ezzel szemben a plazma fehérje tartalma 6-8 %. A vörösvérttest fehérje tartalmának döntő mennyiségét a hemoglobin adja. A hemoglobin az oxigén és széndioxid szállításának a legfontosabb eleme. Nemcsak a vér fehérjét, hanem majdnem minden egyéb anyag is egyenlőtlenül oszlik meg a vérplazma és a vörösvérttestek között.

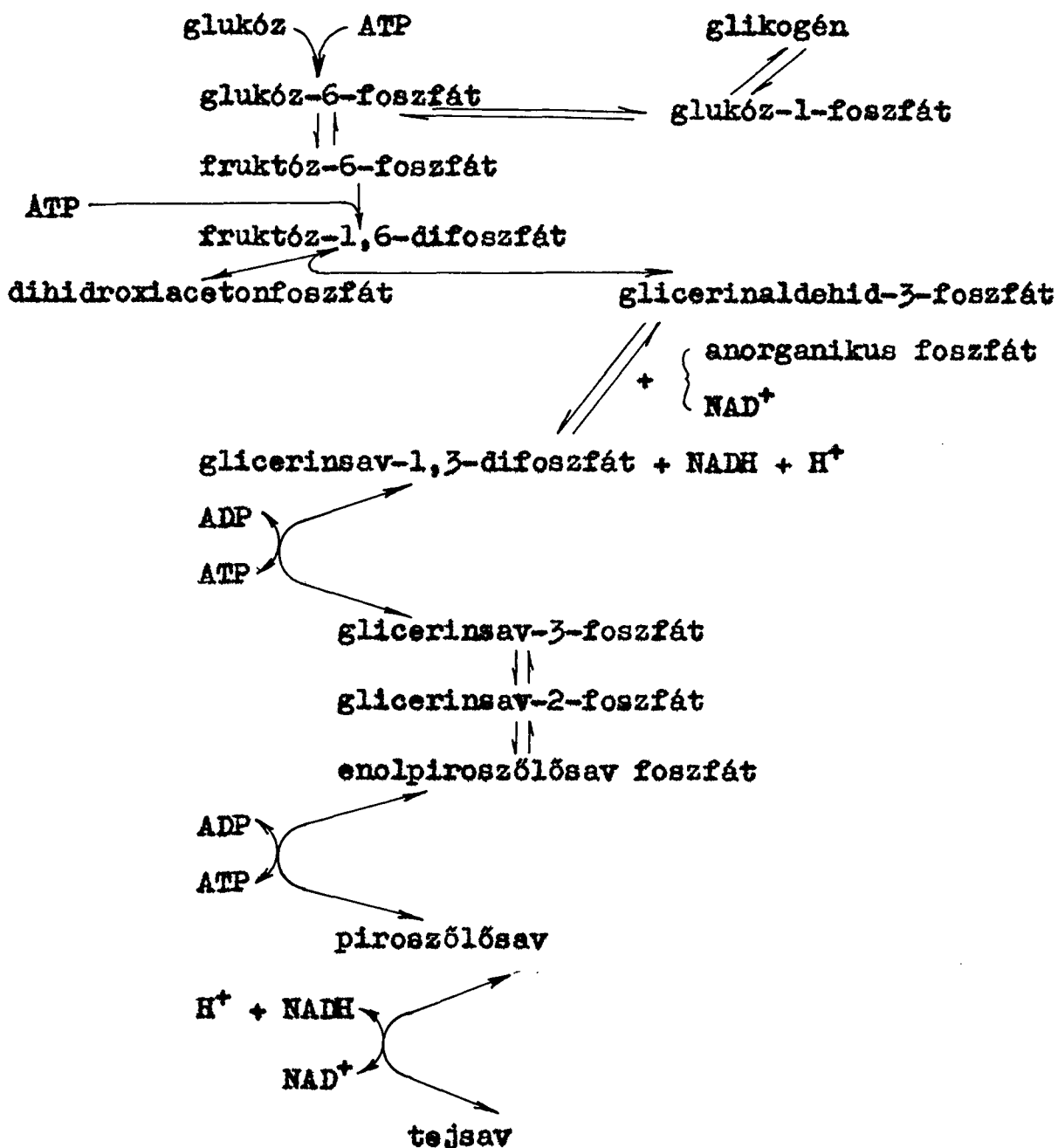
A vörösvérttestek hosszú időn keresztül jelen lehetnek a plazmában anélkül, hogy a hemoglobin kiszabadulna. A fehérjék, valamint a kationok számára gyakorlatilag átjárhatatlan a vörösvérttest hárttyája, de a hemolizist a kationok koncentráció különbsége idézi elő, mivel a fehér-

jék moláris koncentrációja kicsi, hogy ilyen hirtelen változást okozzon. Az izotóniás oldat ozmosis nyomása megegyezik a sejt ozmosis nyomásával. Az emberi szervezet sejtjei 0,9 %-os nátriumklorid oldattal izotóniásak. Enyhe hipotónia alkalmazásával elérhető a vörösvértestek hártájának izolálása és ezeket árnyékoknak /ghosts/ nevezik.

A vörösvértestek anyagcseréje is egyszerűbb a többi sejtekhez hasonlítva, mivel csak glikolitikus anyagcserét folytatnak. Oxidációs folyamatok nem mennek végbe, ugyanis a termális oxidációt katalizáló enzimrendszer hiányzik. A vörösvértestek a csontvelőből készen lökődnek ki, bennük a sejt-anyaguk felépítésével kapcsolatos folyamatok nem mennek végbe. Ezért a vörösvértestekben kevés energia-emésztő folyamat megy végbe, melyet a glikolizis is tud fedezni. A folyamat végterméke tejsav. A levett vérben a glikolizis következtében a glukóztartalom fogy, a pH pedig savanyu irányba tolódik el. A glikolizis részfolyamatai során foszfát-kötések keletkeznek, illetve bomlanak fel. Az egyes lépéseket enzimek katalizálják. A glikolizis mechanizmusa EMDEN-MEYERHOF-féle séma szerint a 6.1. ábrán látható. A glikolizis anaerob körülmények közt megy végbe. Minden elbomlott glukóz molekula két adenzintrifoszfát makroerg kötés keletkezéséhez vezet.

A vörösvértesteknek az a tulajdonsága, hogy a plazma magas Na^+ és alacsony K^+ koncentrációjával szemben a magas K^+ és alacsony Na^+ koncentrációt fenn tudják tartani, összefügg a glikolizissel. A glikolizis során termelt adenzintrifoszfát energiáját használja fel a vörösvértest

az egyenlőtlen ioneloszlás fenntartásához.



Rövidítések:

ATP = adenzintrifoszfát

ADP = adenzindifoszfát

NAD = nikotinsavamid-adenin-dinukleotid

6.1. ábra. A glikolízis mechanizmusa EMDEN-MEYERHOF-féle
séma szerint

7. A vörösvérttest foszfát-anyagcsereje és abban szerepet játszó foszfátvegyületek csoportosítása /18. 19./

A foszfát-anyagcsere központi helyet foglal el az egész élő szervezetben, és így a vörösvérttest anyagcserejében is. Az 5. fejezet első biológiai példájában már említést nyert, hogy a foszfát-anyagcsere képes jelezni a sejtek állapotát, azok finom károsodását.

Az egyes vegyületek különböző energiájú kötésekben tartalmazzák a foszfát csoportot. A vörösvérttestben végbemenő energiatermelő folyamat, azaz a glikolízis nagy energiájú, ún. makroerg foszfátkötések szintéziséhez vezet. Különböző foszfátkötések felbomlásának és keletkezésének lényeges szerepet kell tulajdonítani, mely részben a glikolízis velejárója. A vörösvérttest foszfát vegyületei között különböző kémiai átalakulások és foszfát kicserélődési folyamatok mehetnek végbe. A kémiai átalakulások, vagyis az anyagcsere-folyamatok az anorganikus foszfát ionok állandóan folyó észterifikálását és felszabadulását jelentik a vörösvérttest belsejében.

Az előforduló foszfát vegyületeket triklórecetsavval /TCA/ szembeni viselkedésük alapján két csoportba sorolhatjuk.

7.1. Triklórecetsavban nem oldható vegyületek:

TCA hatására csapadékot képeznek. Ezen csoporthoz tartoznak a foszfoproteidek, nukleoproteidek és a foszfolipoidok. A foszfoproteidek és a foszfolipoidok a sejthártya működésében jelentősek, szerepük még kevésbé tisztázott.

7.2. Triklórecetsavban oldható vegyületek:

TCA-val nem képeznek csapadékot. Idetartoznak a szervetlen foszfát, a savlabil foszfát és a savrezisztens foszfát vegyületek. A szervetlen foszfát a foszfát-anyagcsere kezdeti vegyülete. A savlabil foszfát vegyületek közül a legjelentősebbek a következők:

adenozintrifoszfát /ATP/,
glukóz-1-foszfát,
fruktóz-1-foszfát,
galaktóz-1-foszfát,

Ezen vegyületek megfelelő savas közegben maximum 10 perc alatt hidrolizálhatók. A savrezisztens foszfát vegyületek jellegzetes képviselői pedig a következők:

kreatinfoszfát,
glukóz-6-foszfát,
fruktóz-6-foszfát,
hexóz-1,6-difoszfát,
glicerinaldehid-3-foszfát,
dioxiacetonfoszfát,
3-foszfoglicerinsav,
2-foszfoglicerinsav,
 α -glicerinfoszfát.

Ezen foszfát vegyületek az előbbivel azonos körülmények között 10 perc alatt elhanyagolható mennyiségben hidrolizálnak vagy egyáltalán nem hidrolizálnak.

Amint látható a vörösvérttest foszfát-anyagcseréjében

igen sok vegyület vesz részt. Ezek között az anaagcsere középpontjában áll az adenzintrifoszfát. A legtöbb olyan folyamat, mely szabad energia felszabadításával megy végbe, egy szabadenergia-emésztő folyamattal, az adenzintrifoszfát szintézisével van összekapcsolva. Ugyanakkor a szabadenergia-növekedéssel járó /szintetikus, munkavégző/ folyamatok egy szabadenergia-emésztő folyamattal, az adenzintrifoszfát elbontásával vannak összekapcsolva. A vörösvértest anyagcseréje során /amint a 6. fejezetben is látható/ ATP szintetizálódik, tehát a glikolízis növeli az ATP szintet. A sejtmembrán eredetű $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ aktiválható ATPáz szórós összefüggésben áll a membránon keresztül történő aktív iontranszporttal, mégpedig mindkettő aktiválhatósági és gátolhatósági feltételei azonosak. Az aktív Na^+ transzport carrierje maga a $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ aktiválható ATPáz. Az extracelluláris térbe irányuló Na^+ , illetve az intracelluláris térbe irányuló K^+ transzport koncentrációgradienssel szemben történik és energiát igényel. Az energiát az ATP szolgáltatja, más trinukleotid nem helyettesítheti az ATP-t. Az ATP szint függ tehát a glikolízistől és az ATPáz enzimaktivitástól.

Az adenzintrifoszfát /ATP/ utolsó foszforsavgyökének hidrolízise során keletkezik az adenzindifoszfát /ADP/, és ebből egy újabb foszforsavgyök lehasadásával az adenilsav, az adenzinmonofoszfát /AMP/. Az ATP kétféle típusú reakcióban képes résztvenni.



A 7.1. reakcióban alkoholos csoportot tartalmazó vegyület foszfátésztere keletkezik, amelybe az ATP foszfátkötési energiájának egy része átmegy. A 7.2. reakcióban az AMP valamilyen sav acilgyökével képzett vegyes anhidridje keletkezik, és ebben a kötésben marad a foszfátkötési energia, ami a pirofoszfát lehasadásával felszabadult. Az ATP két szélső foszfát kötését magas energiatartalmu, makroerg foszfátkötésnek nevezik. A 7.1. és 7.2. reakciók balról jobbra az ATP energiájának felhasználását jelentik, jobbról balra pedig az energia ATP-ben való tárolását. Az ATP nemcsak energiaközvetítő, hanem energiatartalék szerepet is tölt be. A kreatinfoszfát viszont tisztán energiaraktározó szerepet játszik. A következő reakció az egyetlen ismert enzimátikus folyamat, amelyben kreatinfoszfát részt vesz.



A kreatinfoszfát is makroerg vegyület.

8. A vörösvértest transzport folyamatai /20., 21./

A sejtekben és szövetekben végbemenő transzport folyamatoknak többféle típusa lehetséges, így természetesen a vörösvértest esetében is. Az anyagmozgás következő 4 fő típusáról beszélhetünk.

8.1. Egyszerű vagy termál diffúzió

8.2. Aktivált diffúzió

8.3. Carrierek segítségével történő penetráció

8.4. Endocitózis

8.1. Egyszerű diffúzió esetén az anyagvándorlás általában a sejtmembrán vízzel telt pórusain keresztül történik a magasabb koncentrációjú helyről az alacsonyabb koncentrációjú hely felé. A penetráció sebességét minden esetben Fick I. törvénye szabja meg, vagyis az egységnyi idő alatt egységnyi felületen átáramló anyag mennyisége adott hőmérsékleten az anyagra jellemző diffúziós állandó és a koncentráció gradiens függvénye. Ionok esetén még négy tényező befolyásolhatja a penetráció sebességét, melyek a következők:

a/ A különböző koncentrációjú oldatok határán létrejövő elektromos kettősréteg folytán kialakult diffúziós potenciál nagysága.

b/ Az ionok eltérő mozgékonyasága.

c/ A pórusok falának fix elektromos töltése.

d/ A kialakult Gibbs-Donnan egyensúly, amennyiben az egyik ion nem képes áthatolni a membránon.

Egyszerű diffúzióval mozognak pl. az anionok a sejtmembránon keresztül.

8.2. Aktivált diffúzió esetén az anyagmozgás a membrán strukturált részén át koncentráció esés irányában történik. Az oldott molekulák az oldószermolekulákkal kölcsönhatásba lépnek. A transzportálandó anyagnak megfelelő aktiválási energiára van szüksége, hogy ki tudja magát szakitani az oldószerkötésből és le tudja győzni az útjában álló molekulák gátlását. Három tényező szabja meg az aktivált diffúzió sebességét.

a/ Az oldott anyag és az oldószer kémiai kölcsönhatása.

b/ Az oldott anyag molekulasúlya.

c/ A hőmérséklet.

Aktivált diffúzióval elsősorban az apoláris karakterű szerves molekulák mozognak a sejtmembránon át.

8.3. Carrierrek segítségével történő penetráció három fajtája ismeretes.

8.3.1. Facilitált diffúzió

8.3.2. Kicserélődési diffúzió

8.3.3. Aktiv transzport

8.3.1. Facilitált diffúzió esetén a penetráló anyag a membránnak egy specifikus molekulájához, az un. szállító molekulához kötődik és ennek segítségével halad át a membránon a koncentrációesés irányában. A facilitált diffúzió sebességét három tényező szabja meg.

a/ A carrier-szubsztrát komplex keletkezési sebessége.

b/ A telített carrier mozgási sebessége.

c/ A komplex disszociációjának sebessége.

Általában a b/ folyamat a leglassabb, így ez határozza meg a transzport sebességét. Facilitált diffúzió szép példája a cukrok mozgása a sejthártyán keresztül.

8.3.2. Kicserélődési diffúzió a facilitált diffúzióhoz hasonlóan szintén mobil carrier segítségével történik, itt azonban az anyagmozgás mindkét irányban folyik általában 1:1 arányban. Feltételezik, hogy a telített carrier mozgási sebessége nagyobb mint az üres carrier mozgási sebessége, így a membrán tulsó oldalán levő anyag elősegíti az ellentett irányu penetrációt. A kicserélődési diffúziós folyamatok szerepet játszanak mind az ionok, mind a cukrok transzport folyamatainál.

8.3.3. Aktív transzport szintén carriert igényel. Ez a carrier lehet egy szubsztrátra specifikus, de több analóg vegyület transzportjára is képes lehet. Az aktív transzport mindig a koncentráció gradiens ellenében folyik és minden esetben energiát igényel, melyet az ATP fedez. Ha az aktív transzport a sejt belseje felé irányul, akkor akkumulációról, ha kifelé irányul, akkor szekrécióról beszélünk. Aktív transzport pl. a sejtek elektrokémiai potenciálgradienssel szemben folyó Na^+ és K^+ transzportja.

8.4. Endocitózis kollóid méretű részecskék a sejt által történő felvételét jelenti. Két fajtája ismeretes: a fagocitózis és a pinocitózis. A fagocitózis szilárd halmazállapotú anyagok, a pinocitózis nagyméretű folyadékosepek

transzportját jelenti. A biológiai rendszerekben általában nehéz elválasztani egymástól a kétféle halmazállapotot, így inkább az endocitózis összefoglaló megjelölés használatos.

Számos kutató tanulmányozta egyes ionok vörösvérttest membránján keresztül történő mozgását. Megállapították, hogy az anorganikus anionok általában a membrán vízzel telt pórusain keresztül mozognak egyszerű diffúziós folyamat révén, és mozgási sebességüket elsősorban molekulasúlyuk és a pórusok fix töltései szabják meg. Az anorganikus anionok nagy része rendkívül gyorsan permeál a membránon keresztül. A vizsgálatokat foszfát ionnal végezték, mely az egyértékű anionoknál jóval lassabban mozog. Már MOND megállapította, hogy a lúgos pH felé haladva a sejthártya anionok számára egyre impermeábilissá válik. MAIZELS az előbbit megerősítve rámutatott a polaritás jelentőségére. Egy molekula annál gyorsabban penetrál a membránon keresztül, minél kevésbé disszociált. Organikus anionoknál a permeálás sebessége annál kisebb, minél több poláris csoportot tartalmaz a molekula. PASSZOW a későbbiekben igazolja a pH szerepét azaz, hogy az anionok mozgásának sebességét a pórusok fix töltéseinek száma határozza meg. A pH csökkenésével nő a pozitív töltések száma, ennek megfelelően nő az anion permeabilitás sebessége. A kémiai szerkezet pedig a transzport szempontjából másodlagos jelentőségű.

A kationok közül legjelentősebb a Na^+ , K^+ ionok transzportja. A Na^+ , K^+ egyenlőtlen ioneloszlás három különböző típusu transzport folyamat eredményeként jön létre, melyek a következők.

a/ Aktiv transzport, mely az elektrokémiai potenciálgradienssel szemben mozgatja az ionokat.

b/ Kicserélődési diffúzió, mely ez esetben equimoláris $\text{K}^+ - \text{K}^+$, illetve $\text{Na}^+ - \text{Na}^+$ cserét jelent.

c/ Az ún. leak transzport, mely alatt a koncentrációesés irányában történő ionmozgás értendő. Ez a folyamat közvetve vagy közvetlenül metabolikus kontroll alatt áll. Egy olyan regulációs mechanizmus működik itt, mely a sejtmembrán áteresztő képességét, az ún. "leak" fokát szabályozza.

Az előbbieket összegezve mondhatjuk, hogy a vörösvértest membránján, de általában is a sejtmembránon át történő transzport folyamatok variabilitása óriási.

9. A probléma felvetése

A transzport folyamatok tracer kinetikai vizsgálatánál, amennyiben a jelzett molekula a rendszerben definit poolal rendelkezik, igen fontos megkülönböztetnünk a sejtbe történő inkorporáció két lehetséges változatát: az egyik állandó koncentráció mellett megy végbe, a másik koncentráció változással kapcsolatos. A BROWNELL és munkatársai /13./ által javasolt fogalmazás szerint az előbbi esetben kicserélődésnek tekintjük a folyamatot és csupán az utóbbi esetben beszélünk transzportról, melynek irányát a koncentráció gradiens iránya adja meg. A transzport tehát egy irányú folyamat, míg a kicserélődést a kinetikai leírás szempontjából két ellentétes irányú, egyező sebességű transzport folyamattal reprezentálhatjuk. Ezen különbség határozott definiálása természetesen nem csupán terminológiai kérdés. Más matematikai formula írja le ugyanis a tiszta transzport, a tiszta kicserélődés, illetve a két folyamat együttes jelentkezése által meghatározott inkorporációt még akkor is, ha a két folyamat mechanizmusa azonos, tehát a rendszer kinetikai leírásuknál mindkét esetben azonos kompartment szerkezettel reprezentálható /8., 12., 13./. Rendszerint nem lehet azonban kizárni annak a lehetőségét sem, hogy a transzport és a kicserélődés eltérő mechanizmus szerint játszódik le. Ez egyúttal eltérő kompartment szerkezetet eredményez, ami a matematikai leírás mód még jelentősebb eltéréséhez vezet. További problémát

eredményez, mely a két folyamat vizsgálatát megnehezíti, ha a transzportban, vagy a kicserélődésben résztvevő pool egyuttal az anyagcsereben is szerepet játszik. Ez utóbbi esetben nem kerülhető el az anyagcsere-folyamatok bevonása a kinetikai leírásnál /8., 12., 13./.

Az előbbiek értelmében transzport folyamatok vizsgálatánál nem helyes az inkorporáció mértékéből közvetlen következtetést levonni a transzportra vonatkozóan. Célszerű mindenekelőtt annak tisztázására törekedni, hogy a transzport mellett valóban kell-e számolni kicserélődéssel, illetve amennyiben ez megállapítást nyert, meg kell keresni azt a tracer kinetikai modellt, melynek segítségével a két folyamat külön-külön megadható. Amennyiben egyes anyagcsere-folyamatok figyelembevétele is szükséges, a modellel szemben támasztott fontos követelmény, hogy ezt is tegye lehetővé.

A vörösvérttest foszfát transzport vizsgálatával in vitro rendszerben többen foglalkoztak /22., 23., 24., 25., 26./. Ezen vizsgálatok során a szerzők rendszerint ^{32}P izotóp beépülését is tanulmányozták és ezen adatokból következtetést vontak le a transzportra vonatkozóan. Ismeretesek azonban az irodalomban olyan adatok, melyek szerint a jelzett foszfát beépülése a vörösvérttestbe in vitro nem csupán transzport útján történhet, hanem fennáll a kicserélődés lehetősége. Így SCHAUER és HILLMAN /27./ azon kísérleti adataikat diszkutálva, melyek szerint az ATP fajlagos aktivitása a vörösvérttestbe in vitro kísérlet so-

rán bizonyos körülmények között magasabb, mint az intracelluláris anorganikus foszfát fajlagos aktivitása, felvetik az ATP és az extracelluláris foszfát közvetített cseréjének a lehetőségét. LATZKOVITS és munkatársai /28./ a vörösvérttesteket citrátos plazmában inkubálva azt tapasztalták, hogy a sejt ^{32}P izotópot inkorporál anélkül, hogy a foszfát koncentráció megváltozna. A citrátos plazma és a vörösvérttestek között tehát kicserélődést kell feltételezni.

Jelen vizsgálataink célja, hogy olyan tracer kinetikai modellt dolgozzunk ki, melynek birtokában az *in vitro* foszfát transzport és kicserélődés egymás mellett vizsgálható. Miután azonban a foszfát akár kicserélődés, akár transzport útján inkorporálódik, mindenképpen azonnal részt vesz az anyagcserében, így a korrekt modellnek figyelembe kell vennie a foszfátanyagcsere és a transzport, illetve a kicserélődés kapcsolatát is. Bár a vörösvérttest anyagcséréje, mint ismeretes, lényegesen egyszerűbb más sejtekhez képest, mégis a sejtben számos foszfátvegyület található, melyek között többféle anyagcsere, illetve kicserélődéses kapcsolat tételezhető fel. Nem zárható ki a priori ezen foszfátvegyületek kicserélődéses kapcsolata az extracelluláris foszfáttal sem. Ezért ha valamennyi foszfátvegyület, mely a vörösvérttestben előfordul, külön poolnak, és ennek megfelelően a tracer kinetikai modellben önálló kompartmentnek tekintenénk, a matematikai leírás igen nehéz lenne. A modellképzés SOLOMON /8./ által megadott elve azonban,

mely azt követeli, hogy a lehető legkevesebb kompartmentet használjuk az adott probléma vizsgálatára alkalmas, tehát a rendszerrel izomorf modell felépítésénél, ellene szól egy ilyen messzemenően aprólékos kompartment szerkezet felvételének. Ennek megfelelően kísérleteinkben csupán a savoldható foszfátvegyületek következő pooljait tekintettük önálló kompartmentnek és csak ezeket használjuk fel a kitűzött feladat megoldására alkalmas modell megszerkesztésénél:

- A : Extracelluláris anorganikus foszfát pool
- B : Intracelluláris anorganikus foszfát pool
- C : Intracelluláris organikus savlabil foszfát pool
- D : Intracelluláris organikus savrezisztens foszfát pool

Ezen négy pool kiválasztását a következő szempontok indokolták:

a/ Kísérleteinkben a nem savoldható vegyületek jelölődése elhanyagolható a savoldható vegyületekéhez képest.

b/ A savlabil, illetve savrezisztens poolba tartozó szerves vegyületek a foszfát kötés stabilitása szempontjából, továbbá az anyagcserében betöltött szerepük alapján sorolhatók azonos csoportba.

Vizsgálataink során törekedtünk annak igazolására, hogy ilyen viszonylag kevés számú, kémiai heterogén kompartment is alkalmas olyan egyszerű modell konstruálására, melynek segítségével megoldható az általunk kitűzött feladat: az *in vitro* foszfát transzport és kicserélődés szimultán vizsgálata. Azzal, hogy a fenti poolokat önálló



kompartmentként kezeljük és így azok "homogenitását" feltételezzük, természetesen lényeges absztrakciót alkalmazunk. Ennek jogosultságát, miként SOLOMON hangsúlyozza, a modell alkalmazhatóságának kell igazolnia /8./.

10. Az alkalmazott metodikák

10.1. A kísérlet menete és metodikái

Kísérleteinket mindkét nembeli, felnőtt, egészséges emberek véreéből nyert vörösvérsejtekkel végeztük. A citráttal alvadásgátolt vért a vérvétel után azonnal 0 - + 1 C°-on 800-1000 percenkénti fordulatszámmal 15-20 percig centrifugáltuk. Hűthető centrifugát alkalmaztunk ezen hőmérséklet tartására, mert így az anyagcsere folyamatok lelassulnak. A plazmát és fehérvérsejteket leszivtuk, majd a vörösvértesteket három-ötszörös mennyiségű 0 - +1 C°-os fiziológiás sóoldattal /0,9 %-os NaCl/ háromszor mostuk. A gondosan kimosott sejteket 1:4 térfogat arányban Krebs-Ringer tápoldatban szuszpendáltuk, ugyanis ilyen módon a vörösvértest környezetét standardizáljuk. Ezen oldat összetétele a következő:

Na: 0,118 M

K : 0,0047 M

Mg: 0,0025 M

Ca: 0,0011 M

Kísérleteink egy részében Ca, Mg mentes Krebs-Ringer foszfátot használtunk.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$: 0,01 M

$[\text{M}/15 \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O} + \text{M}/15 \text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

megfelelő arányban]

glukóz: 0,1 %

Végeztünk glukóz mentes Krebs-Ringer foszfát-
tal is kísérletet.

pH: 7,35

Kísérleteink egy részét ettől eltérően 6,8 és
7,8 pH-án végeztük.

Radioaktív koncentráció: 1μ Ci $^{32}\text{P}/\text{ml}$

A kísérleteinkhez használt ^{32}P jelzett foszfá-
tot a Magyar Tudományos Akadémia Izotóp Intéze-
te hordozómentes, steril készítmény formájában
szolgáltatta.

Az elegyítés után azonnal mintát vettünk, melyet $0 - +1^\circ\text{C}$ -ra hűtöttük, majd a szuszpenziót óvatos, habzásmen-
tes rázatással 37°C -on /testhőmérséklet/ 180 percig inku-
báltuk. Mintákat a 15., 30., 45., 60., 90., 120. és 180.
percben vettünk. Egy-egy minta 5 ml volt.

A kivett mintákat gyorsan lehűtöttük, majd $0 - +1^\circ\text{C}$ -
on centrifugáltuk. A sejtmentes felülusztót rendre elkülö-
nitettük, majd a sejteket húszeres mennyiségű jéghideg
fiziológiás sóoldattal háromszor mostuk az aktiv tápoldat-
tól való megtisztítás céljából. A mosott sejteket 1:4 a-
rányban 12,5 %-os triklórecetsavval/TCA/ 0°C -on kicsaptuk,
és így a végkoncentráció 10 % lett TCA-ra nézve.

Az intracelluláris anorganikus foszfát /B pool/ megha-
tározása: A keletkezett barna csapadékot centrifugálással
elkülönítettük, és így egy tiszta TCA-s felülusztót nyertünk.

Ezek után közvetlen a TCA-s felülusztóból MARTYN-DOTY mó-
dosított módszere /29., 30./ szerint 0°C -on izoláltuk az

anorganikus foszfátot, mint foszformolibdátot benzol-izobutanolos közegben. Ennek egy részével elvégeztük a spektrofotometriás meghatározást, más részből aktivitást mértünk.

Az intracelluláris savlabil foszfát /C pool/ meghatározása: A TCA-s felüluszók más részből 1 n kénsav koncentrációt beállítva 100 C°-on rendre 10 perces hidrolizist végeztünk. A hidrolizis után ugyancsak a fent leírt módon izoláltuk, illetve mértük az anorganikus foszfátot. A hidrolizissel izolált két frakció foszfát koncentráció, illetve aktivitás értékeinek különbsége adja az ugynevezett savlabil frakció foszfát koncentráció, illetve aktivitás értékeit.

Az intracelluláris savrezisztens foszfát /D pool/ meghatározása: Rendre elvégeztük a TCA-s felüluszók összfoszfát, illetve összaktivitás meghatározását módosított LOHMAN módszer /31./ szerint. Az összfoszfát szint, illetve összaktivitás, valamint a hidrolizissel nyert foszfát koncentráció, illetve aktivitás értékeinek különbsége adja a savrezisztens frakció foszfát koncentráció, illetve aktivitás értékeit.

Az extracelluláris anorganikus foszfát /A pool/ meghatározása: Ugyancsak MARTYN-DOTY módosított módszere szerint izoláltuk és határoztuk meg az anorganikus foszfátot a különböző időpontokban vett szuszpenzió minták sejtmentes felüluszóiból is. Az aktivitásmérés itt is a benzol-izobutanolos fázis egy részből történt.

Egyes esetekben elvégeztük a mosott vörösvérsejtek teljes roncsolását, az említett módosított LOHMAN-módszer szerint, az inkorporált összaktivitás mérése céljából annak ellenőrzésére, hogy a nem savoldható frakció jelölődése elhanyagolható-e.

Néhány kísérletben megnéztük a savlabil frakció döntő mennyiségét alkotó ATP szintjének alakulását /32., 33./, valamint BARKER és SUMMERSON szerint /34./ a vörösvértest anyagcseréje útján termelődő tejsav mennyiségét is meghatároztuk.

A spektrofotometriás méréseket MOM 360 spektrofotométeren végeztük.

Az aktivitásmérést a benzol-izobutanolos fázisok esetén rendre folyadék szcintillációs módszerrel végeztük, Packard típusu automatizált Tri-Carb spektrométerrel, tolnol-alkoholos közegben PPO /2,5 - difeniloxazol/, illetve POPOP (1,4-Di- [2-/5-feniloxazolil/]) szcintillátort alkalmazva /35./. A módosított LOHMAN-módszer alkalmazása során nyert vizes oldat aktivitását ugyancsak a fenti típusu tri-carb spektrométerben Cserenkov effektussal mértük.

Miután az egyes frakciókat teljesen azonos módszerrel, mint anorganikus foszfátot mértük, a quench effektust nem vettük figyelembe, melynek oka a vizsgálataink szerint a foszformolibdát komplex jelenléte és az eredményeket c.p.m.-ben adjuk meg. Természetesen külön meghatároztuk a Cserenkov és a szcintillációs mérések relatív hatásfokát, és a

Cserenkov méréssel nyert adatokat ennek figyelembevételével adtuk meg. Ezen relatív hatások meghatározását belső standardizálással végeztük.

A mérési adatok birtokában megadtuk az említett négy pool - extracelluláris anorganikus foszfát /A/, intracelluláris anorganikus foszfát /B/, intracelluláris savlabil foszfát /C/, intracelluláris savrezisztens foszfát /D/ - koncentráció, összaktivitás és fajlagos aktivitás értékeinek időfüggését.

A kísérlet során alkalmazást nyert módszerek a következők:

MARTYN-DOTY módosított módszere /29., 30./

A szükséges oldatok az alábbiak:

5 %-os vizes $\text{NH}_4/2 \text{ MoO}_4$,

4 n H_2SO_4 ,

kénsavas alkohol:

10 ml cc. H_2SO_4 → ad. 500 ml abs. etanol,

← benzol-izobutanol 1:1 arányu elegye,

← SnCl_2 oldat:

cc. HCl-ban 40 %-os SnCl_2 -t készítünk, és ebből minden meghatározáshoz frissen állítjuk elő a következő redukáló oldatot: 0,5 ml az előbbi törzsoldatból → ad 20 ml 1n H_2SO_4 .

A meghatározás menete:

4 ml ismeretlen foszfor tartalmu oldathoz, mely 10 %-os TCA-ra nézve, 1 ml 5 %-os vizes $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ oldatot, 1 ml 4 n H_2SO_4 -t adunk és jól elegyítjük. Így foszformolibdát komplex alakba vittük a meghatározandó foszfort. 5 ml benzol-izobutanol 1:1 arányu elegyével kioxtraháljuk a komplexet 15 másodpercig tartó erős rázással. A leszívott szerves fázist kiizzított Na_2SO_4 -on szárítjuk. Az így kapott tiszta oldat 2 ml-éhez hozzáadunk 2 ml kénsavas alkoholt és 0,1 ml friss SnCl_2 -t. A komplexbe vitt foszfor redukálódik, és az oldat jellemző kék színű lesz, amelyet 720 m μ -nál fotometrálnuk. Ezen mikro módszerrel 1 -10 μg foszfor mennyiségek jól mérhetők.

Módosított LOHMAN-módszer /31./

A szükséges reagensek a következők:

5 %-os vizes $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$,

10 n H_2SO_4 ,

hidrogénperoxid,

redukáló oldat, melynek következő az összetétele:

0,2 g eikonogén / α - amino - β - naftol-szulfonsav/,

12,0 g NaHSO_3 ,

1,19 g Na_2SO_3 vagy 2,4 g $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$,

100 ml desztillált viz.

A meghatározás menete:

0,2 ml ismeretlen foszfor tartalmu oldatot 1,2 ml 10 n H_2SO_4 felhasználásával elroncsolunk. A kénsavas roncsolást

forró homokfürdőn végezzük. 3 óra eltelte után 1-2 csepp H_2O_2 -t cseppentünk a mintákhoz, majd még további 3 órán keresztül forró homokfürdőn tartjuk. Lehülés után 10 ml térfogatra hígítjuk desztillált vízzel. Ezen oldat 1 ml-éhez 1 ml desztillált vizet, 1 ml 10 n H_2SO_4 -t, 0,8 ml 5 %-os vizes $(NH_4)_2MoO_4$ -t és 0,2 ml redukáló oldatot adunk. Az elegyet 7 percig tartjuk 100 °C-os vízfürdőben. Itt is az oldatok jellemző kék színek lesznek, melyeket 800 m μ -nál fotometrálnunk. Ezen módszerrel 1-10 μg foszfor mennyiségek jól mérhetők.

ATP meghatározás /32., 33./

/Luciferase módszer/

A meghatározás elve:

Egyes élőlények fényt bocsátanak ki, világítanak. Ezen jelenséget biolumineszcenciának nevezzük, és alapja egy enzimreakció, mely az élő állatban megy végbe. Ez az enzim a luciferase enzim, ATP jelenlétében specifikus szubsztrát, a luciferin oxidációját katalizálja. A reakció során, melynek pontos mechanizmusa nem ismeretes /a luciferin pontos összetétele sem ismeretes/, a látható tartományban fény emittálódik. Ilyen világító állatokból, mint pl. a szentjánosbogár, izolálni lehet a luciferase enzim és a luciferin szubsztrát többé kevésbé tisztított preparátumát. Az ilyen luciferin-luciferase rendszerhez in vitro ATP-t adva szintén fény emittálódik. Miután a fényemisszió csak ATP jelenlétében megy végbe, és a fényemisszió intenzitása lineárisan függ az ATP mennyiségétől, a

jelenség alkalmas ATP meghatározásra. Az ilyen ATP meghatározás rendkívül specifikus és érzékeny /0,01 μg ATP még jól mérhető/. A fotonemisszió mérése Packard Tri-Carb spektrométerben elvégezhető.

A következő reagensek elkészítése szükséges:

Magnéziumarzenát puffer /pH: 7,4/:

/0,1 M arzenát, 0,05 M Mg^{2+} /

42,5 g $\text{Na}_3\text{AsO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ -t és 10 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -t

500 ml desztillált vízben oldunk, majd 7,4-re

állítjuk a pH-t 1 n HCl-val és végül 1000 ml-re egészítjük ki desztillált vízzel az oldatot.

Luciferase extraktum:

10 mg Sigma luciferase van 1 ml jéghideg magnéziumarzenát pufferben /pH: 7,4/. Így jéghidegen áll néhány percig, majd centrifugáljuk. A felüluszó közvetlen használható, mely előidézi a lumineszcenciát.

A meghatározás menete:

0,2 ml luciferase extraktumhoz 0,4 ml desztillált vizet mérünk. Ehhez 0,2 ml ismeretlen ATP tartalmu oldatot adunk. A hozzáadástól számított 25 másodperc elteltével kezdjük a számolást a Packard Tri-Carb spektrométeren. 1 percig tart a lumineszcencia mérése.

Tejsav meghatározás BARKER és SUMMERSON szerint /34./

Szükséges oldatok a következők:

p - oxidifenil oldat

150 mg p-oxidifenilre 1 ml 5 %-os NaOH-t

cseppentetve $\longrightarrow$ ad 10 ml desztillát viz,

20 %-os CuSO_4 ,

4 %-os CuSO_4 ,

cc. H_2SO_4 .

A meghatározás menete:

a/ Glukóz mentesítés /Fehling redukció/:

Kirázó csövekbe: 1 ml ismeretlen tejsav tartalmu oldatot mérünk be, ehhez 8 ml desztillált vizet, 1 ml 20 %-os CuSO_4 -t és 1 g Ca(OH)_2 -t adunk. Jól összerázzuk, majd fél óráig állni hagyjuk, közben még néhányszor összerázzuk, és a fél óra eltelte után lecentrifugáljuk.

b/ A centrifugálás után kapott felüluszó 1 ml-éhez 1 csepp 4 %-os CuSO_4 oldatot, 6 ml cc. H_2SO_4 -t adunk közben jégfürdős behűtést alkalmazva, és utána jól összerázzuk az egészet. 5 percre 100 C°-os vízfürdőbe tesszük a mintákat, majd újra jégfürdőbe. Ezek után 2 csepp /0,1 ml/ p-oxidifenil oldatot adunk az egyes rázócsövekbe, és ismételten jól összerázzuk az egész oldatot. Fél órára 28-30 C°-os vízfürdőbe helyezzük a mintákat, majd 90 másodpercre 100 C°-os vízfürdőbe és utána ismételten jeges fürdőbe. 570 $m\mu$ -nál fotometrálnak az oldatok.

10.2. A számítási technika és az izomorf modell kiválasztásának menete az adott esetben /12., 13., 14./

A vizsgált foszfát poolok közötti lehetséges kicserélődések leírására a BRANSON-féle formalizmust alkalmaztuk. Az időben változó koncentrációjú poolok közti kicserélődéses kapcsolatokhoz transzport folyamatokat rendeltünk BROWNELL és munkaátrai, valamint SOLOMON által megadott elvek szerint. Az $A \rightarrow B$ transzport lényegében egy biológiai passzív transzport, mely a sejthártyán keresztül játszódik. A $C \rightarrow B$ transzport viszont egy kémiai folyamat.

A négy foszfát pool közötti kicserélődéses, illetve transzport kapcsolatok adott sémája definiálja a vizsgált rendszert leíró tracer kinetikai modellt. Csupán a kicserélődéses kapcsolatokat tekintetbe véve a következőképpen adható meg az elvileg lehetséges 4 kompartmentes modellek száma. Térben úgy határozható meg a 4 kompartment helyzete, mint egy tetraéder csucsai, mely esetben a tetraéder élei pedig a kicserélődéses kapcsolatoknak felelnek meg. 6 él képviseli a maximálisan lehetséges kicserélődéses kapcsolatokat. Ha nem minden kompartment között áll fenn kicserélődés, akkor ennek megfelelően újabb változatok adódnak. Ezen változatok összegét a következőképpen adhatjuk meg:

$$\binom{6}{6} + \binom{6}{5} + \binom{6}{4} + \binom{6}{3} + \binom{6}{2} + \binom{6}{1} = 63 \quad /10.1./$$

A sor egyes tagjai azon tetraéderek lehetséges számát szolgáltatják, melyek 1 vagy több éle mentén nem játszód-
nak le kicserélődések. A transzport folyamatok figyelem-
be vétele a lehetséges modellek számát nem növeli. Az e-
gyes poolok koncentrációjának változása egyértelműen meg-
határozza a transzport folyamatokat.

BROWNELL és munkatársai által megadott elv alapján
lehetséges kiválasztani a vizsgált rendszerrel legtökéle-
tesebb izomorfiát mutató modellt. Az izomorfia követke-
ztében a modell leginkább alkalmas a rendszerben lejátszó-
dő transzport és kicserélődéses folyamatok egyidejű vize-
gálatára. Esetünkben a rendszerrel legjobb izomorfiát mu-
tató modellel szemben a következő követelmények támaszt-
hatók:

a/ A BRANSON-féle egyenletek megoldása a modell ese-
tében nem ad negatív sebesség értéket.

b/ Ha valamely sebesség érték kiszámítása többféle-
képpen lehetséges /a modellben kevesebb sebesség szerepel,
mint ahány egyenlet rendelkezésre áll/, akkor a nem azo-
nos úton nyert sebesség^{ek}nek jó közelítéssel egyezniük kell.

c/ Az egyenletek megoldása a modell esetében vala-
mennyi sebességre jó közelítéssel konstans értéket kell
adjon.

Amennyiben az a/ és b/ feltétel nem teljesül, a mo-
dell "ellentmondásosság"-áról beszélünk. A c/ feltétel
hiányos teljesülése azt jelenti, hogy a stacionaritás
nem tökéletes /természetesen figyelembe véve, hogy in

vitro kísérletek értékeléséről van szó/, de ez nem jelenti egyértelműen a modell kizárhatóságát.

Jelen esetben 63 logikailag lehetséges variációból kell kiválasztani a legtökéletesebb izomorf modellt. Az összaktivitás és fajlagos aktivitás időbeni változását mutató görbék elemzése lényegesen lecsökkenti a lehetséges izomorf modellek számát. A fennmaradó modellekre pedig alkalmazzuk a BRANSON-féle egyenleteket, és így már ki tudjuk választani az izomorf modellt.

Az egyenletek numerikus értékekkel történő felírásánál használt differenciál hányadosokat a megfelelő görbék grafikus, illetve numerikus differenciálásával nyertük.

A differenciál egyenletek sebesség értékekre vonatkozó megoldását a József Attila Tudományegyetem Kibernetikai Laboratóriuma közreműködésével, MINSZK 22 típusu computer segítségével végeztük.

A BRANSON-féle egyenletekkel a következőképpen lehetséges egy adott modellt leírni, mely modell jelen esetben tartalmazza az összes kicserélődéses kapcsolatot, valamint $A \rightarrow B$ és $C \rightarrow B$ transzportot.

$$\begin{aligned} \frac{d I_A}{dt} - \frac{d A}{dt} \int_A = & W_{AB} / S_B - S_A / + W_{AC} / S_C - S_A / + \\ & + W_{AD} / S_D - S_A / \end{aligned} \quad /10.2./$$

$$\frac{d I_B}{dt} + \frac{d A}{dt} S_A + \frac{d C}{dt} S_C = W_{AB} /S_A - S_B/ + W_{BC} /S_C - S_B/ + \\ + W_{BD} /S_D - S_B/ \quad /10.3./$$

$$\frac{d I_C}{dt} - \frac{d C}{dt} S_C = W_{AC} /S_A - S_C/ + W_{BC} /S_B - S_C/ + \\ + W_{CD} /S_D - S_C/ \quad /10.4./$$

$$\frac{d I_D}{dt} = W_{AD} /S_A - S_D/ + W_{BD} /S_B - S_D/ + W_{CD} /S_C - S_D/ \\ /10.5./$$

ahol

I_A, I_B, I_C, I_D : az A, B, C, D poolok összaktivitása
/c.p.m. $\cdot$ ml⁻¹ mosott vörösvérsejt, illet-
ve azzal kapcsolatban levő 4 ml Krebs-
Ringer foszfát/,

S_A, S_B, S_C, S_D : az A, B, C, D poolok fajlagos aktivitása
/c.p.m. μg P⁻¹/

W: az index által jelzett két pool közötti kicserélődés
sebessége
/ μg P. perc⁻¹ $\cdot$ ml⁻¹ mosott vörösvérsejt,
illetve azzal kapcsolatban levő 4 ml Krebs-
Kinger foszfát/.

A, B, C, D: az egyes poolok foszfát mennyisége $\mu\text{g P. ml}^{-1}$
mosott vörösvérsejt, illetve azzal kapcsolat-
ban levő 4 ml Krebs-Kinger foszfát/.

Ezen jelöléseket használjuk a továbbiakban is.

11. Egyszerű tracer kinetikai modell a "tipusos" kísérletek leírására

Ismertes, hogy a vörösvérttestben az egyes foszfo-
proteinek, foszfolipidek jelölődése igen gyorsan végbe
mehet. Kísérleteink első részében ezért megvizsgáltuk,
hogy kell-e számolni a savoldható foszfát poolon kívül
egyéb foszfát vegyületek jelölődésével. Ennek eldöntésé-
re összehasonlítottuk a vörösvérttest összaktivitás vál-
tozását a TCA-s felülszók összaktivitás növekedésével
az inkubálás során. A 11.1. táblázat mutatja ezen két
érték lo kísérlet alapján meghatározott átlageltérése-
it %-ban az inkubálás függvényeként, ahol a vörösvér-
test összaktivitását 100 %-nak vettük.

11.1. Táblázat

A savoldható foszfát és a teljes vörösvérttest összaktivitás értékei közötti eltérés

Inkubálás ideje /perc/	$\left(1 - \frac{I_{TCA}}{I_{vvt}}\right) \cdot 100$
0	- 0,33
15	- 0,82
30	0,06
45	- 1,10
60	0,68
90	0,91
120	0,15
180	0,80

I_{TCA} : a savoldható foszfát összaktivitása 1 ml kimosott
vörösvérsejtben

I_{vvt} : 1 ml kimosott vörösvérsejt összaktivitása

A 10.1. táblázat adatai alapján megállapítható, hogy amennyiben a savoldható pool foszfát vegyületein kívül más foszfát vegyületek jelölődnek is a kísérlet során, ez a savoldható pool összaktivitásához képest elhanyagolhatóan kicsi. Ennek alapján a savoldható pool mint zárt rendszer tekinthető kísérleteinkben.

Ezután meghatároztuk 50 kísérletben a négy foszfát pool mennyiségének, összaktivitásának és fajlagos aktivitásának időbeni változását.

A poolok mennyiségére vonatkozó eredményeink a következők. Amíg az intracelluláris savrezisztens foszfát pool mennyisége konstans, az extracelluláris anorganikus foszfát pool és az intracelluláris anorganikus foszfát pool és az intracelluláris savlabil foszfát pool mennyisége jelentős mértékben változik a kísérlet során /180 perc alatt/. Ezen változások anyagmérlege a következőképpen adható meg:

$$\frac{dA}{dt} + \frac{dC}{dt} + \frac{dB}{dt} = 0 \quad /11.1./$$

Ezt az összefüggést tükrözi a 11.2. táblázat, melynek értékei a $\frac{dA}{dt} + \frac{dC}{dt}$ és a $\frac{dB}{dt}$, két tag eltérését adják meg az idő függvényében százalékosan úgy, hogy a $\frac{dB}{dt}$ tekintendő 100 %-nak. Az egyes értékek 50 kísérlet átlageredményei.

A 11.2. táblázat adatai alapján megállapítható, hogy az A, C, illetve B poolok közötti anyagmérleg jó közelítéssel konstansnak tekinthető.

11. 2. Táblázat

Az extracelluláris, intracelluláris anorganikus és
savlabil foszfát pool anyagmérlege

Inkubálás ide- je /perc/	$\left(\frac{\frac{dA}{dt} + \frac{dC}{dt}}{\frac{dB}{dt}} - 1 \right) \cdot 100$
0	4,04
15	- 2,25
30	3,36
45	- 2,88
60	- 3,69
90	- 1,74
120	- 2,59
180	3,47

/A/, /B/, /C/: $\mu\text{g P. ml}^{-1}$ mosott vörösvérsejt,
illetve azzal kapcsolatban levő 4 ml Krebs-Kinger fosz-
fát.

Az intracelluláris savrezisztens pool mennyisége
50 kísérlet eredményeit átlagolva a következő értéknek
adódott:

$$D = 314 \pm 28 \mu\text{g P/ml mosott vörösvérttest.}$$

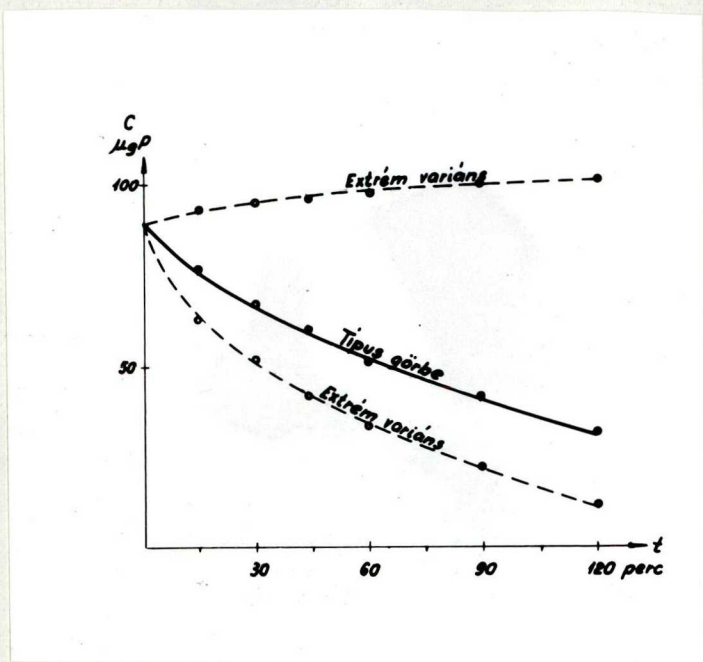
A másik 3 pool mennyiségének időbeni változása kísér-
letenként is eltérést mutatott. Különösen szembetűnő ez
az eltérés az intracelluláris savlabil poolnál. Egyes
esetekben ezen pool mennyisége időben csökken, változat-
lan marad, vagy növekszik. Az extracelluláris anorganikus
foszfát pool mennyiségi változása valamennyi esetben csök-

kenő tendenciát mutat, valamint az intracelluláris anorganikus foszfát pool mennyisége minden kísérletben növekedett. Azon esetekben, amelyekre jellemző a savlabil pool extrém mennyiségi változása, a két másik pool mennyiségi változását leíró időgörbe is eltér attól, amit az esetek többségében nyerhetünk, természetesen oly mértékben, hogy a 11.1 összefüggés érvényesülésének megfeleljen.

A 11.1, 11.2 és 11.3. ábrák az intracelluláris savlabil foszfát pool, az intracelluláris anorganikus foszfát pool és az extracelluláris anorganikus foszfát pool mennyiségének időbeni változását szemléltetik. A kihuzott vonalak a típusgörbéket jelentik, melyek az elvégzett kísérletek minimum 50 %-ánál leírják a változást maximálisan 5-7 %-os eltéréssel. Szaggatott vonallal ábrázoltuk a maximális eltérést mutató kísérletekben nyert görbéket. A vizsgált rendszerrel izomorf modell megkeresése során elvégzett számításokhoz a típusgörbe adatait használtuk fel.

A mennyiségi típusgörbéket megvizsgálva /11.1, 11.2, 11.3. ábra/, továbbá figyelembe véve a 11.1 összefüggést, mely az anyagmérleget definiálja, megállapíthatjuk, hogy az A és C mennyisége folyamatosan csökken, és ez a csökkenés a B poolon mint növekmény jelentkezik. A BROWNELL és munkatársai által javasolt terminológia szerint mondhatjuk, hogy rendszerünkben egy $A \rightarrow B$ és egy $C \rightarrow B$ transzport megy végbe. Ezen két transzport folyamat leírására alkalmas formula megkeresését a MINSZK 22 típusu computer segítségével, görbe közelítéssel eljárás alkalmazása

utján végeztük.

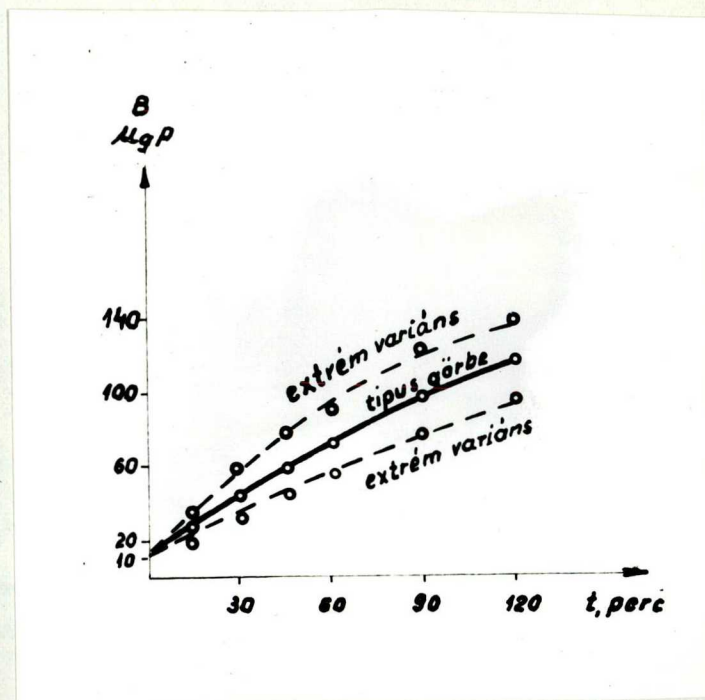


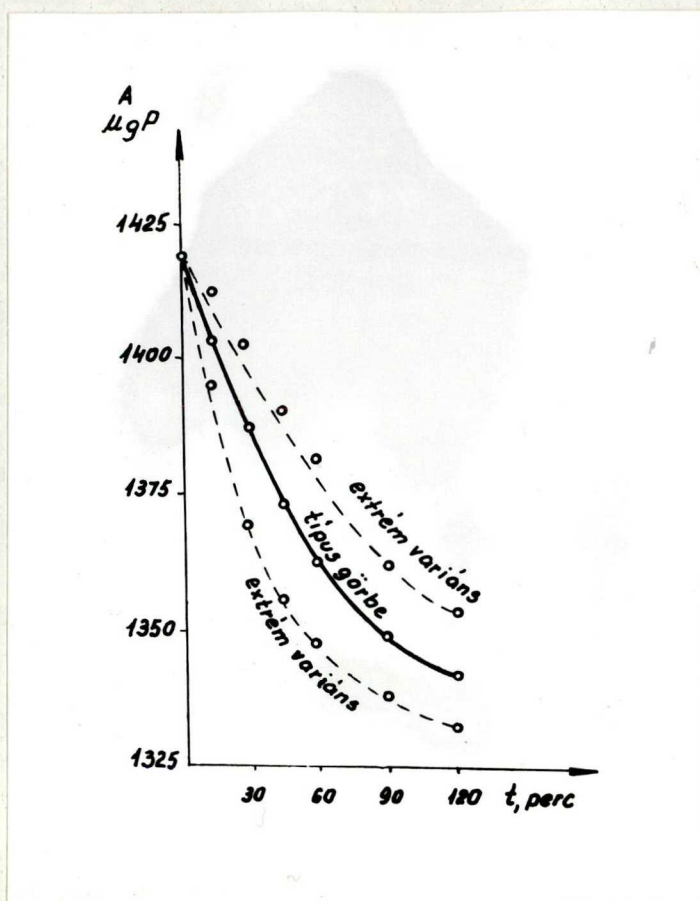
11.1. ábra

Az intracelluláris savlabil foszfát pool mennyiségének változása az idő függvényében.

11.2. ábra.

Az intracelluláris anorganikus foszfát pool mennyiségének változása az idő függvényében.





11.3. ábra.

Az extracelluláris anorganikus foszfát pool mennyiségének változása az idő függvényében.

Az $A \rightarrow B$ transzportra nyert függvény:

$$-\frac{dA}{dt} = 1,9 \cdot e^{-0,02 t} \quad /11.2./$$

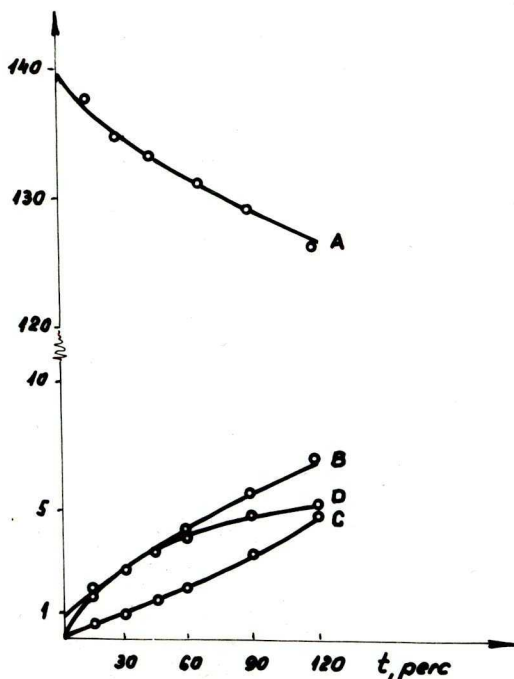
A $C \rightarrow B$ transzportra nyert egyenlet:

$$-\frac{dC}{dt} = 0,3 \cdot e^{-0,008 t} \quad /11.3./$$

Ezen két egyenlet alapján látható, hogy az $A \rightarrow B$ transzport a gyorsabb folyamat.

Az összaktivitás változás időfüggését leíró görbét valamennyi poolra vonatkozóan azon kísérletek alapján adtuk meg, melyekben a mennyiségi változás leírására felvett típusgörbét nyertük. Ezen összaktivitás

összaktivitás
c.p.m. $\times 10^5$



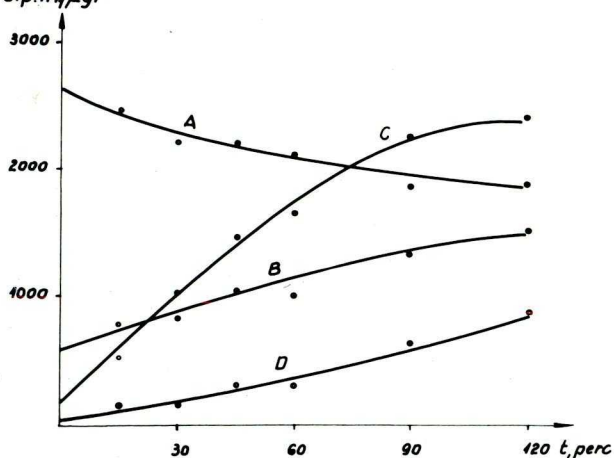
11.4. ábra.

A négy foszfát pool
/A,B,C,D,/ összakti-
vításának időbeli
változása.

11.5. ábra.

A négy foszfát pool
/A,B,C,D/ fajlagos
aktivitásának időbeli
változása csökkenő
ATP szint esetén

fajlagos aktivitás
C.p.m./ μ gP



görbék, illetve a mennyiségi típusgörbék alapján számítottuk a fajlagos aktivitás értékeket. A savrezisztens foszfát pool esetében az összaktivitás típusgörbe mellett az előzőkben említett $314 \mu\text{g P/ml}$ mosott vérsejt átlagértéket használtuk.

A 11.4. ábra szemlélteti mind a négy pool összaktivitás időgörbéit. A 11.5. ábra a fajlagos aktivitás időgörbéket mutatja mind a négy poolra vonatkozóan.

Az aktivitás görbék adatai alapján mindenekelőtt megállapítottuk, hogy mindhárom intracelluláris pool jelentős mértékben jelölődik. Ez a tény már önmagában is csökkenti bizonyos mértékig a logikailag lehetséges modellek számát. Ennek alapján ugyanis kizárhatók már azok a variációk, melyek csupán egyetlen kicserélődéses kapcsolatot tételeznek fel a transzport folyamatok mellett. ~~Egyetlen kicserélődéses kapcsolatot tételeznek fel a transzport folyamatok mellett.~~ Egyetlen kicserélődéses kapcsolat, ugyanis bármelyik két pool között legyen is az feltételezve, még az $A \rightarrow B$, illetve $C \rightarrow B$ transzportok mellett sem teszi lehetővé mind a három intracelluláris pool jelölődését. Egyetlen kicserélődéses kapcsolatot tartalmazó modellek száma $\binom{6}{1} = 6$. Marad tehát 57 logikailag lehetséges modell.

Ez a szám még tovább csökkenthető, ha részletesebben tanulmányozzuk a 11.4. és a 11.5. ábrák görbéi által kifejezett kísérleti eredményeket. Az A-ból, illetve C-ből

B felé irányuló transzport által szállított összaktivitás mennyiségét ha megnézzük, azt tapasztaljuk, hogy az a 70.-80. percig lényegesen nagyobb, mint a B-ben éppen jelenlévő összaktivitás mennyisége, azaz:

$$\frac{dA}{dt} S_A + \frac{dC}{dt} S_C > \frac{dI_B}{dt} \quad /11.4/$$

Ez azt jelenti, hogy a B poolnak legalább egy olyan poolal kicserélődéses kapcsolatban kell állnia, melynek fajlagos aktivitása a B poolénál kisebb. Ez a pool rendszerünkben csakis a D pool lehet, miután a 30.-40. perctől kezdve már $S_C > S_B$. Megállapíthatjuk tehát, hogy a vizsgált rendszerrel izomorf modellnek feltétlenül kell tartalmaznia a $B \rightleftharpoons D$ kicserélődéses kapcsolatot.

A 70.-80. perctől kezdődően módosul a 11.4. összefüggés a következőképpen:

$$\frac{dA}{dt} S_A + \frac{dC}{dt} S_C < \frac{dI_B}{dt} \quad /11.5./$$

Megváltozott a $\frac{dI_B}{dt}$ és a transzport folyamatok által szállított összaktivitás viszonya. A 11.5. összefüggés azt jelenti, hogy a B poolnak egy nála nagyobb fajlagos aktivitású poolal is kicserélődéses kapcsolatban kell állnia. Ez lehet az A vagy a C pool, esetleg mindkettő.

Az S_C még akkor is tovább növekszik, amikor már $S_C > S_B > S_D$. Ekkor már csak az A pool fajlagos aktivitása nagyobb a C poolénál, így S_C további növekedése csak úgy lehet, ha a rendszerben fenn áll az

$A \rightleftharpoons C$ kicserélődéses kapcsolat.

Ezek alapján rögzíthető az izomorf modell két kicserélődéses kapcsolata, a $B \rightleftharpoons D$ és az $A \rightleftharpoons C$ kicserélődése, valamint megállapítható, hogy az $A \rightleftharpoons B$, illetve $B \rightleftharpoons C$ kicserélődésnek léteznie kell. Így a logikailag lehetséges modellek száma igen lényegesen lecsökken és a következőképpen adható meg:

$$\binom{4}{4} + \binom{4}{3} + \binom{4}{2} + \binom{4}{1} - \binom{2}{2} - \binom{2}{1} = 12 \quad /11.6./$$

A továbbiakban erre a 12 modellvariációra felírtuk a BRANSON-féle egyenleteket, majd valamennyi időpontra meghatároztuk a sebességek numerikus értékeit. Az egy időponthoz tartozó sebességeket két eltérő uton határoztuk meg. Azon modelleknél, ahol adott időpontra több egyenlet állt rendelkezésre a számításához, mint ahány sebességet meg kellett adni, ezen két értéket egymástól független egyenletek felhasználásával nyertük. Az 5, illetve 6 sebességet használó modellek esetében, ahol adott időpontra csupán ennél kevesebb egyenlet írható fel, ezen időpont 10 perces környezetének két szélső értékére alkalmaztuk a BRANSON-féle egyenleteket, és azok közös megoldásával nyertük a sebesség értékeket.

A 12 logikailag lehetséges modellváltozat között csupán egyetlen olyan modellt találtunk, amely a vizsgált időintervallum befejező kicsiny részétől eltekintve kielégítően teljesíti az izomorfia korábban említést nyert feltételeit. A rendszerünkkel izomorf modell sémáját a 11.6.

ábra, és ezen modell sebesség értékeit a 11.4. táblázat mutatja. Látható, hogy három kicserélődéses kapcsolatot tartalmaz az izomorf modell a transzport folyamatok mellett.

A 11.3. és 11.4. táblázat sebesség értékeit két eltérő uton határoztuk meg. A 11.3. táblázat szemlélteti, hogy a kísérlet teljes időintervallumára vonatkozóan egyik vagy másik sebesség esetében negatív érték adódott a táblázaton szereplő mind a 11 modellnél. A 11.4. táblázaton látható, hogy a rendszerünkkel izomorf modell esetében kizárólag egyetlen mérési pontban /a 180 perces kísérlet utolsó időpontjában/ csupán egyetlen sebesség W_{AC} ad negatív sebesség értéket. Ezen modellnél igen jó az eltérő uton számított, azonos időponthoz tartozó sebesség értékek egyezése. Jó közelítéssel teljesíti ez a modell a stationaritás követelményeit a W_{AC} utolsó értékétől eltekintve.

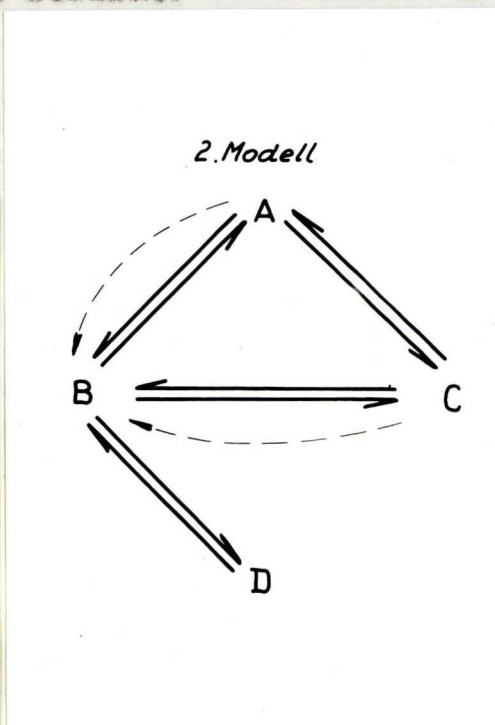
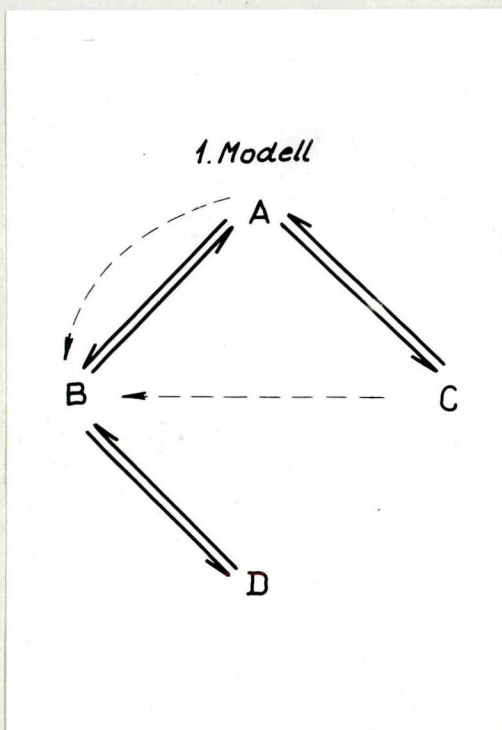
Tehát az előbbiek alapján azt mondhatjuk, hogy a 11.6. ábrán látható modell jól értelmezi a mérések eredményeit a kísérlet befejező rövid szakaszától eltekintve. Kielégítően teljesíti ezen modell az izomorfia feltételeit.

Ellenőrzésképpen végül elvégeztük a kísérleti görbék viselkedése alapján kizárt, de logikailag lehetséges összes többi modellvariáció esetében is a BRANSON-féle egyenletek megoldását és a sebesség értékek numerikus meghatározását. Ezen számítás eredménye megerősítette az előzőekben mondottakat, miután kizárólag ellentmondásos modellvariációkat eredményezett.

11.3. Táblázat

12 logikailag lehetséges modell közül a 11 ellentmondásos modell sémája és a hozzájuk tartozó negatív sebesség értékek

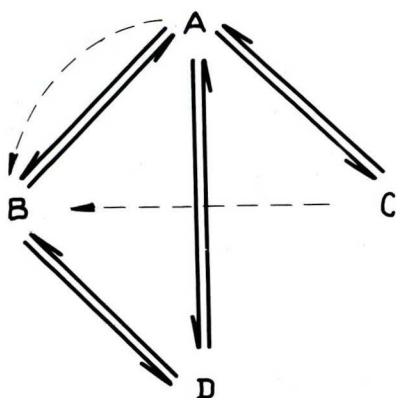
/W/: $\mu\text{g P.perc}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ mosott vérsejt, illetve azzal kapcsolatban levő 4 ml Krebs-Kinger foszfát.



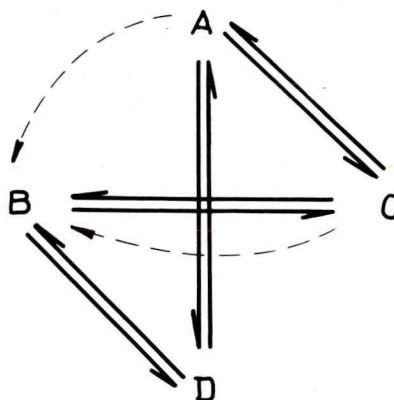
Inkubálás ideje /perc/	Negatív sebességek			
	1. Modell		2. Modell	
	W_{AB}	W_{AC}	W_{AC}	W_{BC}
0	- 0,761	-	-	-
15	- 0,639	-	- 1,395	-
30	- 0,138	-	-	-
45	-	-	-	- 13,544
60	-	-	-	- 7,293
90	-	-	-	- 2,327
120	-	-	-	- 0,650
180	-	- 1,333	-	-

11.3. táblázat folytatása:

3. Modell



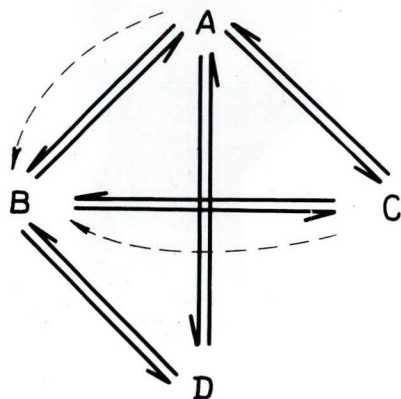
4. Modell



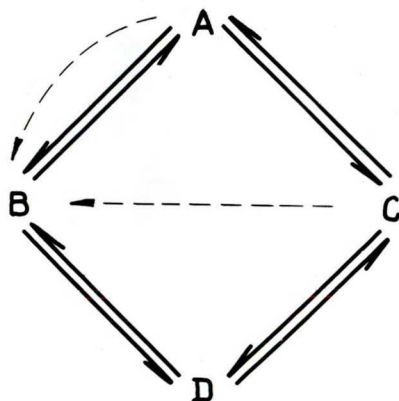
Inkubálás ideje /perc/	Negatív sebességek	
	3. Modell	4. Modell
	W_{AB}	W_{BD}
0	- 3,132	- 3,746
15	-12,196	- 3,092
30	- 7,403	- 0,558
45	- 9,153	- 1,366
60	-14,936	- 1,852
90	-15,075	- 1,494
120	-31,541	- 0,991
180	-	-

11.3. táblázat folytatása:

5. Modell



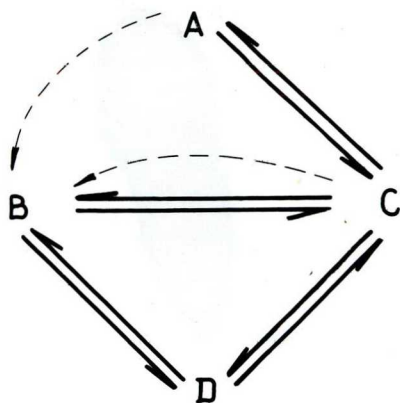
6. Modell



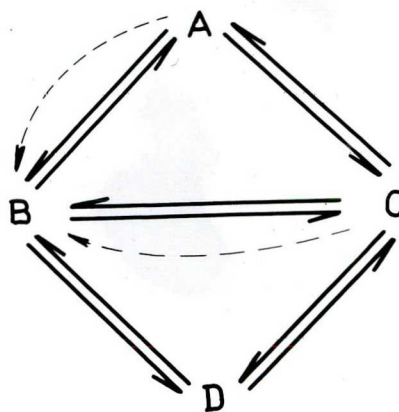
Inkubálás ideje /perc/	Negatív sebességek	
	5. Modell	6. Modell
	W_{AB}	W_{CD}
0	- 2,806	-112,687
15	- 3,708	- 10,869
30	- 1,493	- 2,179
45	- 2,194	- 2,303
60	- 5,186	- 2,080
90	- 3,986	- 0,973
120	- 0,176	- 0,345
180	-	-

11.3. táblázat folytatása:

7. Modell



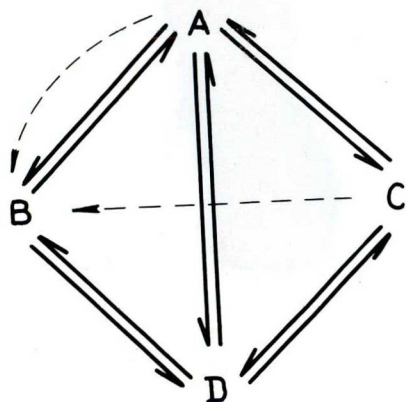
8. Modell



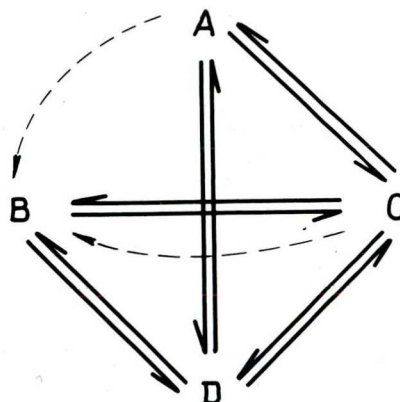
Inkubálás i- deje /perc/	Negatív sebességek		
	7. Modell		8. Modell
	w_{BC}	w_{BD}	w_{CD}
0	$-2 \cdot 10^7$	-	- 0,298
15	-	$- 10^8$	- 1,243
30	-	-	-0,368
45	-3,115	-	- 0,837
60	-	-	- 1,604
90	-	-	- 1,325
120	-	-	- 0,162
180	-	-	-

11.3. táblázat folytatása:

9. Modell

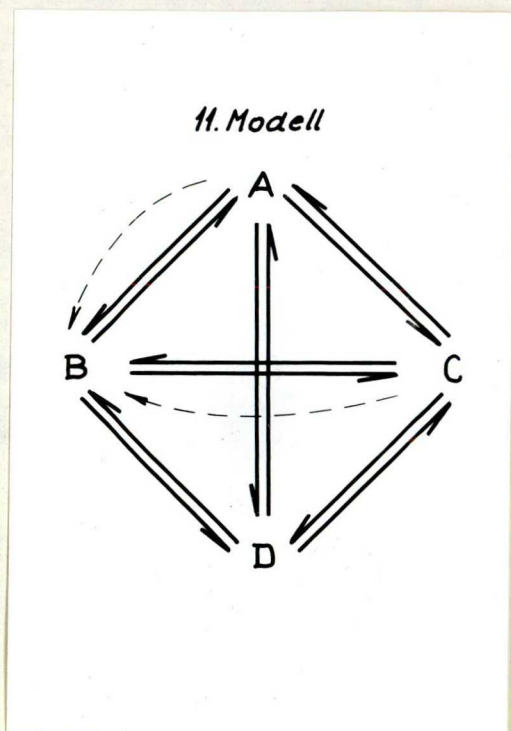


10. Modell

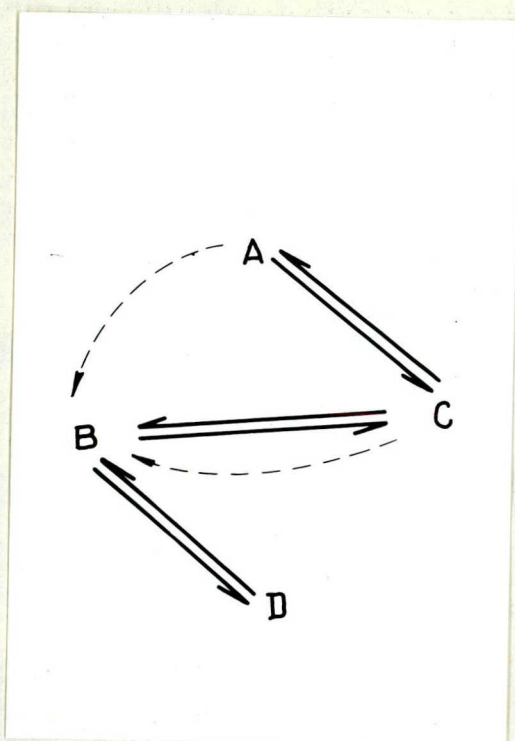


Inkubálás i- deje /perc/	Negatív sebességek		
	9. Modell		10. Modell
	W_{AB}	W_{AD}	W_{CD}
0	- 0,958	-	- 0,102
15	- 4,382	-	- 1,150
30	- 2,344	▼	- 0,340
45	- 2,496	-	- 0,679
60	- 4,718	-	- 1,317
90	- 3,134	-	- 0,960
120	-	-0,625	- 0,015
180	-	▼	-

11.3. táblázat folytatása:



Inkubálás i- deje /perc/	Negatív sebességek
	11. Modell
	W_{CD}
0	$- 3,1 \cdot 10^7$
15	$- 1,4 \cdot 10^7$
30	$- 7,0 \cdot 10^7$
45	$- 5,0 \cdot 10^7$
60	$- 1,6 \cdot 10^7$
90	$- 1,0 \cdot 10^7$
120	-
180	-



11.6. ábra.

A csökkenő ATP szint
esetén a rendszerrel
izomorf modell sémá-
ja.

11. 4. Táblázat

A csökkenő ATP szint esetén a rendszerrel izomorf

modell sebesség értékei

1 μg P.perc⁻¹.ml⁻¹ mosott vörösvérsejt/

Inkubálás ideje /perc/	Sebesség értékek		
	W _{AC}	W _{BC}	W _{BD}
0	0,626	1,410	0,569
15	0,671	3,047	0,850
30	1,012	2,738	1,032
45	1,223	1,003	1,164
60	1,580	1,562	1,301
90	3,117	1,874	1,322
120	7,341	1,792	1,371
180	-5,653	1,060	1,586

12. A "tipusos"-tól eltérő kísérletek modellanalízise

Kísérleteink eredményeit tekintve nagyfoku változékonyság vehető észre. Ezt jól mutatják a 11.1., 11.2. és 11.3. ábrák görbéi, melyeken az intracelluláris savlabil foszfát pool, az intracelluláris anorganikus foszfát pool és az extra celluláris anorganikus foszfát pool mennyiségi változása látható az idő függvényében. E három pool közül a savlabil pool kiemelkedő a változékonyság szempontjából. A "tipusos"-tól eltérő változásokat mindhárom ábrán szaggatott vonalak szemléltetik.

A savlabil foszfát pool "tipusos"-tól eltérő mennyiségi változásának két extrém variánsa a következő /11.1. ábra/:

a/ Exponenciálisan csökken időben a savlabil pool foszfor mennyisége.

b/ Számottevően nem változik, vagy kismértékben növekszik időben a savlabil pool foszfor mennyisége.

Az exponenciális csökkenés azt jelenti, hogy a folyamat kezdetben gyors, aztán lelassul. Ez a jelenség nem magyarázható az anyagcsere romlásával, esetleges instabilitásával. Ha ugyanis az anyagcsere romlása okozná a savlabil pool csökkenését, akkor nem egy exponenciális görbe lefutásának felelne meg ez a változás, azaz időben nem egy lassuló, hanem egy gyorsuló folyamatot eredményezne. Ez a tény arra enged következtetni, hogy a savlabil foszfát pool csökkenése valamilyen enzim hatásával értelmezhető.

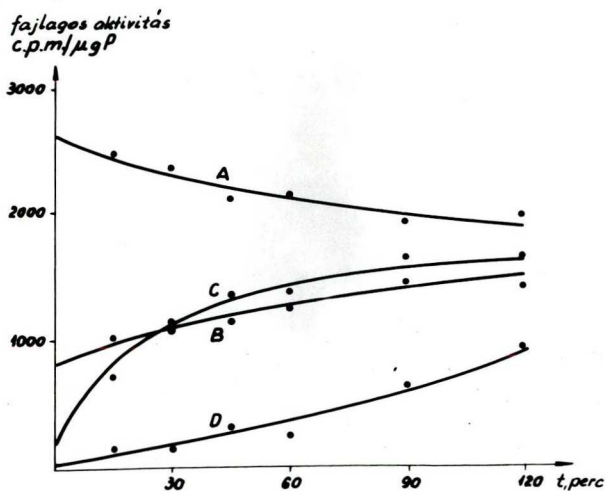
Végeztünk direkt ATP meghatározással is kísérleteket, melyek szerint a savlabil pool tökéletesen képviseli az ATP poolt. Ennek figyelembe vételével mondhatjuk, hogy a savlabil pool szintjét megszabják egyrészt az anyagcsere folyamatok, melyek az ATP felépülését jelentik, másrészt az intakt vörösvértest ATP-áz aktivitása, mely az ATP lebomlását eredményezi.

Ismeretes, hogy az ATPáz mint SH-enzim érzékeny, labilis. A plazmából a vörösvértestre adszorbeálódó olyan komponensek, melyek mosással nem távolíthatók el, mint pl. a szabad zsírsavak, peptidek, aktiválhatják, vagy gátolhatják az ATPáz. Az ATP szint variabilitása az ATPáz aktivitásának differenciáira utal.

A csökkenő és a stabilis savlabil poolt mutató variánsok esetében az egyes foszfát poolok összaktivitás értékei lényeges eltérést nem adnak, míg a fajlagos aktivitás értékei igen. A 11.5. és 12.1. ábrát összehasonlítva látható, hogy csupán a savlabil pool fajlagos aktivitásánál van különbség, ahol a savlabil pool mennyisége csökken, ott a fajlagos aktivitása gyorsan emelkedik, és metszi az extracelluláris anorganikus foszfát pool fajlagos aktivitás görbáját /11.5. ábra/. A stabilis savlabil pool fajlagos aktivitás görbéje viszont alig emelkedik, és így nem metszi az extracelluláris anorganikus foszfát pool fajlagos aktivitás görbáját /12.1. ábra/. Mindkét variáns anyagcsere szempontjából nem mutat különbséget, a tejsav termelése azonos.

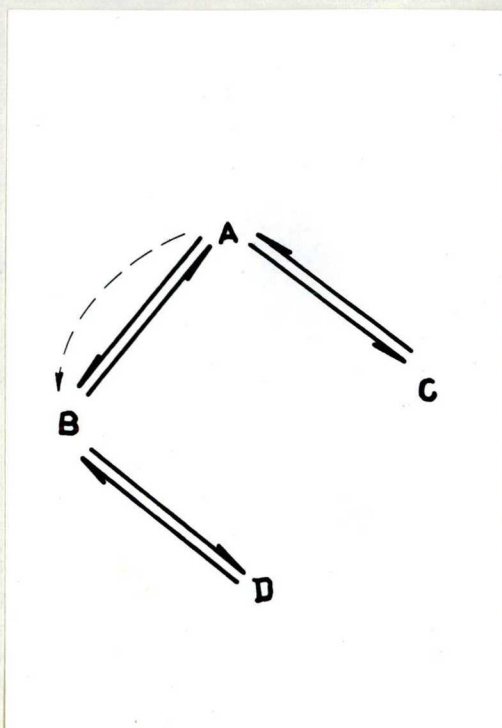
A kísérletek többségében a savlabil foszfor, illet-

ve az ATP szint csökkent. Általában az irodalomban közölt hasonló vizsgálatok olyan adatokat szolgáltatottak, melyek szerint a savlabil foszfor illetve ATP szint nem változik. Saját kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a vörösvérsejteket azonnal a vérvétel után felhasználva a kísérlethez, általában csökkenő ATP görbét kapunk. Ha a vörösvérsejteket vérvétel után 4-5 óráig hűtőszekrényben tároljuk, és ezután használjuk fel kísérlethez, az ATP görbe általában nem változik, vagy enyhén növekvő tendenciát mutat. Ez a tény is támogatja az ATP csökkenés kinetikája alapján levont azon következtetésünket, hogy nem az anyagcsere viszonyok romlása eredményezi az ATP szint csökkenését, hanem valamilyen ezim aktivitása.



12.1. ábra.

A négy foszfát pool /A,B,C,D/ fajlagos aktivitásának időbeli változása standard ATP szint esetén.



12.2. ábra.

A standard ATP szint esetén a rendszerrel izomorf modell sémája.

Standard ATP szint esetén megszűnik a $C \rightarrow B$ transzport, de ugyanakkor fellép az $A \rightleftharpoons B$ kicserélődés. Ezen esetben izomorf modell sémáját szemlélteti a 12.2. ábra, melyhez tartozó sebesség értékeket a 12.1. táblázat tartalmazza.

12.1. Táblázat

A standard ATP szint esetén a rendszerrel izomorf modell sebesség értékei

/ $\mu\text{g P.perc}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ mosott vörösvérsejt/

Inkubálás ideje /perc/	Sebesség értékek		
	W_{AB}	W_{AC}	W_{BD}
0	0,886	1,474	13,056
15	0,907	1,564	5,570
30	1,424	1,142	4,213
45	2,000	0,839	5,322
60	2,522	0,658	4,639
90	2,486	0,322	4,442
120	1,685	0,319	5,382
180	0,171	0,257	2,137

13. Eltérő fiziológiai viszonyok tanulmányozása

13.1. Hipotóniás közeg alkalmazása

Ismeretes, hogy a hipotónia olyan mértékben alkalmazva, amíg nem okoz hemolizist, fokozza a vörösvértest foszfát transzportját. Kísérleteinkben a hipotóniás közeget az eredeti Krebs-Ringer tápoldat desztillált vízzel történő hígítása útján nyertük, melynek összetétele a következőképpen módosul:

Na: 0,059 M

K : 0,00235 M

Mg: 0,00125 M

Ca: 0,00055 M

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$: 0,005 M

glukóz: 0,05 %

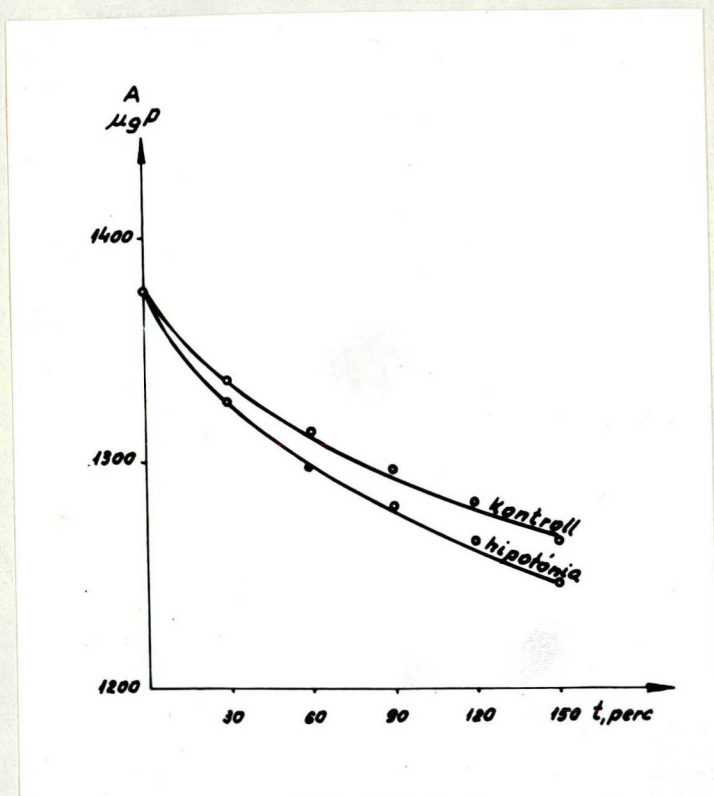
Ilyen hipotónia mellett kísérleteink során hemolízisnek nyomát sem észleltük.

A hipotónia eredményezi, hogy a vörösvértestek membránjának pórusai kitágulnak és ennek következtében megnövekszik a foszfát transzport mértéke. Ez magyarázza, hogy az extracelluláris anorganikus foszfát szintje időben csökken hipotóniás közeg esetén a kontrollhoz viszonyítva, valamint az intracelluláris anorganikus foszfát szintje pedig nő /13.1., 13.2. ábra/. Az extracelluláris és intracelluláris anorganikus foszfát poolok közötti transzport /A → B/ sebessége tehát megnőtt. A savlabil és a savrezisztens foszfát szint lényegesen nem változik hipotónia hatására.

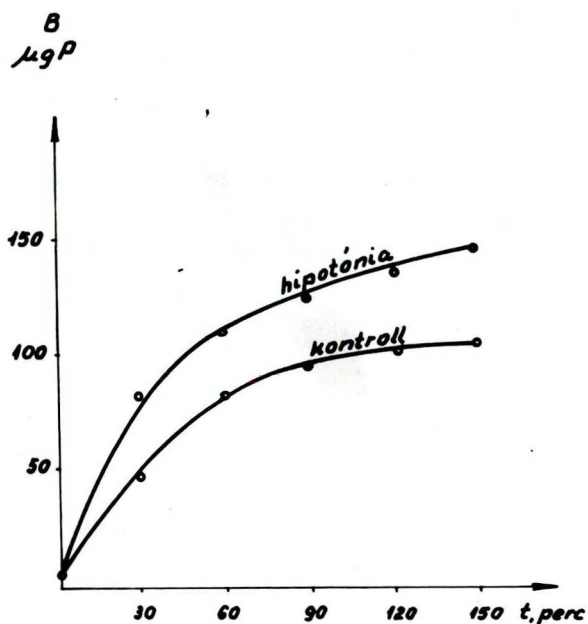
Az összaktivitás görbék hipotónia hatására az extracelluláris anorganikus foszfát esetében alacsonyabban, az intracelluláris 3 poolnál pedig magasabban futnak a kontrollhoz viszonyítva /13.3., 13.4., 13.5. 13.6. ábra/.

A fajlagos aktivitás görbék az összaktivitás görbékkel azonos irányu változást mutatnak, mely változás mértéke viszont nagyobb a hipotóniás és kontroll kísérletek között /13.7., 13.8., 13.9., 13.10. ábra/.

A hipotónia nem befolyásolja a vörösvértest tejsav termelését, tehát az anyagcsere nem változik.



13.1. ábra. Az extracelluláris anorganikus foszfát pool mennyiségének időbeli változása hipotóniás és kontroll /izotóniás/ közegben.

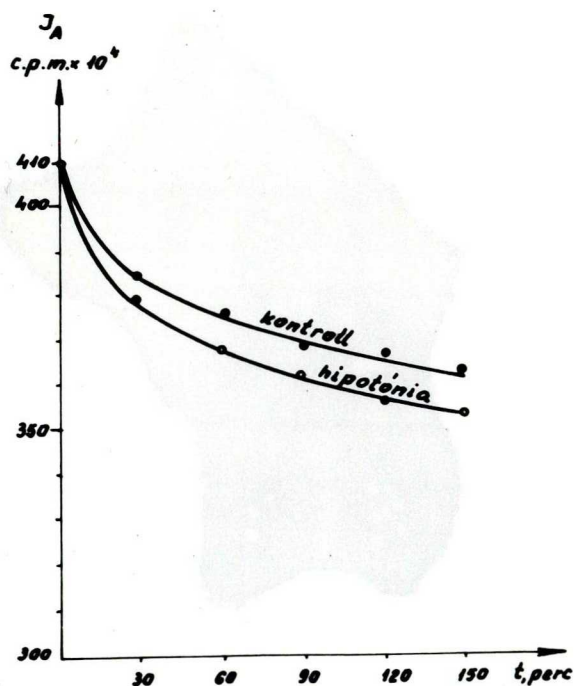


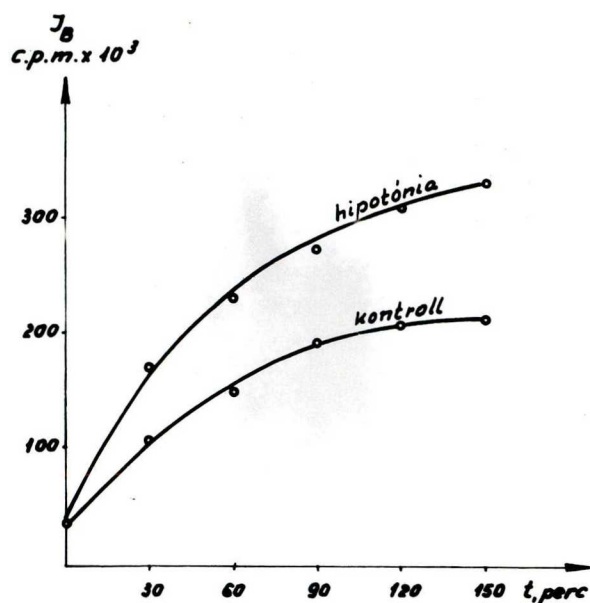
13.2. ábra.

Az intracelluláris anorganikus foszfát pool mennyiségének időbeli változása hipotóniás és kontroll /izotóniás/ közegben.

13.3. ábra.

Az extracelluláris anorganikus foszfát pool összaktivitásának időbeli változása hipotóniás és kontroll /izotóniás/ közegben.



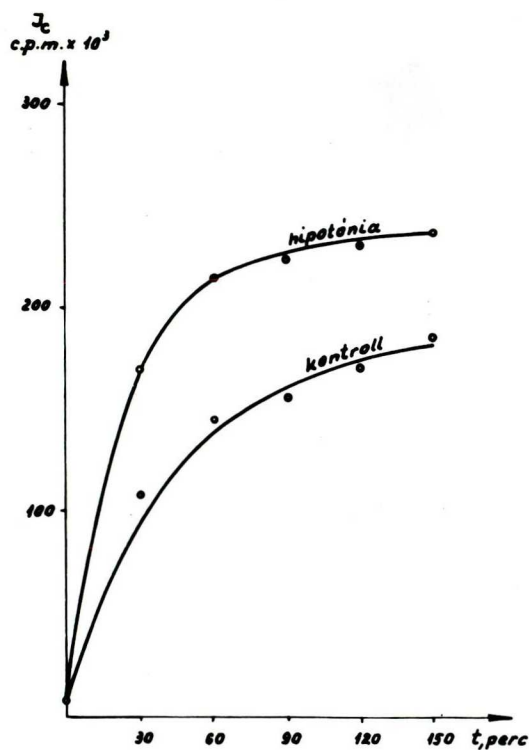


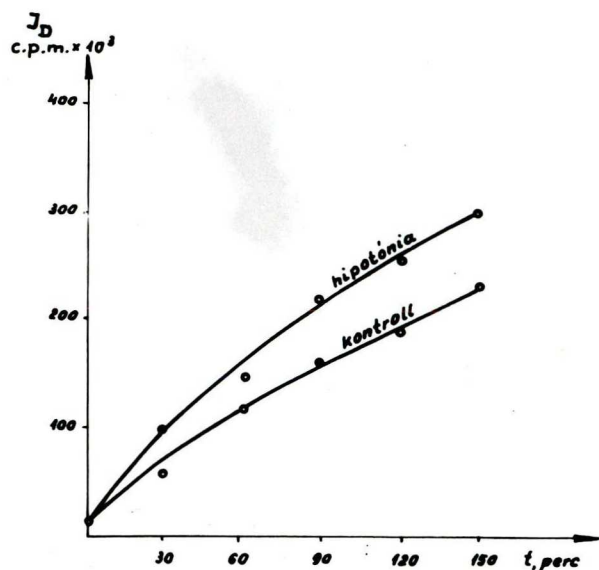
13.4. ábra.

Az intracelluláris anorganikus foszfát pool összaktivitásának időbeli változása hipotóniás és kontroll /izotóniás/ közegben.

13.5. ábra.

Az intracelluláris savlabil foszfát pool összaktivitásának időbeli változása hipotóniás és kontroll /izotóniás/ közegben.



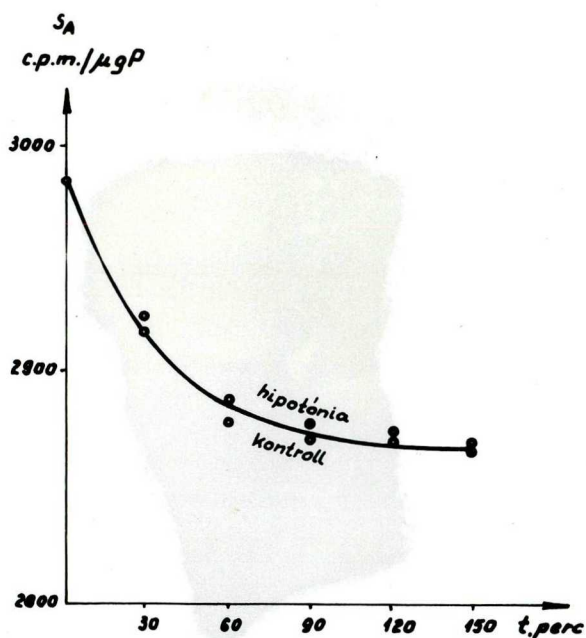


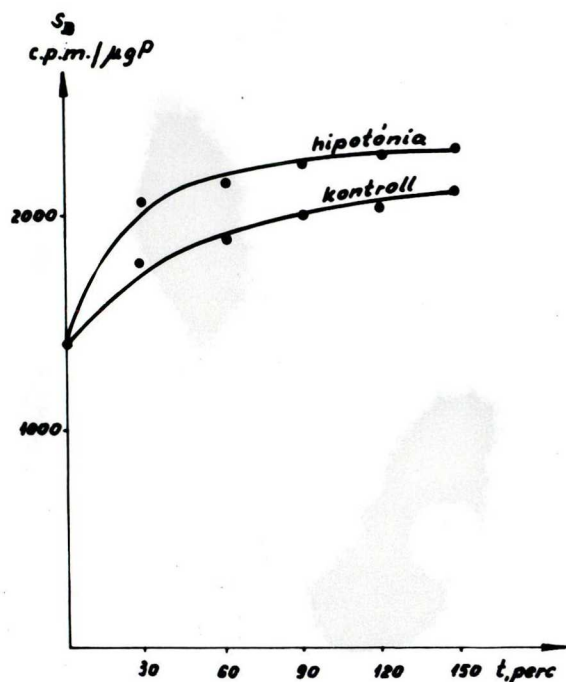
13.6. ábra.

Az intracelluláris sav-rezisztens foszfát pool összaktivitásának időbeli változása hipotóniás és kontroll /izotóniás/ közegben.

13.7. ábra.

Az extracelluláris anorganikus foszfát pool fajlagos aktivitásának időfüggése hipotóniás és kontroll /izotóniás/ közegben.



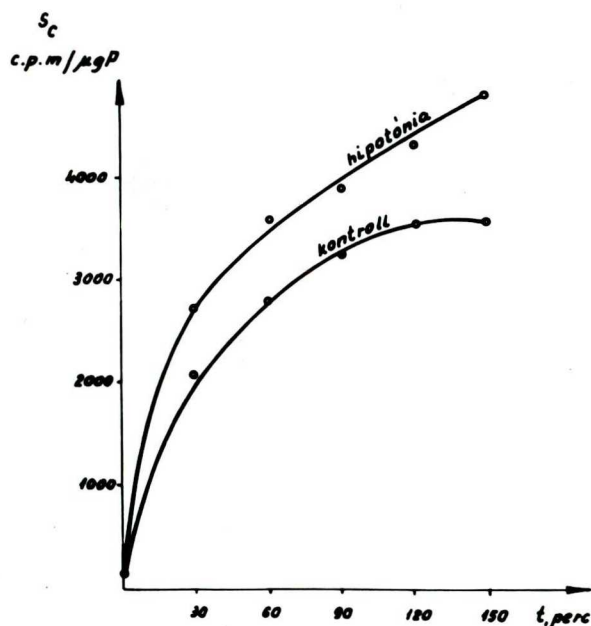


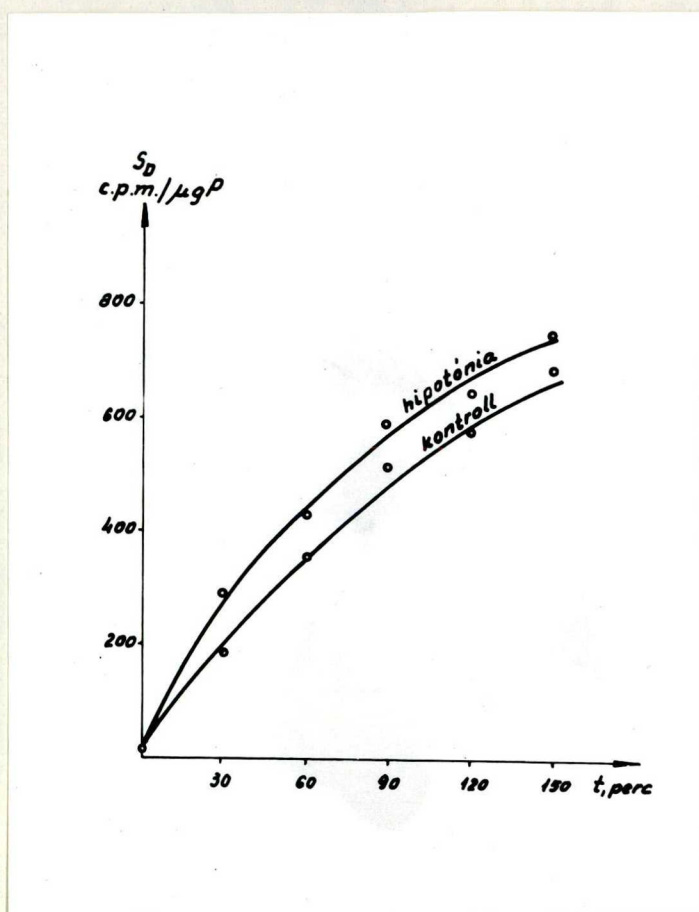
13.8. ábra.

Az intracelluláris anorganikus foszfát pool fajlagos aktivitásának időfüggése hipotóniás és kontroll /izotóniás/ közegben.

13.9. ábra.

Az intracelluláris savlabil foszfát pool fajlagos aktivitásának időfüggése hipotóniás és kontroll /izotóniás/ közegben.





13.10. ábra.

Az intracelluláris savrezisztens foszfát pool fajlagos aktivitásának időfüggése hipotóniás és kontroll /izotóniás/ közegben.

13.2. Fiziológiástól eltérő pH-ák alkalmazása

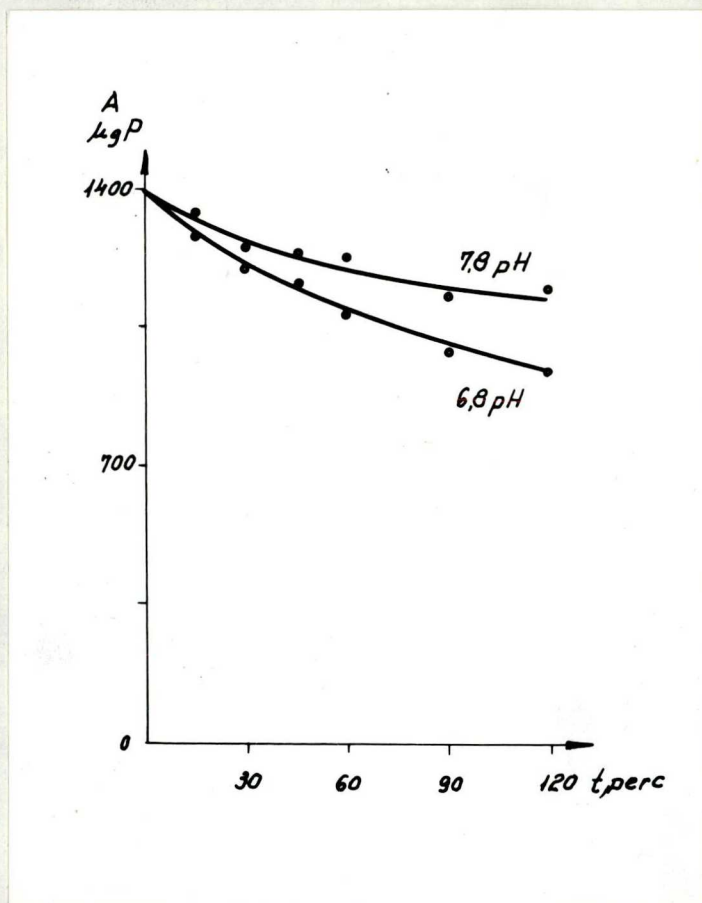
Ismeretes, hogy magasabb pH-nál a glikolitikus anyagcsere mértéke megnő, míg alacsonyabb pH-nél csökken /36./. Ugyanakkor azonban a pH csökkenése fokozza a passzív anion transzportot, tehát a foszfát transzportját is /30./.

Két fiziológiástól eltérő pH hatását vizsgáltuk, még pedig pontosan a 6,8 és 7,8 pH-ét.

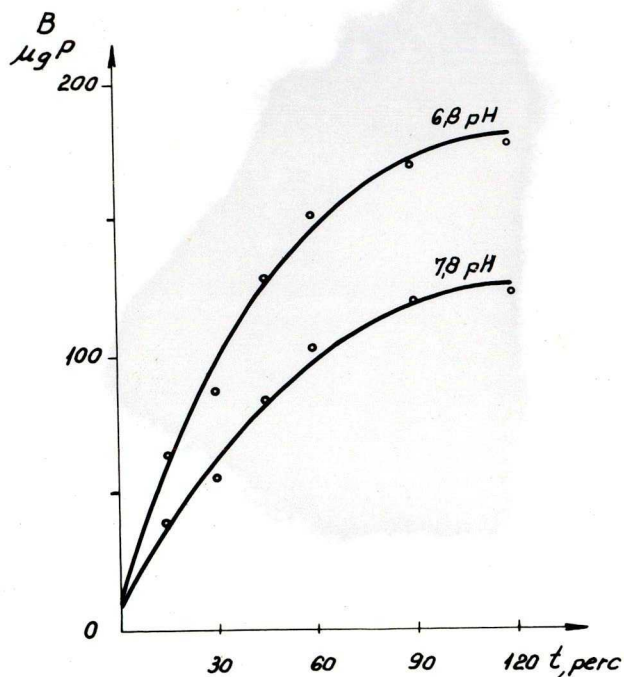
A 13.11., 13.12., 13.13. és 13.14 ábrák szemléltetik a négy foszfát pool mennyiségi változását időben. Látható, hogy 6,8 pH mellett az anorganikus foszfát transzport mértéke megnőtt, valamint a savlabil görbe alacso-

nyabban fut, mint 7,8 pH-nál. Ez utóbbit a glikolizis csökkenése okozza. A savrezisztens foszfát mennyisége nem változik különböző pH hatására.

Az összaktivitás és fajlagos aktivitás görbék azonos viszonyt mutatnak. A 13.16., 13.17., 13.20. és 13.21. ábrákon látható, hogy 6,8 pH-nál az intracelluláris anorganikus foszfát és savlabil foszfát összaktivitás és fajlagos aktivitás értékei magasabbak, mint 7,8 pH-án. A másik két poolra vonatkozó összaktivitás és fajlagos aktivitás értékek viszonya pedig fordított. /13.15., 13.18., 13.19., 13.22. ábra/.



13.11. ábra. Az extracelluláris anorganikus foszfát pool mennyiségének időbeli változása fiziológiástól eltérő pH-ák mellett.

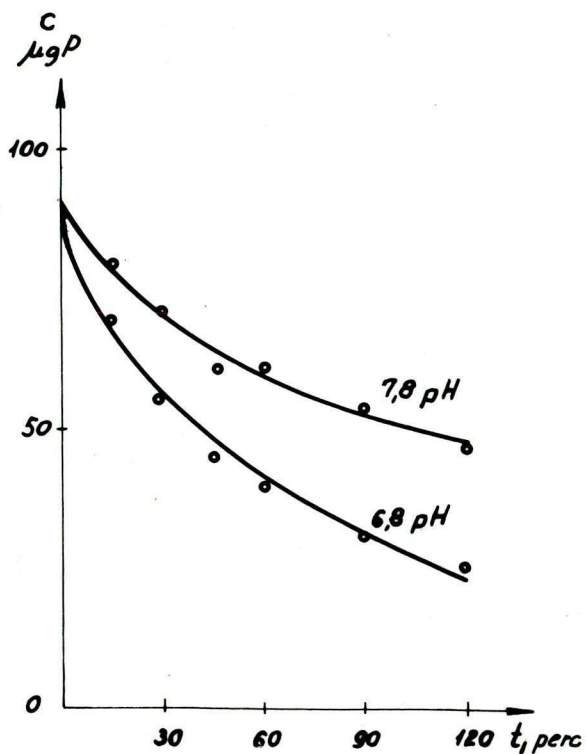


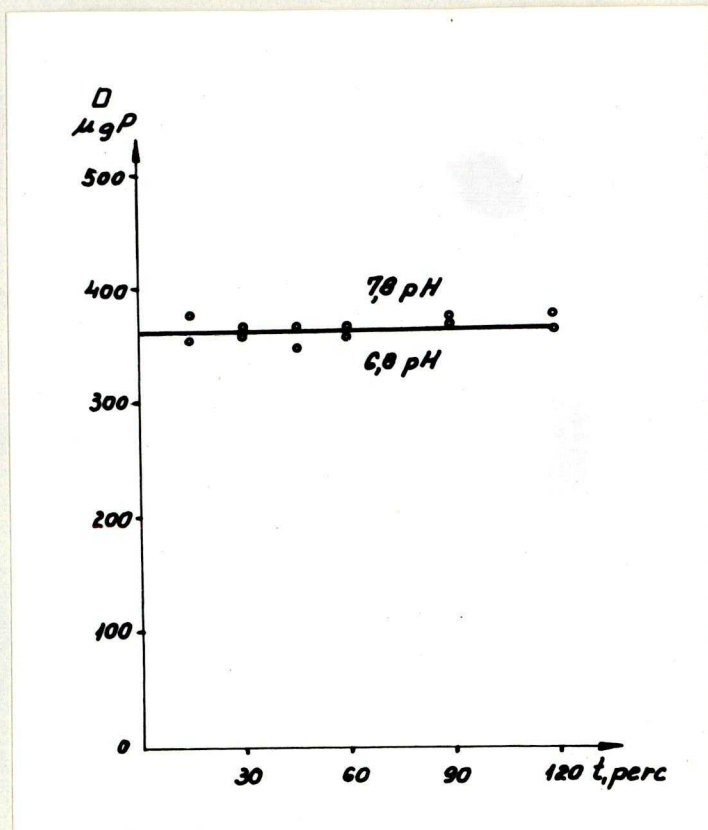
13.12. ábra.

Az intracelluláris anorganikus foszfát pool mennyiségének időbeli változása fiziológiástól eltérő pH-ák mellett.

13.13. ábra.

Az intracelluláris savlabil foszfát pool mennyiségének időbeli változása fiziológiástól eltérő pH-ák mellett.



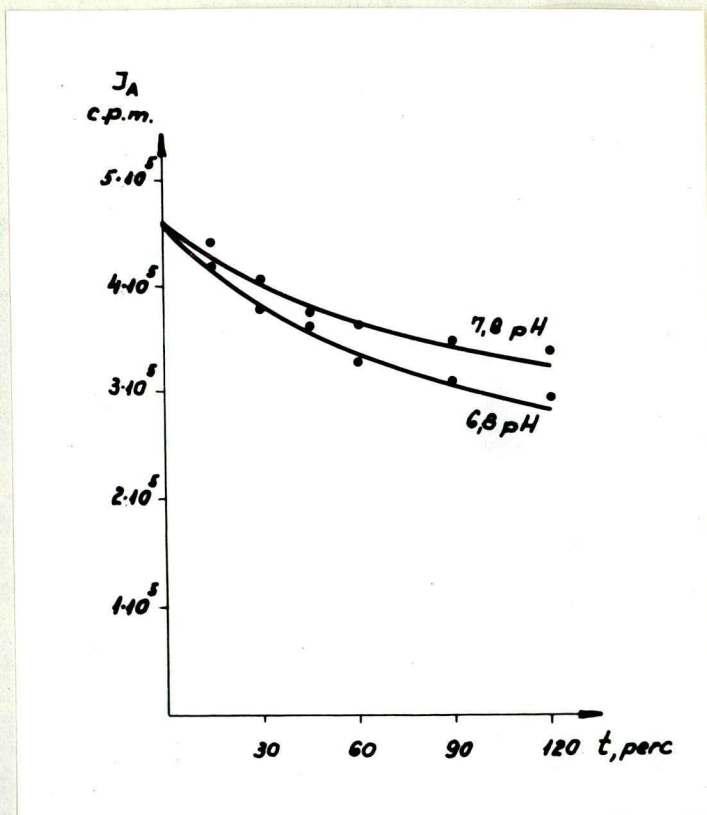


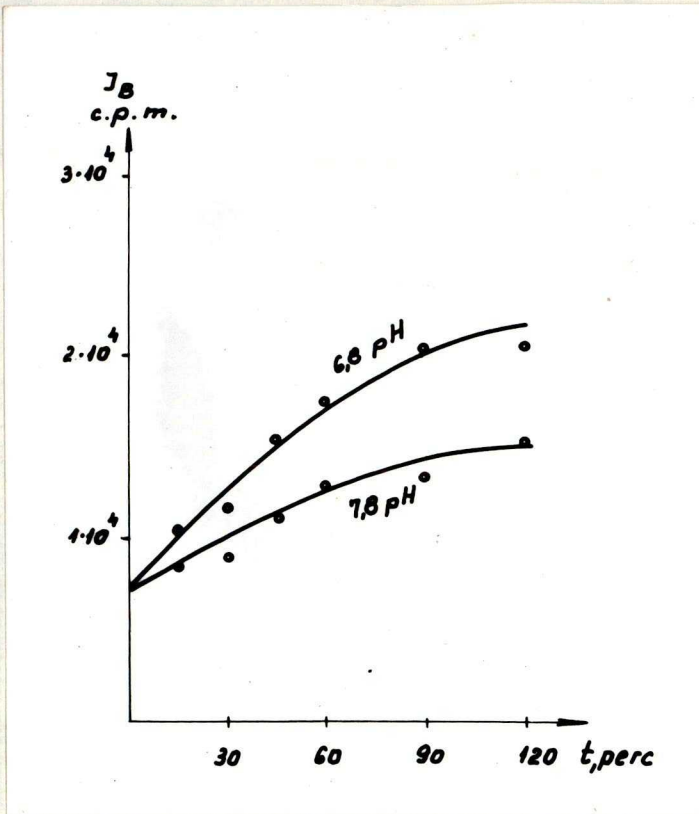
13.14. ábra.

Az intracelluláris savrezisztens foszfát pool mennyiségének időbeli változása fiziológiástól eltérő pH-ák mellett.

13.15. ábra.

Az extracelluláris anorganikus foszfát pool összaktivitásának időbeli változása fiziológiástól eltérő pH-ák mellett.



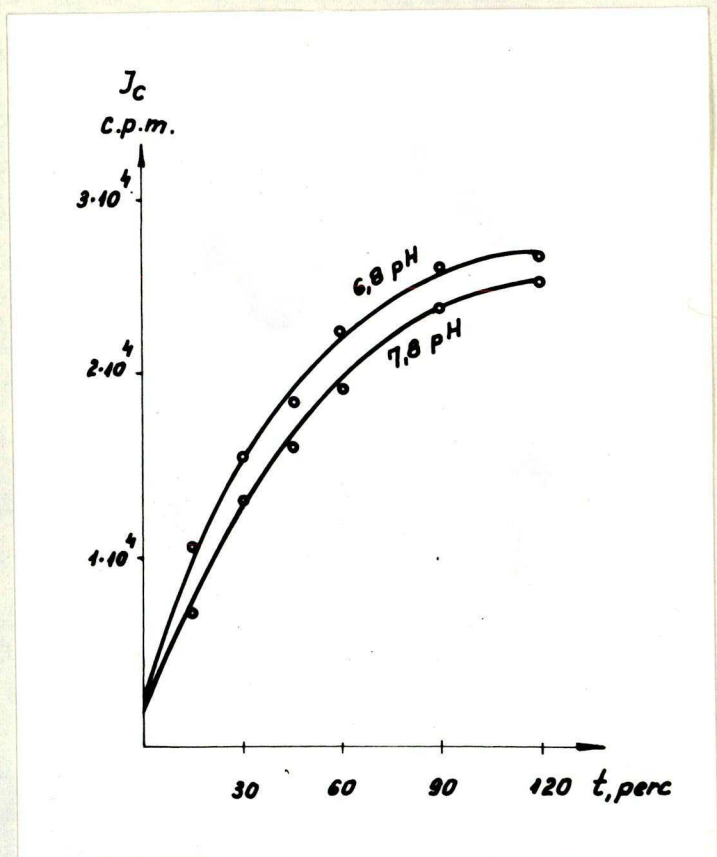


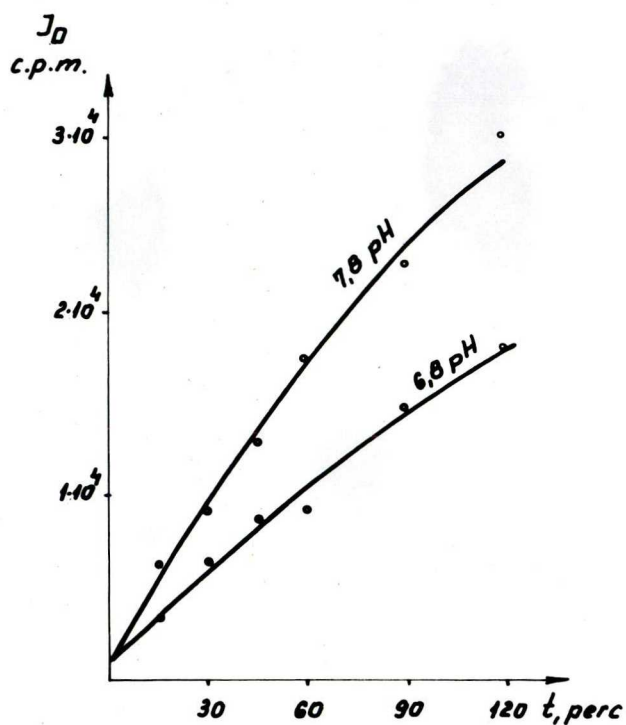
13.16. ábra.

Az intracelluláris anorganikus foszfát pool összaktivitásának időbeli változása fiziológiástól eltérő pH-ák mellett.

13.17. ábra.

Az intracelluláris savlabil foszfát pool összaktivitásának időbeli változása fiziológiástól eltérő pH-ák mellett.



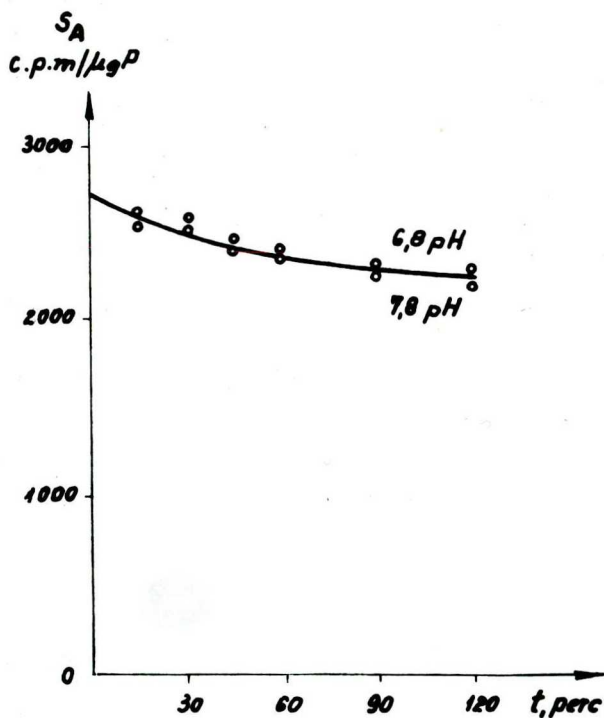


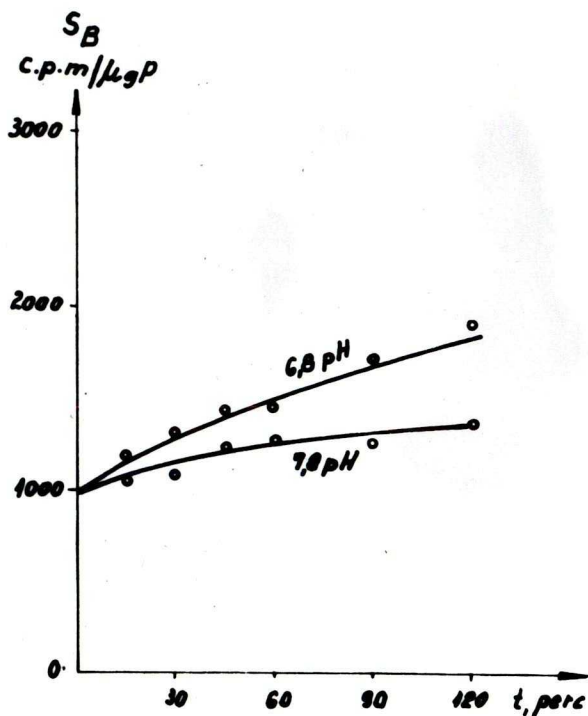
13.18. ábra.

Az intracelluláris sav-rezisztens foszfát pool összaktivitásának időbeli változása fiziológiástól eltérő pH-ák mellett.

13.19. ábra.

Az extracelluláris anorganikus foszfát pool fajlagos aktivitásának időfüggése fiziológiástól eltérő pH-ák mellett.



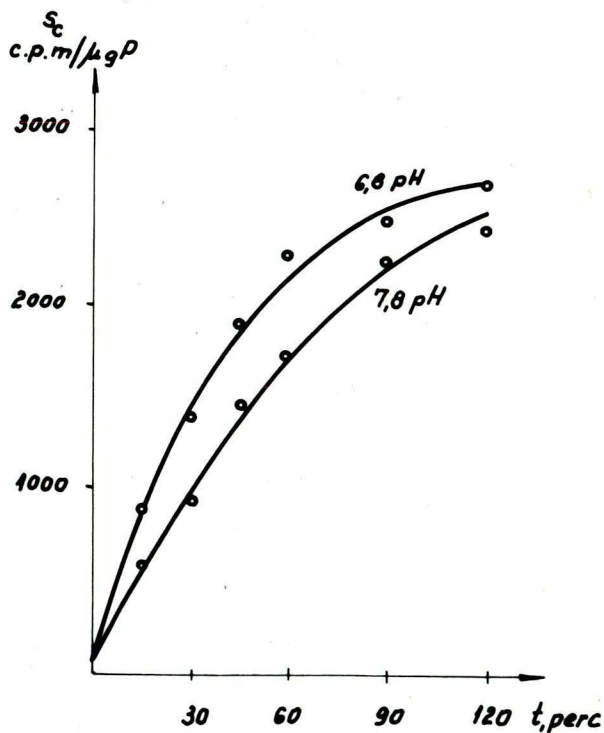


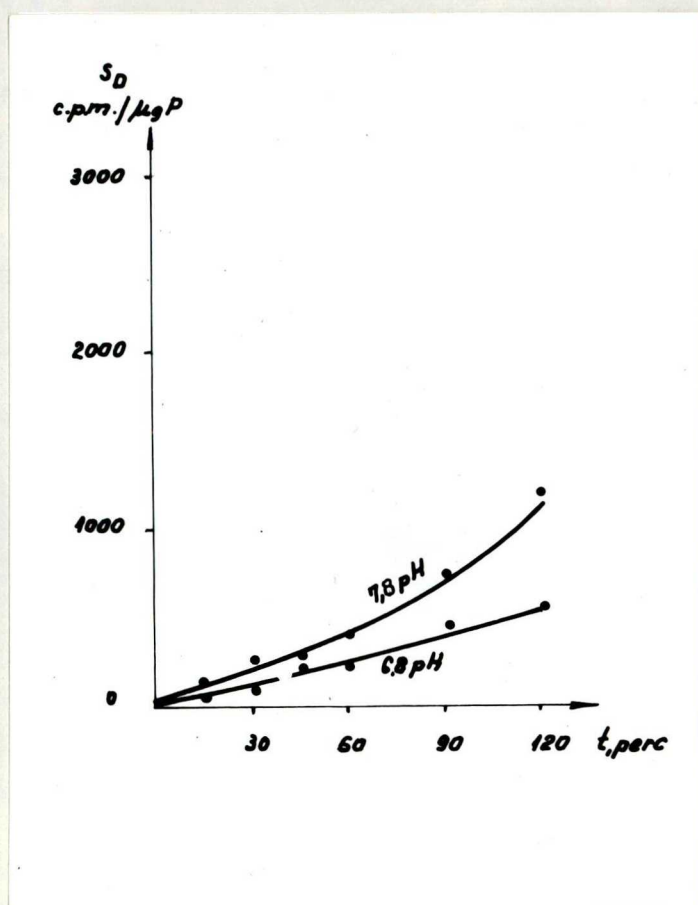
13.20. ábra.

Az intracelluláris anorganikus foszfát pool fajlagos aktivitásának időfüggése fiziológiástól eltérő pH-ák mellett.

13.21. ábra.

Az intracelluláris savlabil foszfát pool fajlagos aktivitásának időfüggése fiziológiástól eltérő pH-ák mellett.





13.22. ábra.

Az intracelluláris savrezisztens foszfát pool fajlagos aktivitásának időfüggése fiziológiástól eltérő pH-ák mellett.

13.3. Anyagcsere csökkentése glukóz megvonással

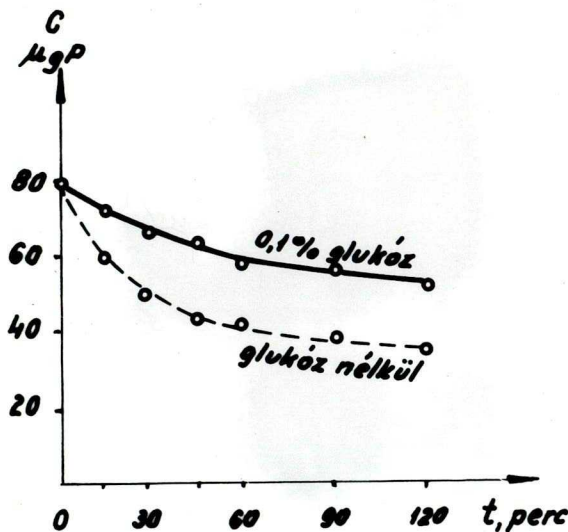
A savlabil foszfát csökkenés görbéjének exponenciális jellege bizonyíték arra, hogy nem a sejt anyagcsere romlásának eredménye az ATP bomlása. Ennek ellenére megnéztük, hogy az anyagcsere módosítása milyen hatást eredményez a savlabil pool változásaira. A szerzők többsége ilyen esetben anyagcsere inhibitorokat alkalmaz. Ezek hatásának megítélése vörösvértest esetében általában nem lehet egyértelmű, miután ezen anyagok nemcsak az anyagcserét befolyásolják, hanem még ismeretlen módon közvetlenül a membrán funkciókat is. Mi ezért a glu-

köz hatását vizsgáltuk. Kísérleteinkben glukóz mentes Krebs-Ringer foszfátot használtunk, és a kontroll 0,1 % glukóz tartalmu Krebs-Ringer foszfát volt.

A savlabil foszfát csökkenés görbéjének típusa gylu köz nélküli közeg hatására nem változott, csupán a kontroll-hoz képest kaptunk csökkenő értéket /13.23. ábra/.

A 13.24., 13.25., 13.26., és 13.27. ábrákon láthatók az összaktivitás görbék. A savlabil és a savrezisztens pool-ba inkorporálódó foszfát mennyisége csökkent. A másik két pool összaktivitás görbéi számottevően nem változtak.

A fajlagos aktivitás görbékre /13.28., 13.29., 13.30. 13.31. ábra/ az összaktivitás értékek alapján várható eredményt kaptuk, kivételt képez a savlabil pool /13.30. ábra/. A savlabil pool fajlagos aktivitása glukóz nélkül nagyobb,



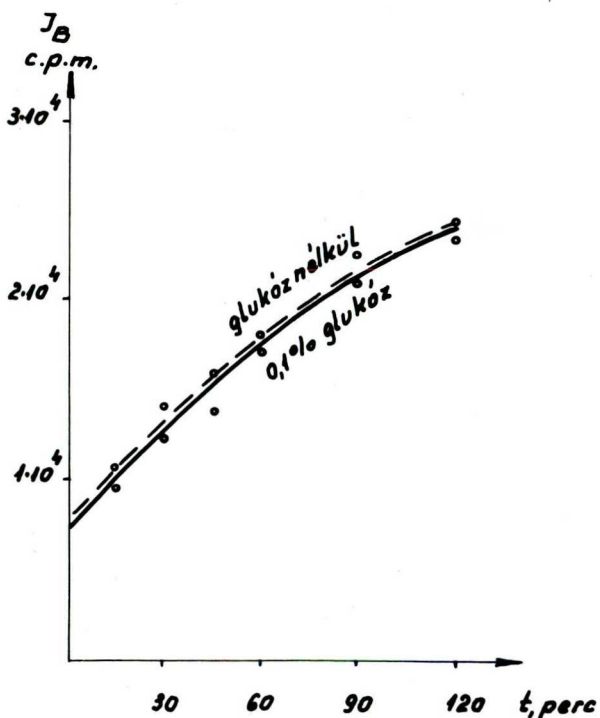
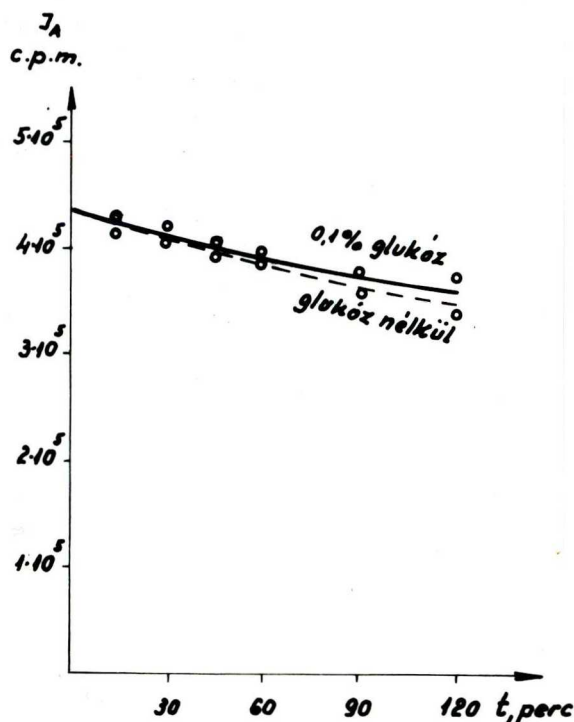
13.23. ábra

Az intracelluláris savlabil foszfát pool mennyiségének időbeli változása glukóz tartalmu és glukóz mentes közegben.

mint glukóz jelenlétében, valamint a glukóz nélküli görbe lényegesen meredekebb, mint a kontroll, annak ellenére, hogy a 13.26. ábra szerint az inkorporálódott mennyiség kisebb. Természetesen a savlabil foszfát mennyisége lényegesen gyorsabban csökken glukóz nélkül az inkubálás során.

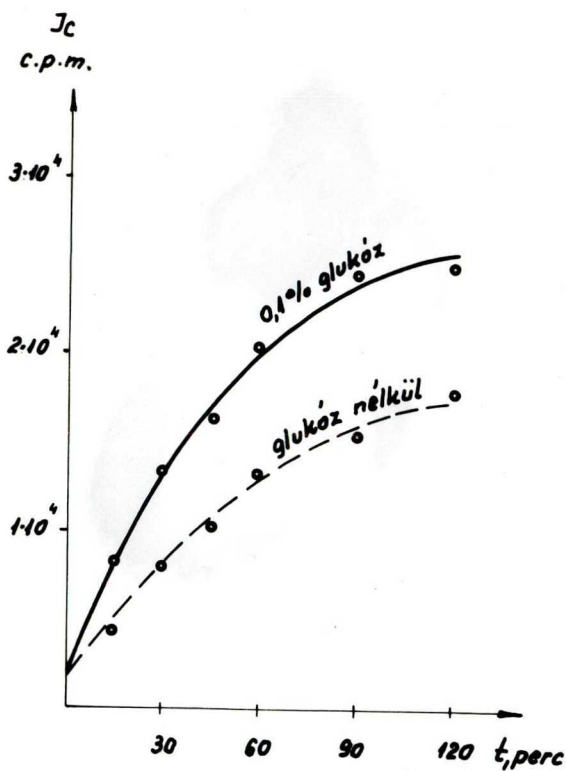
13.24. ábra.

Az extracelluláris anorganikus foszfát pool összaktivitásának időbeli változása glukóz tartalmu és glukózmentes közegben.



13.25. ábra.

Az intracelluláris anorganikus foszfát pool összaktivitásának időbeli változása glukóz tartalmu és glukózmentes közegben.

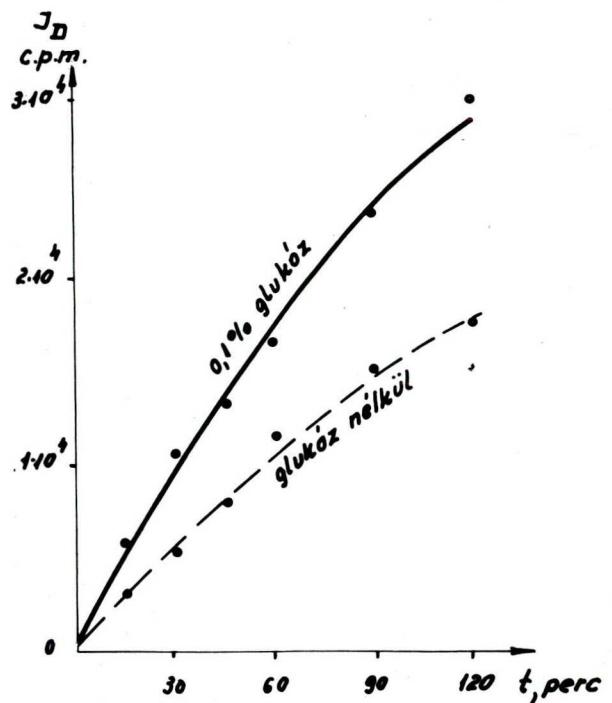


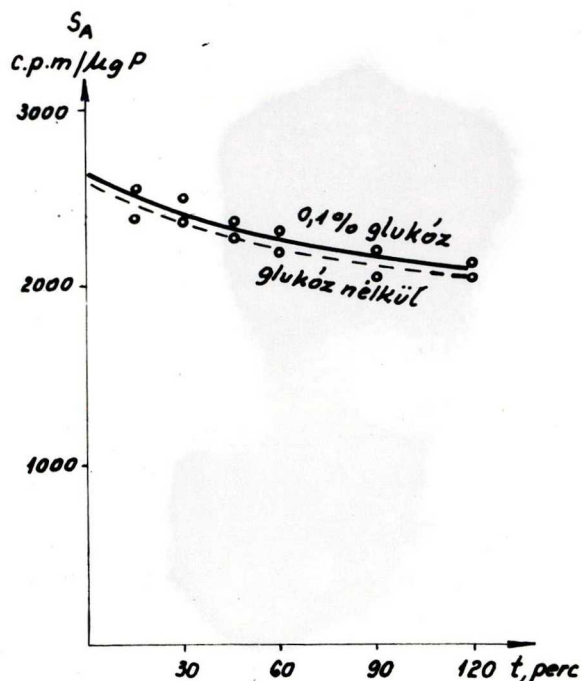
13.26. ábra

Az intracelluláris sav-labil foszfát pool összaktivitásának időbeli változása glukóz tartalmu és glukózmentes közegben.

13.27. ábra.

Az intracelluláris sav-rezisztens foszfát pool összaktivitásának időbeli változása glukóz tartalmu és glukózmentes közegben.



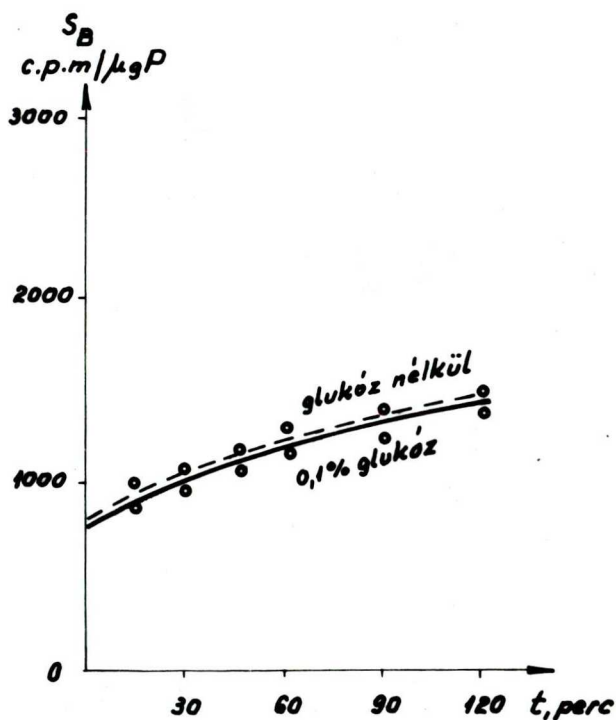


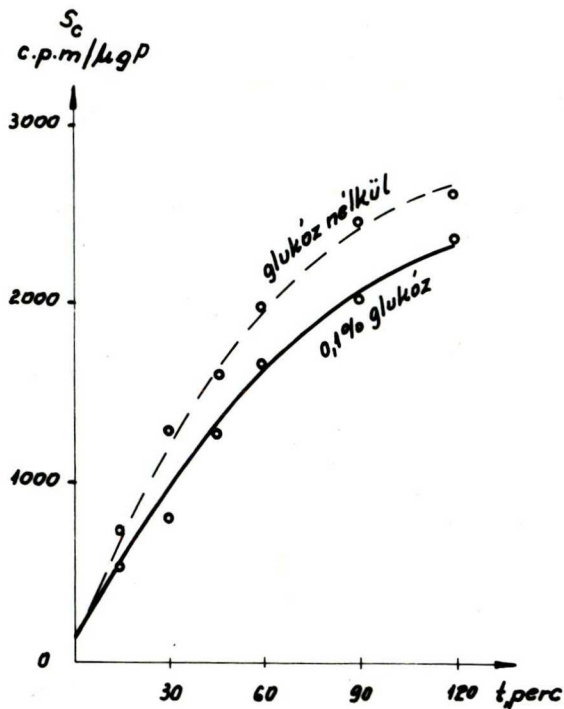
13.28. ábra.

Az extracelluláris anorganikus foszfát pool fajlagos aktivitásának időfüggése glukóz tartalmu és glukózmentes közegben.

13.29. ábra.

Az intracelluláris anorganikus foszfát pool fajlagos aktivitásának időfüggése glukóz tartalmu és glukózmentes közegben.



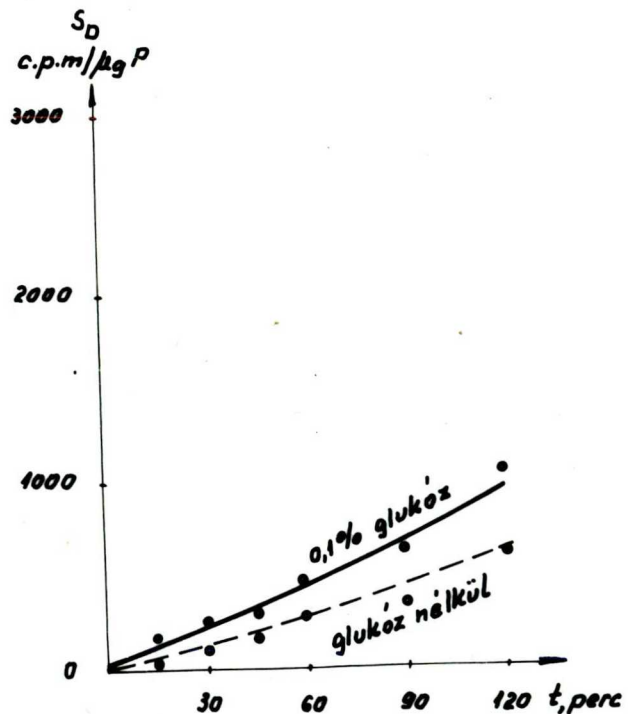


13.30. ábra.

Az intracelluláris savlabil foszfát pool fajlagos aktivitásának időfüggése glukóz tartalmu és glukózmentes közegben.

13.31. ábra.

Az intracelluláris savrezisztens foszfát pool fajlagos aktivitásának időfüggése glukóz tartalmu és glukózmentes közegben.



13.4. Citrát ion hatása

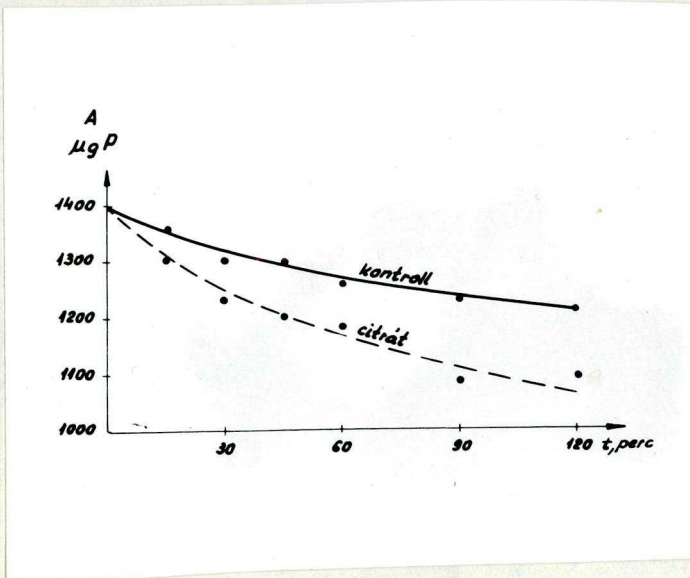
PASSOW, valamint GARBY megállapították vizsgálataik során, hogy a citrát ion egyáltalán, vagy alig penetrál a vörösvértestbe. A citrát ion nem befolyásolja a vörösvértest anyagcseréjét, de vizsgálataink során irodalmi adatokkal egyezően megfigyeltük, hogy fokozza a vörösvértestbe történő foszfát inkorporációt. Miután amint említettük, a citrát ion a sejtbe nem hatol be, és a sejt anyagcseréjét nem befolyásolja, így olyan hatással állunk szemben, mely csak a vörösvértest membránon jöhet létre.

A 13.32. és 13.33. ábrákon az extracelluláris és intracelluláris anorganikus foszfát mennyiségének időbeli változását ábrázoltuk. Az extracelluláris anorganikus foszfát gyorsabban csökken, az intracelluláris anorganikus foszfát gyorsabban nő a kontrollokhoz képest. Ez a foszfát transzport jelentős növekedését jelenti. Nem változik ugyan-akkor citrát ion hatására sem a savlabil, sem a savrezisztens foszfát mennyisége.

A 13.34. és 13.35. ábrák az extracelluláris és intracelluláris anorganikus foszfát poolok fajlagos aktivitásának időgörbéit mutatják. Mindkét pool esetében citrát ion hatására alacsonyabban futnak a fajlagos aktivitás görbék.

A 13.36. és 13.37. ábrákon a savlabil, illetve a savrezisztens foszfát pool fajlagos aktivitás görbéi láthatók. Citrát ion jelenlétében mindkét pool esetében magasabban

futnak a fajlagos aktivitás görbék az előbbi két poolal
ellentétben.

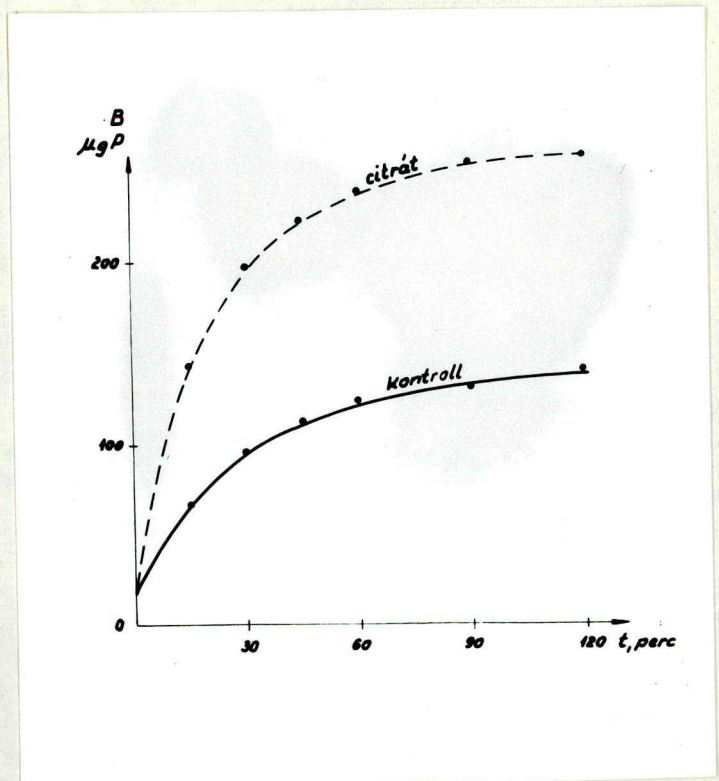


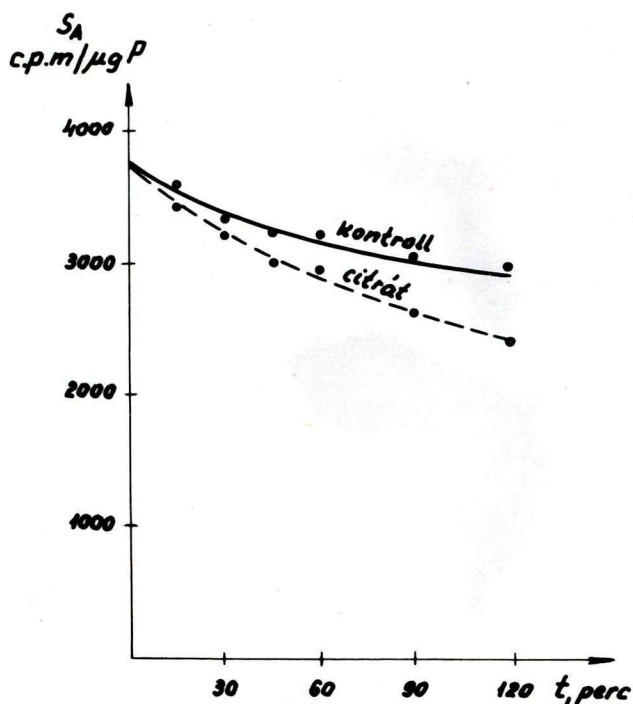
13.32. ábra.

Az extracelluláris an-
organikus foszfát pool
mennyiségének időbeli
változása citrát ion
jelenlétében és cit-
rát ion nélkül.

13.33. ábra.

Az intracelluláris
anorganikus foszfát
pool mennyiségének
időbeli változása
citrát ion jelenlé-
tében és citrát ion
nélkül.



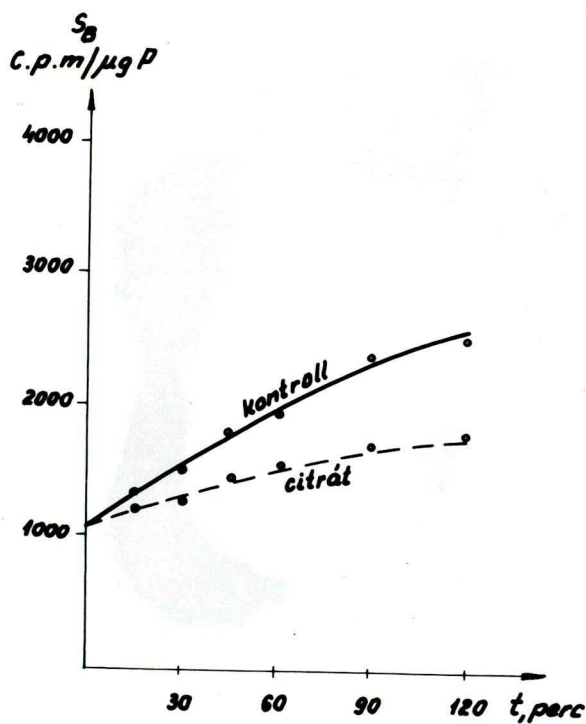


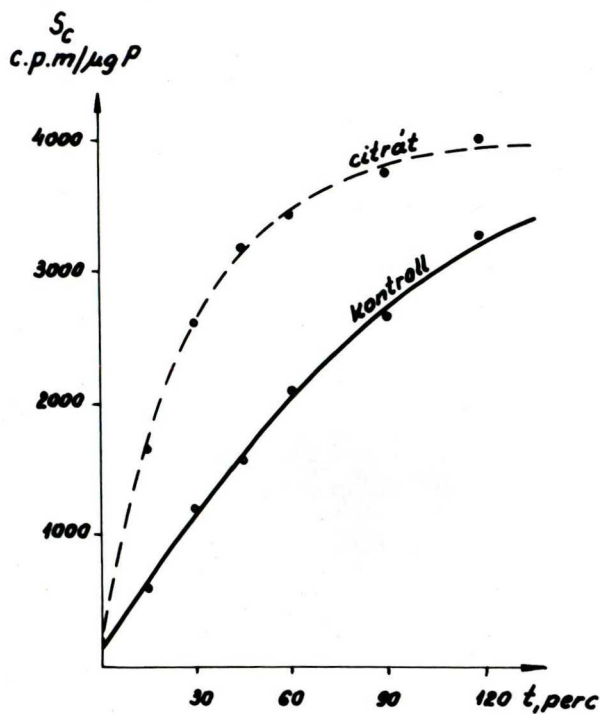
13.34. ábra

Az extracelluláris an-
organikus foszfát pool
fajlagos aktivitásának
időfüggése citrát ion
jelenlétében és citrát
ion nélkül.

13.35. ábra.

Az intracelluláris an-
organikus foszfát pool
fajlagos aktivitásának
időfüggése citrát ion
jelenlétében és citrát
ion nélkül.



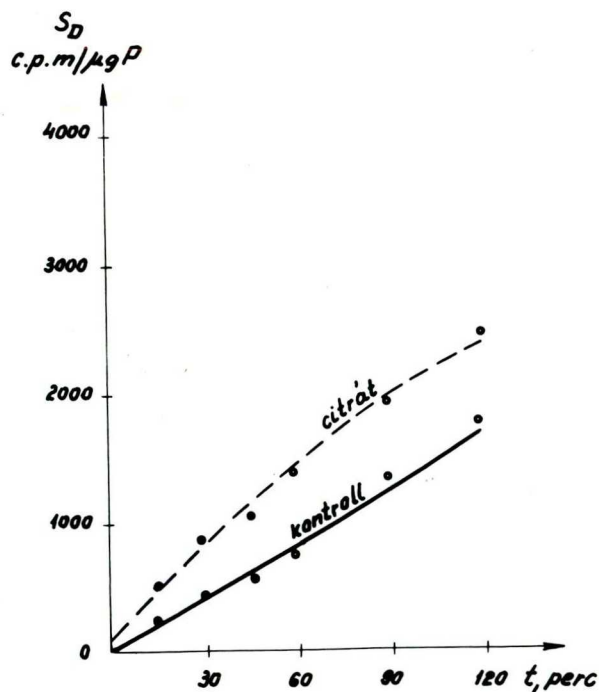


13.36. ábra.

Az intracelluláris sav-labil foszfát pool fajlagos aktivitásának időfüggése citrát ion jelenlétében és citrát ion nélkül.

13.37. ábra.

Az intracelluláris savrezisztens foszfát pool fajlagos aktivitásának időfüggése citrát ion jelenlétében és citrát ion nélkül.



14. Eredmények megbeszélése

Vizsgálataink során mindennek előtt az az észrevételünk adódott figyelemre méltónak, hogy a foszfát frakció változása a vizsgált rendszerben, elsősorban a savlabil pool változása igen jelentős ingadozást mutatott a különböző donoroktól származó vérek esetén. A 11. fejezetben definiált anyagmérleg vizsgálata azt mutatta, hogy ezen ingadozásokért a savlabil pool tehető felelőssé, és a többi poolok eltérései csupán ennek következményei az anyagmérleg által megszabott módon /11.1. egyenlet/. Összehasonlítva a 11.5. és 12. 1. ábrákat, még inkább szembetűnő hogy az általunk "tipusos"-ként kiválasztott variáns, melyben az ATP pool az inkubálás során csökken, és a konstans ATP poolt mutató variáns csupán az ATP fajlagos aktivitás görbékben mutat eltérést. Miután a két változat anyagcseréjében semmi eltérést nem találtunk, egyetlen magyarázatként fel kellett tételezni, hogy a különbségekért az intakt sejt valamilyen ATPáz aktivitása tehető felelőssé. Erre utal többek között azon megfigyelésünk is, hogy a sejtek kísérlet előtti tárolása nagymértékben befolyásolja az ATP pool viselkedését inkubálás során anélkül, hogy az anyagcsere bármiféle eltérést mutatna. A 11. fejezetben C $\rightarrow$ B "transzport"-ként definiált savlabil foszfát csökkenés kinetikája /11.3. egyenlet/ ugyancsak azt bizonyítja, hogy ezimaktivitás játszik szerepet. Miután az ATP bomlása egy specifikus folyamat, az intakt sejt

valamilyen ATPázának szerepét kell feltételeznünk. Arra vonatkozóan, hogy a különböző szerzők által leírt ATPázak közül melyik játszik szerepet, természetesen vizsgálataink nem adnak felvilágosítást /37., 38./. Azt kell azonban mondanunk, hogy rendszerünk tracer kinetikai analízise a foszfát transzport, kicserélődés és anyagcsere folyamatok egyidejű vizsgálata mellett lehetővé teszi, hogy információt nyerjünk az intakt sejt ATPáz aktivitására vonatkozóan.

A tracer kinetikai modellanalízis előnye rendszerünk esetében igen szépen demonstrálható. A kísérleteink során megfigyelt különböző variánsokat nem szükséges olymódon vizsgálni, hogy az analitikai adatokat statisztikusan átlagoljuk. Ilyen eljárás rendszerünk esetében helytelen lenne, miután az egyes variánsok között kvalitatív eltérések mutatkoznak. Lehetővé válik azonban az egyes variánsok külön történő elemzése teljesen egységes elv alapján, teljesen azonos módon. Ezért rendkívül sokat mondó az instabil és konstans variáns esetén nyert modellek összehasonlítása /11.6., 12.2. ábra/. A 11.6. ábrán látható, hogy az instabil ATP pool esetében a rendszerrel izomorf modell tartalmazza a $B \rightleftharpoons C$ kicserélődést a $C \rightarrow B$ "transzport" mellett. Ez a kicserélődéses kapcsolat kvantitativ jellemezheti az intakt sejt ATPáz aktivitását. A $C \rightleftharpoons B$ "transzport" ugyanis, mely az ATP pool csökkenésének bruttó értékét adja, az anyagcsere és ATPáz aktivitás mindenkor egyensúlyának az eredője. Jellegzetes módon a konstans variánsnál a $C \rightleftharpoons B$ kicserélődéses kapcsolat is megszűnik /12.2. ábra/. Az ezen a modellen fellépő $A \rightleftharpoons B$ kicserélődés arra

utal, hogy megszűnik a C pool befolyása B poolra. Ilyen módon a B pool szempontjából az A pool szerepe válik meghatározóvá. A kétféle variáns esetén nyert izomorf modellek összehasonlítása tehát lehetővé teszi, hogy az intakt sejt ATPáz aktivitását kvantitativ jellemezzük. Mai ismereteink mellett erről az enzimaktivitásról intakt sejtre vonatkozóan közvetlen adatokat nyerni nem lehetséges. Irodalmi adatok alapján azonban valószínű, hogy az ATP bomlás és a $C \rightleftharpoons B$ kicserélődés mechanizmusa más, noha mindkettő összefügg az ATPáz enzimaktivitással /39., 40./.

A vizsgált *in vitro* rendszerben az extracelluláris anorganikus foszfát mennyiségi változása megfelel annak az irodalomból jól ismert adatnak, hogy a foszfát ion penetrációja a vörösvértestbe passzív transzport útján történik /20., 24./. Ezzel teljes összhangban áll az $A \rightarrow B$ transzport leírására nyert 11.2. egyenlet. Az intracelluláris anorganikus foszfát pool gyors növekedéséhez az instabil ATP pool esetén természetesen az ATP bomlásból eredő foszfát is hozzájárul $C \rightarrow B$ "transzport"/. Az $A \rightarrow B$ transzportra vonatkozóan a kétféle típus között nem észleltünk eltérést.

A B pool esetében az aktivitás görbék menetét vizsgálva mindennek előtt feltűnik, hogy I_B és S_B egyaránt határozott kezdeti értékkel indul /11.4., 11.5., 12.1. ábra/. A B pool ezen kezdeti aktivitás értéke egy olyan folyamatra utal, amely a mosott vörösvérsejtek és a jelzett Krebs-Ringer foszfát oldat elegyítésének 1-2 perce során játszódik le alacsony hőmérsékleten. Az I_B és az S_A kezdeti értéke alapján megadható ezen folyamat által szállított fosz-

fát mennyisége, mely a kísérleteinkben $1-2 \mu\text{g P/ml}$ mossott vörösvérsejt nagyságúnak adódott. Ezen érték nem növekszik akkor sem, ha a kísérlet megkezdése előtt a sejtek hosszabb ideig érintkeznek alacsony hőmérsékleten a Krebs-Ringer foszfát oldattal. Ez a megfigyelés arra utal, hogy ez a gyors folyamat a kísérlet megkezdésekor már egyensúlyban van, így annak lefolyását nem befolyásolja. Ezt bizonyítja az a tény is, hogy izomorf modell konstruálásához nem kell figyelembe vennünk ezt a folyamatot. Ennek vizsgálatával nem foglalkoztunk.

Meglepő eredményre jutunk, ha a csökkenő savlabil, illetve ATP pool esetén nyert I_C és S_C görbék menetét hasonlítjuk össze /11.4., 11.5. ábra/. S_C a vizsgált időtartam nagyobb részén meredeken emelkedik, míg I_C görbéje a 45-60 perc után csupán igen lassan nő. A C pool fajlagos aktivitása tehát anélkül nő jelentős mértékben, hogy az összaktivitás hasonlóképpen növekedne. Ez a tény semmiképpen sem magyarázható az ATP turnover rate esetleges növekedésével, mert ez esetben az összaktivitás görbének is változnia kellene. A jelenség magyarázata egyetlen módon lehetséges, ha feltételezzük a C pool heterogenitását, ill. nevezetesen azt, hogy a $C \rightarrow B$ "transzport" a C pool valamely alacsony fajlagos aktivitású, vagy éppen "hideg" részéből ered. A savlabil pool azonban, amint már hangsúlyoztuk, vörösvértest esetében 80 %-ban ATP-ből áll. A kémiai heterogenitás tehát nem olyan jelentős mértékű, hogy magyarázhatná esetleges alacsony fajlagos aktivitá-

su, vagy éppenséggel "hideg" rejtett kompartment létezését a C poolon belül. Ezért fel kell tételezni, magának az ATP poolnak a heterogenitását. WELT-nek és munkatársainak adatai /41./, melyek szerint a vörösvértest ATP egy része a membránhoz kötődve külön poolt képez, igen jó összhangban állnak fenti feltételezésünkkel.

Az előbbiek alapján önként adódhat a kérdés, hogy az izomorf modell konstruálásánál miért nem igyekeztünk figyelembe venni a C pool rejtett heterogenitását is. Kísérleteink során azonban vizsgálódásunk egyik fontos alapelve a SOLOMON által a modellszerkesztés "gazdaságosság"-ára vonatkozóan megfogalmazott követelmény volt, amely előírja, hogy csupán annyi kompartmentből épüljön fel az izomorf modell, amennyi feltétlenül szükséges a rendszer leírásához, egy adott feladat megoldásához /8./. Miután négy kompartment segítségével tudunk konstruálni olyan modellt, amely kielégítően teljesítette az izomorfia feltételeit, tehát alkalmas kísérleteink leírására, a fenti elv értelmében szükségtelen és értelmetlen a leírásmód további bonyolítása. Ezen megállapításunkat úgy is fogalmazhatjuk, hogy a C pool heterogenitása a kísérleteink során vizsgált folyamatok szempontjából, a vizsgált időtartam nagy részére vonatkozóan nem meghatározó jelentőségű. Kézenfekvő ugyanis annak a feltételezése, hogy kísérleteink utolsó befejező szakaszán azért ad W_{AC} negatív sebesség értéket, tehát azért jutunk ellentmondáshoz, mert a C pool heterogenitása mint zavaró hatás kezd érvényesülni.

A standard ATP poolal rendelkező variáns esetében nyert I_C és S_C görbék /11.4, 12.1. ábra/ összehasonlítása ugyancsak azt a feltételezésünket támogatta, hogy létezik az ATP poolon belül egy rejtett kompartment. Ezen variánsnál ugyanis, ahol nincs $C \rightarrow B$ "transzport" az I_C és S_C görbék menete megegyezik, az S_C görbe meredek emelkedése /amelyik az instabil variánsnál figyelhető meg/ nem észlelhető. Az előzőek alapján ezt úgy tudjuk értelmezni, hogy a "hideg" rejtett kompartment nem bomlik le.

Az ATP poolon belül fennálló rejtett kompartment létezésének további igazolására megvizsgáltuk a kinetikus görbéket olyan körülmények között, amikor a vörösvértest anyagcsereje módosult. A glukóz nélkül végzett kísérletekben azt tapasztaltuk, hogy a szubsztrát hiányában az anyagcsere megszűnése az ATP szint gyorsabb csökkenését eredményezi a kontrollhoz viszonyítva /13.23. ábra/, evvel egyidejűleg pedig a C pool fajlagos aktivitás görbéjének meredekebb emelkedését /13.30. ábra/. Ugyanakkor nagyon feltűnő, hogy az összaktivitás görbe /13.26. ábra/ a csökkent anyagcsere eredményeként lényegesen alacsonyabban fut a kontrollnál. A glukóz nélkül végzett kísérletek tehát messzemenően alátámasztják az ATP poolon belüli rejtett kompartment létezését.

Teljesen azonos eredményre vezetnek az eltérő pH mellett végzett kísérleteink. Az alacsonyabb pH mellett csökkenő anyagcsere a C pool csökkenését /13.13. ábra/ eredményezi, ugyanakkor az S_B és S_C görbék a kontroll felett futnak /13.20. 13.21. ábra/. Alacsonyabb pH mellett

a megnövekvő foszfát transzport $A \rightarrow B$ eredményeként nagyobb lesz a sejtbe inkorporálódó összaktivitás is /13.15., 13.16. ábra/.

Az ATP polon belül is a rejtett kompartment létezésének további igazolására olyan effektusokat is megvizsgáltunk, amelyek a vörösvértest ATP szintet nem befolyásolják, azonban a passzív $A \rightarrow B$ transzport folyamat növeli az extracelluláris térből a sejtbe történő foszfát inkorporációt. Ez a két hatás a hipotóniás közeg és a citrát ion jelenléte. Amint a 13.1., 13.2., illetve 13.32., 13.33. ábrákból látható, mindkét effektus fokozza a foszfát transzportot a vörösvértest membránon keresztül. Ugyanakkor sem a hipotónia, sem a citrát ion jelenléte nem befolyásolja a savlabil foszfát szintjét. Bár az összaktivitás és fajlagos aktivitás görbék /13.5., 13.9., 13.36. ábra/, amint a fokozott inkorporáció miatt az várható, mind hipotónia esetén, mind citrát ion jelenlétében magasabban futnak és meredekebbek a kontrolloknál. Az I_C és S_C görbék divergenciája nem észlelhető.

Azt mondhatjuk tehát, hogy az I_C és S_C görbék divergenciája csak akkor jelentkezik, ha az ATPpool csökken. Ez a divergencia olyan viszonyok között kifejezettebb, amikor az ATP csökkenés gyorsabb.

A fiziológiástól eltérő kísérleteink tehát messzemenően igazolni látszanak a tracer kinetikai modell alapján tett feltevésünket az ATPpool rejtett kompartmentjére vonatkozóan. Ezen eredményünk azért érdekes, mert az irodalom jelenlegi álláspontja szerint a vörösvértest belső

szerkezet nélküli képződmény. Adataink arra utalnak, hogy ez a felfogási mód revízióra szorul még akkor is, ha ezt morfológiai adatok nem támasztják alá.

A 11.6. ábrán demonstrált modell birtokában megoldott-nak tekinthetjük célkitűzésünket: az $A \rightarrow B$ transzport, melyet a 11.2. formula ad meg, illetve a W_{AC} kicserélődési sebesség külön adják meg a sejtbe történő foszfát inkorporáció két típusát. Irodalmi adatok alapján /27., 42., 43./ nem meglepő, hogy a savlabil pool, azaz az ATP pool közvetlen kicserélődést folytat az extracelluláris anorganikus foszfáttal. Ezen kicserélődés minden valószínűség szerint a membrán állapotától függő folyamat. Az általunk megadott modell ugyanakkor lehetővé teszi, hogy az inkorporálódott foszfát sorsát a sejten belül is leírjuk. Bár a modell nem veszi figyelembe a foszfát anyagcsere minden egyes lépését a savoldható poolra vonatkozóan sem, a $B \rightleftharpoons D$ kicserélődés jól reprezentálja a glikolitikus ciklussal kapcsolatos foszfát anyagcserét. A $B \rightleftharpoons C$ kicserélődés amellet, hogy nyilvánvalóan anyagcsere folyamatokat is reprezentál, valószínűleg elsősorban ATPáz aktivitás által meghatározott. Erre utal a két pool között fennálló $C \rightarrow B$ "transzport" létezése. Modellünk birtokában tehát egzaktul le tudjuk írni a vörösvérsejtbe történő foszfát inkorporációt. A modellben szereplő sebesség értékek pontosabb fiziológiai értelmezése, megváltozásuk jelentőségének tisztázása, azonban természetesen még további beható vizsgálatokat igényel.

15. Irodalom

1/a. NEJMAN, M.B. és GÁL, D.:

A Kinetikus Izotóp Módszer és alkalmazásai, /1-9. fejezet/, Akadémiai Kiadó, Budapest, /1967/.

1/b. LATZKOVITS, L.:

"A Kinetikus Izotóp Módszer és alkalmazásai"-ban /NEJMAN, M.B. és GÁL, D./, Akadémiai Kiadó, Budapest, /1967/.

2. ROGINSZKIJ, Sz.E., SZEMENYENKO, E.I. és JANOVSZKIJ, N.I.: Dokl. AH CCCP 153, 183 /1963/.

3. BALANGYIN, A.A., BOGDANOVA, O.K. és CSEGLOVA, A.P.: Izv. AH CCCP Otd. him. nauk 1946, 497.

4. HAAG, W.O. és PINES, H.:

J. Amer. Chem. Soc. 82, 387 /1960/.

5. BROWER, D.M.:

J. Catalysis 1, 22 /1962/.

6. BEREZIN, I.V., GYENYISZOV, E.T. és EMÁNUEL, H.M.:

Ciklohexán oxidációja, Izd-vo MGY, Moszkva, /1962/.

7. MINACSEV, H.M., MARKOV, M.A. és SUKINA, O.K.:

Nyeftehimija 1, 489 /1961/.

8. SOLOMON, A.K.:

"Mineral Metabolism"-ban /COMAR, C.L. és BRONNER, F./, Akadémiai Kiadó, New York, /1960/, I. kötet A. 119.

9. ARONOFF, S.:

Techniques of Radiobiochemistry, Iowa State University Press, /1960/.

10. ZILVERSMIT, D.B., ENTENMAN, C. és FISHLER, M.C.:

J. Gen. Physiol. 26, 325 /1943/.

11. REINER, J. R.:
Arch. Biochem. Biophys. 46, 53, 80 /1953/.
12. BRANSON, H.:
"Künstliche Radioaktive Isotope in Physiologie,
Diagnostik und Therapie"-ban /SCHMEISER, K./ Springer-
Verlag, Berlin, /1961/, I. kötet 596.
13. BROWNELL, G.L., BERMAN, M. és ROBERTSON, J.S.:
J. Appl. Rad. 19, 249 /1968/.
14. BERMAN, M.:
"Computer in Biomedical Research"-ban /STACY, R. és
WAXMAN, B./, Akadémiai Kiadó, New York, /1965/.
15. GOROGYISZKAJA, G.J., NEJMAN, M.B., RIBAKOVA, Sz. I.
és SNOL, R.B.:
Dokl. AH OSCP 69, 833 /1949/.
16. WISE, E.M. Jr. és ELWYN, D.:
J. Biol. Chem. 240, 1537 /1965/.
17. GÁL, D. és VÁGÓ, T.É.:
Zbl. Bakt. Parasitenkunde 111, 546 /1958/.
18. BISHOP, C. és SURGENOR, D.M.:
The red blood cell, Akadémiai Kiadó, New York, /1964/.
19. HINSBERG, K. és LANG, K.:
Medizinische Chemie für den klinischen und theoreti-
schen Gebrauch, Urban und Schwarzenberg, München
/1951/, 52.
20. GÁRDOS, Gy.:
MTA Biol. tudományok Osztályának közleményei XI. kötet
3-4. sz. 179. Akadémiai Kiadó, Budapest, /1968./.
21. SOMOGYI, J.:
MTA Biol. tudományok Osztályának közleményei XI. kötet

- 3-4.sz. 239. Akadémiai Kiadó, Budapest, /1968/.
22. PRANKERD, T.A.J. és ALTMAN, K.I.:
Biochem. J. 58, 622 /1954/.
23. GERLACH, E., FLECKENSTEIN, A. és GROSS, E.:
Arch. Ges. Physiol. 266, 528 /1958/.
24. VESTEGAARD-BOGIND, B.:
Biochim. Biophys. Acta 66, 93 /1963/.
25. GLADER, B.E. és OMACHI, A.:
Biochim. Biophys. Acta 163, I /1968/.
26. STANLEY, L.S.:
J. Lab. Clin. Med. 75, 422 /1970/.
27. SCHAUER, R. és HILLMANN, G.:
Z. Physiol. Chem 325, 9 /1961/.
28. IATZKOVITS, L., HUSZÁK, I. és SZÉCHENYI, F.:
Brain 89, 831 /1966/.
29. MARTYN, J.B. és DOTY, D.M.:
Anal. Chem., Wasington, 21, 965 /1949/.
30. PFLEGER, K. és SEIFEN, E.:
Biochem, Z. 335, 595 /1962/.
31. DOMONKOS, J. és HEINER, L.:
J. Neurochem. 15, 93 /1968/.
32. BERGMEYER, H.U.:
Methods of enzymatic analysis, Akadémiai Kiadó,
New York és London, /1963/, 563.
33. STREHLER, B.L. és TOTTER, J.R.:
Arch. Biochem. Biophys. 40, 28 /1952/.
34. BARKER, S.B. és SUMNERSON, W.H.:
J. Biol. Chem. 138, 535 /1941/.

35. SCHRAM, E.:
Organic Scintillation Detectors, Elsevier /1963/.
36. WHITTAM, R., AGER, M.A. és WILEY, J.S.:
Nature 202, 1111 /1964/.
37. GÁRDOS, G., SZÁSZ, J. és ÁRKY, J.:
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 2, 3 /1967/.
38. SZÁSZ, J. ÁRKY, J. és GÁRDOS, G.:
Folia Haematologica 89, 501 /1968/.
39. SUGINO, Y. és MIYOSHI, Y.:
J. Biol. Chem 239, 2360 /1964/.
40. BAUER, G.C.H., CARLSSON, A. és LINDQUIST, B.:
"Mineral Metabolism"-ban /COMAR, C.L. és BRONNER, F./,
Akadémiai Kiadó, New York, /1961/, I. kötet B. 610.
41. WELT, L.G., MC MANUS, T.J., TOSTESON, D.C. és WRIGHT,
T.O.:
18th Annual Meeting, Society of General Physiologists,
Woods Hole, Sept. 4-7, /1963/.
42. BARTLETT, G.R.:
Ann. N.Y. Acad. Sci. 75, 110 /1958/.
43. GOURLEY, D.R.H.:
Arch. Biochem. 40, 1 /1952/.

Ez uton szeretném megköszönni Dr. Huszák István egyetemi tanárnak, hogy intézetében lehetővé tette számomra a kísérletek elvégzését. Továbbá köszönetet szeretnék mondani Dr. Sirokmán Ferenc tanszékvezető egyetemi docensnek, hogy munkámat figyelemmel kísérte, valamint Dr. Latzkovits László egyetemi adjunktusnak, hogy témát adott és annak kidolgozásában segítségemre volt. Végül itt szeretném még megköszönni Fajszi Csaba tudományos munkatársnak a számítógépes program elkészítését, és Mihályfi Dezsőné műszaki rajzolónak az ábrák gondos kivitelezését.

