



Diplomamunka

Intracelluláris Ca^{2+} -dinamika vizsgálata

Szabó Anett

Témavezető: dr. Tóth János
docens
Budapesti Műszaki és
Gazdaságtudományi Egyetem
Matematika Intézet
Analízis Tanszék

BME
2010

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	2
2. A sejt mint kompartmentek (rekeszek) rendszere	3
3. A citoszolikus Ca^{2+}-koncentráció szabályozása	4
4. Ca^{2+}-oszcilláció	6
4.1. Ca^{2+} -oszcilláció a kísérletező szemszögéből	6
4.1.1. Az oszcilláció mechanizmusa	7
4.2. Az oszcilláció matematikai modellezése	10
4.2.1. Determinisztikus modellek	11
5. Két gyakran idézett modell	14
5.1. De Young és Keizer modellje	14
5.2. Determinisztikus Li-Rinzel modell	19
6. Matematikai háttér	22
6.1. Autonóm egyenletek, dinamikai rendszerek	22
6.2. Stabilitáselmélet, bifurkációk	25
7. A determinisztikus Li–Rinzel modell	27
7.1. Egyensúlyi pontok	27
7.2. Periodikus pályák	35
7.2.1. Hogyan változik az oszcilláció frekvenciája és amplitúdója a paraméter függvényében?	39
8. A Ca^{2+}-oszcilláció szerepe az ovuláció szabályozásában	41
8.1. Biológiai háttér	41
8.2. A módosított modell	43
8.2.1. Az egyenletrendszer	43
8.2.2. IP_3 -pulzus	44
8.2.3. Következtetések	44
9. Összegzés	47
10. Függelék	49
10.0.4. Sztochasztikus modellek	49
10.0.5. Ca^{2+} -hullámok	50

1. Bevezetés

A sejten belüli Ca^{2+} -koncentrációban bekövetkező változások számos élettani folyamatot szabályoznak, így például a génexpressziót, a sejtciklust, a kemotaxist, a mirigysejtek szekréciós aktivitását és a szinaptikus ingerületátvivő anyagok (neurotranszmitterek) felszabadulását. A sejtek ingerlése hormonokkal vagy neurotranszmitterekkel a citoszolikus Ca^{2+} -koncentráció oszcillálásához vezet, ami nagyon változó lehet a frekvencia, amplitúdó és térbeli terjedés szempontjából. Ebben a változatosságban rejlik az oszcilláció információtartalma a különböző jelátviteli folyamatokban. Így, ha sikerül meghatároznunk egy-egy adott modellben ezeket a jellemzőket, lehetőségünk nyílik a kívánt módon befolyásolni a fent említett mechanizmusokat.

A kémiai és biológiai folyamatok viselkedését igen gyakran differenciálegyenletek, differenciálegyenlet-rendszerek segítségével szokás leírni, melyekben szereplő paramétereket mérési adatok szolgáltatják. Az ily módon kapott dinamikai rendszerek kvalitatív vizsgálata lehetővé teszi, hogy figyelemmel kísérjük, hogyan reagál az adott (pl. biológiai) rendszer viselkedése egy (vagy akár több) paraméter változtatására.

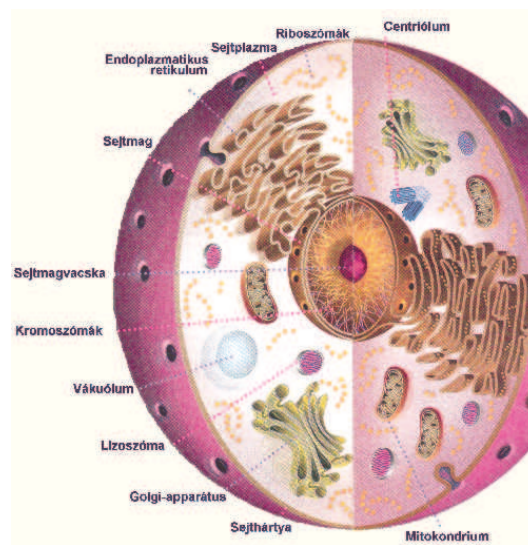
A dolgozatban különböző folyóiratokban bemutatott modelleket elemeztem. A munka jelentős részét ezen *modellek* és a folyamatok *biológiai hátterének felkutatása* és *rendszerezése* képezte. A *számolásokat* saját elgondolásaim alapján kiviteleztem.

Az alábbi célkitűzések vezéreltek:

- betekintést nyújtani az **intracelluláris Ca^{2+} -homeosztázisba**, különös hangsúlyt fektetve a dolgozatban tárgyalt modellek szempontjából fontos aspektusokra, valamint összefoglaló képet adni a citoszolikus Ca^{2+} -**oszcilláció mechanizmusáról és jelenleg ismeretes modelljeiről**,
- a Ca^{2+} -oszcilláció **két** gyakran idézett és számos újabb **modell** kiindulópontjaként szolgáló modelljét **szimbolikusan és numerikusan tárgyalni**, melyben különös fontossága lesz a paraméter (pl. hormon-koncentráció) változására bekövetkező kvalitatív változásoknak,
- végül pedig, egy konkrét élettani folyamat (a Ca^{2+} -oszcillációnak az emberi menstruációs ciklus szabályozásában betöltött szerepe) kapcsán rávilágítani a **tárgyalt mechanizmusok alkalmazási jelentőségére**.

2. A sejt mint kompartmentek (rekeszek) rendszere

Az élő sejteket az ún. sejtmembrán (vagy plazmamembrán) határolja, amely elválasztja és egyben össze is köti a sejten belüli (intracelluláris) teret a sejten kívüli környezettel, az ún. extracelluláris térrel. A sejten belüli teret a sejtmag körül a sejtplazma (citoplazma) tölti ki, amely két részből áll: a citoszolból, mely vízben oldott szerves és szervetlen anyagokból épül fel és a citogélből, amelyben az enzimek és a sejtvázas fehérjék rendezetten helyezkednek el. A citoplazmában találhatóak a különböző sejtalkotók (sejtorganellek), melyeket szintén membrán határol, elválasztva belsejüket a citoszoltól. Egy ilyen sejtalkotó az endoplazmás retikulum (ER), mely a legkiterjedtebb membránrendszer az intracelluláris térben (1. ábra).



1. ábra. A sejt felépítése. A sejtplazmában látható a kiterjedt membránrendszerrel rendelkező endoplazmás retikulum.

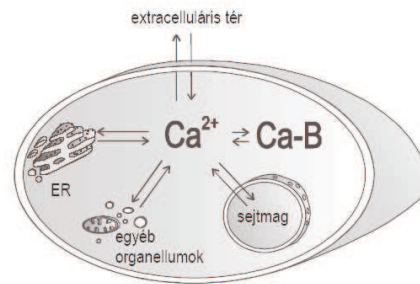
Az említett membránok szelektíven átjárhatóak a különböző vegyületek számára, ezáltal képesek szabályozni, hogy mi léphet be a sejtbe, illetve a sejtorganelumba, és mi hagyhatja el azt. Ez vonatkozik a különböző ionokra, többek között a Ca^{2+} ionra is.

3. A citoszolikus Ca^{2+} -koncentráció szabályozása

A Ca^{2+} ionok a sejtek működéséhez elengedhetetlenek, az egyes, membránnal határolt kompartmentek közötti áramlásuk az alapja a sejten belüli jelátviteli folyamatoknak. A legszélesebb körben alkalmazott intracelluláris másodlagos hírvivők. A koncentrációjukban bekövetkező változások számos élettani folyamatot szabályoznak, így például a génextpressziót, a sejtciklust, a kemotaxist, a mirigysejtek szekréciós aktivitását és a szinaptikus ingerületátvivő anyagok (neurotranszmitterek) felszabadulását.

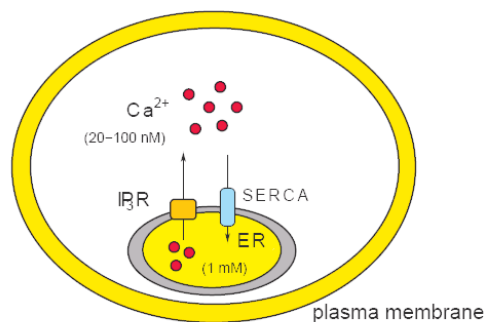
Ismert, hogy a tartósan magas Ca^{2+} -koncentráció sejtkárosodáshoz, illetve sejtpuszuláshoz vezet, ezért nagyon fontos, hogy a sejtek korlátozni tudják az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció növekedésének mértékét. A citoplazma szabad Ca^{2+} -koncentrációját az ott található Ca^{2+} -kötő molekulák (ún. kalciumpufferek) és a plazmát határoló membránok Ca^{2+} szállító fehérjéi szabályozzák (2.ábra). Ezen szabályozás eredményeként a citoszol szabad Ca^{2+} -koncentrációja a sejtek nagy részében 50 és 200 nM között van. Ez a koncentráció egy-két nagyságrenddel alacsonyabb mind az extracelluláris tér ($\sim 1\text{mM}$), mind pedig a sejten belüli sejtorganellumok (pl. ER-ban $>1\text{mM}$) Ca^{2+} -koncentrációjánál, a szabályozáshoz tehát nagyon hatékony rendszerek szükségesek. Ilyen koncentrációviszonyok mellett a citoszol Ca^{2+} -szintjének emelése leggazdaságosabban ioncsatornákon keresztül érhető el, csökkentése pedig aktív Ca^{2+} -transzporterek segítségével történhet.

Ca^{2+} elsősorban az extracelluláris térből és az endoplazmatikus hálózatból, vagy annak specializált részeiből áramlik be (2.ábra). Ez utóbbi képezi emlős sejtekben a gyorsan reagáló Ca^{2+} -raktárat, mely a citoszol Ca^{2+} -koncentrációjának szabályozott, gyors változtatásaiért felelős.



2. ábra. A sejt Ca^{2+} -háztartásának vázlata. A citoplazma kapcsolatban áll az extracelluláris térrel és a különböző sejtalkotókkal, melyek közül az endoplazmás retikulum (ER) bír a legnagyobb jelentőséggel a Ca^{2+} szempontjából. A citoszol Ca^{2+} -koncentrációját a plazmamembrán, illetve ezen sejtalkotók membránjainak ioncsatornáit és a Ca^{2+} -kötő molekulák szabályozzák (Ca-B: Ca^{2+} és Ca^{2+} -kötő molekula komplexe).

Az endoplazmás retikulum esetében a fent említett aktív Ca^{2+} -transzporter az endoplazmás retikulum Ca^{2+} -pumpája (SERCA, sacro(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase), melyen keresztül a Ca^{2+} -t ATP-igényes aktív transzport segítségével felveszi, majd bizonyos (pl. hormonális, lásd később) ingerek hatására a Ca^{2+} az ún. Ca^{2+} -release csatornákon keresztül felszabadul, ezzel növelve a citoszol Ca^{2+} -koncentrációját (3. ábra). Ezek a release csatornák két különböző családba sorolhatók, elnevezésük pedig az őket aktiváló másodlagos hírvivő (IP_3 : inozitol-1,4,5-trifoszfát) illetve a hozzájuk kötődő növényi alkaloida (rianodin) alapján rendre IP_3 receptor (IP_3R), illetve rianodin receptor (RyR). A dolgozatban bemutatott modellek az IP_3R működésére fókuszálnak.



3. ábra. Az ER membránján keresztüli Ca^{2+} -áramlás vázlata. Az ER-ből a Ca^{2+} a sejt szervecske membránjában található IP_3R -on (csatornán) keresztül szabadul fel, ezzel növelve a citoszol Ca^{2+} -koncentrációját. A kiáramlott Ca^{2+} -t az ER Ca^{2+} -pumpája szállítja vissza annak belsejébe, ezzel újra feltöltve a raktárat.

4. Ca^{2+} -oszcilláció

4.1. Ca^{2+} -oszcilláció a kísérletező szemszögéből

Ahhoz, hogy a Ca^{2+} önmagában több folyamatot tudjon egymástól függetlenül szabályozni, szükséges, hogy az egyes specifikus jeleket ne pusztán a Ca^{2+} -szint kódolja, hanem annak térbeli és időbeli változása is információt hordozzon.

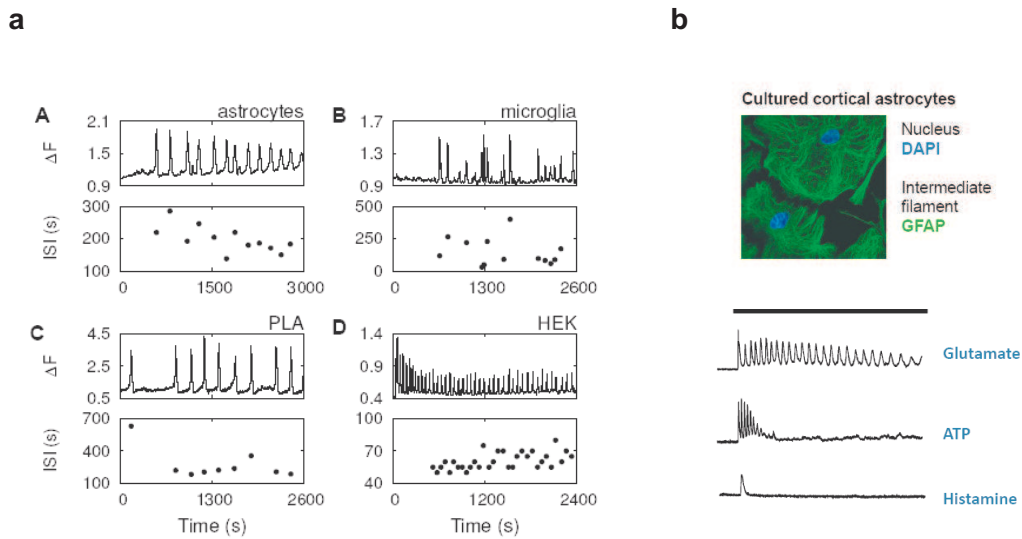
Az élő szervezetek az egyensúlytól távol működő nyitott termodinamikai rendszerek, működésükhöz nagyfokú rendezettség kialakítása és fenntartása szükséges. Az időbeli rendezettség elérésének egyik legkézenfekvőbb módja a sejteknek vagy azok csoportjainak szinkronizált működtetése. Az élő szervezetekre ezért általánosan jellemzőek a ritmikus folyamatok.

Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció több sejtben időbeli periodikusságot mutat, oszcillál. A jelenséget kezdetben a periodikus összehúzódásokat produkáló izomsejtekben és a neuronokban ismerték, mígnem a nyolcvanas évek közepén nem-ingerlékeny sejtekben is felfedezték, így például a fertilizáció kapcsán petesejtekben is. Bár a Ca^{2+} szabályozó szerepe már régóta ismert, az 1980-as évek elejéig nem állt rendelkezésre megfelelő módszer kisméretű egyedi sejtek citoplazmatikus Ca^{2+} -szintjének megbízható és reprodukálható mérésére. Ezért a különböző hatásokra a sejt szintjén bekövetkező változásoknak kinetikáját csak ezután lehetett felderíteni.

A köztudatba elsőként Woods és munkatársai [Woods et al., 1986] 1986-ban, a Nature-ben közölt megfigyelései vonultak be, valójában azonban már néhány évvel korábban is megjelentek hasonló közlemények [Cutherson, Cobbold, 1985], [Ueda et al., 1983], az első már 1980-ban [O'Doherty et al., 1980] (melynek szerzői szabadkoznak is a számukra is hihetetlen megfigyelés miatt). 1986 után sorozatosan jelentek meg különböző sejtekben lejátszódó Ca^{2+} -oszcillációkról szóló beszámolók, majd az oszcillációk biokémiai mechanizmusának felderítése is elkezdődött.

4.1.1. Az oszcilláció mechanizmusa

Bár Ca^{2+} -oszcillációkat mára már nagyon sok sejtben leírtak, szinte nem találhatunk két olyan sejtípust, melyben azok jellemzői (pl. frekvencia, amplitúdó) megegyeznének (4a.ábra). Sőt, ugyanazon sejt különböző ingerlésre különböző típusú oszcillációval válaszol (4b.ábra).

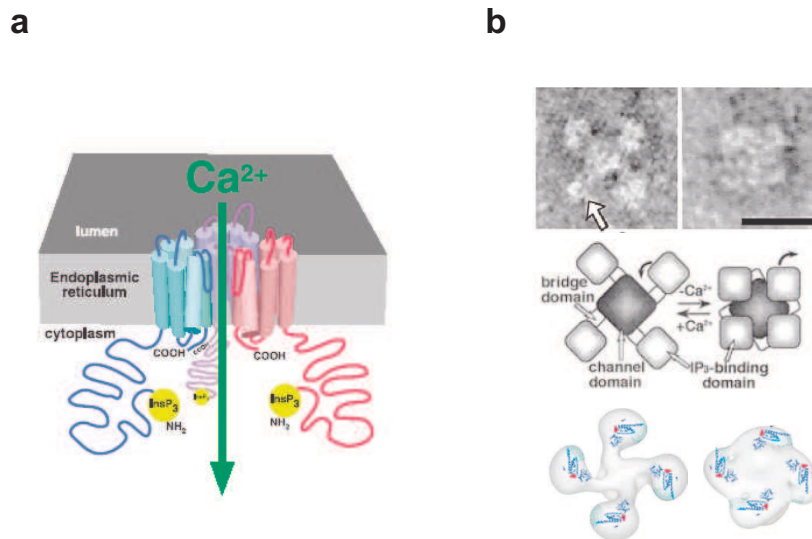


4. ábra. Az oszcilláció jellemzői. a: Különböző típusú sejtek különböző jellemzőkkel rendelkező oszcillációval válaszolnak ugyanazon ingerlésre. A felső paneleken a fluoreszcens Ca^{2+} -jel látható, az alsókon az egyes Ca^{2+} -tüskék között eltelt időintervallumok hossza (ISI). b: Az astrocyta a különböző anyagokkal történő ingerlésre (glutamát, ATP, hisztamin), különböző jellegű oszcillációval válaszol.

Ez is mutatja, hogy mennyire komplex mechanizmussal állunk szemben, melynek felderítése azonban elengedhetetlen az ismétlődő Ca^{2+} -jeleket alkalmazó jelátviteli út működési rendellenességeinek orvoslásához. A folyamat bonyolultságából és a vizsgálandó rendszer sérülékenységből adódóan azonban ennek a jelenségnek a molekuláris háttere még koránt sincs feltárva.

A legtöbb sejtípustban az oszcillációkban feltételezhetően az IP_3R játszik kulcsfontosságú szerepet. Ennek mind az IP_3 , mind a Ca^{2+} általi szabályozása nagyon bonyolultnak tűnik, aminek molekuláris részletei még nincsenek kellően tisztázva.

Az IP_3R -ok nagy (~ 1200 kDa), homotetramer (négy azonos alegységgel rendelkező) szerkezetű fehérjék. Az egyes alegységek négy transzmembrán doménből állnak, köztük egy, a citoplazmába nyúló amino-terminális doménnel és egy, a karboxi-terminális végen elhelyezkedő, hat darab membránt átérő régióból álló integrális Ca^{2+} -csatornával (5a. ábra). Három izoformájuk ismert, mindhárom érzékeny Ca^{2+} -ra és IP_3 -ra. Az IP_3 amino-terminális véghez való bekötődése egyes feltételezések szerint konformációváltozást okoz a fehérjében, melynek következtében Ca^{2+} -kötő hely alakul ki annak felszínén. Ha ide Ca^{2+} kötődik, kinyílik a csatorna (5. ábra).



5. ábra. Az IP_3R (csatorna). a: Az ábrán az IP_3R négy molekulája közül három látható (különböző színekben), középen IP_3 -csatornát alkotva. b: A csatorna nyitása. Az IP_3 bekötődése által okozott konformációváltozás következtében Ca^{2+} -kötő hely alakul ki a csatorna felszínén. Ha ide Ca^{2+} kötődik kinyílik a csatorna (kialakul a receptor ún. szélmalom formája).

Bár IP_3 szükséges a csatorna-nyitáshoz, az IP_3R -k aktiválása összetett folyamat, és a nyitás valószínűsége függ a környező Ca^{2+} -koncentrációtól. Az IP_3R -on végzett kísérletek szerint, az oszcilláció kialakulásában szerepet játszhat a receptor Ca^{2+} -nal való gátlása is. Kb. 500 nM-os értékig a Ca^{2+} az IP_3 -mal együttműködve aktiválja az IP_3R -t, míg magasabb koncentráció esetén a Ca^{2+} gátolja a csatorna nyitását. Feltételezhető ezek alapján, hogy a receptor rendelkezik egy másik Ca^{2+} -kötőhellyel is, amelyhez kötődő Ca^{2+} a csatorna inaktiválódását okozza ([Bezprozvanny et al., 1991], [Finch et al., 1991], [Moraru et al., 1999], [Parker, Ivorra, 1990], [Ino, 1990]).

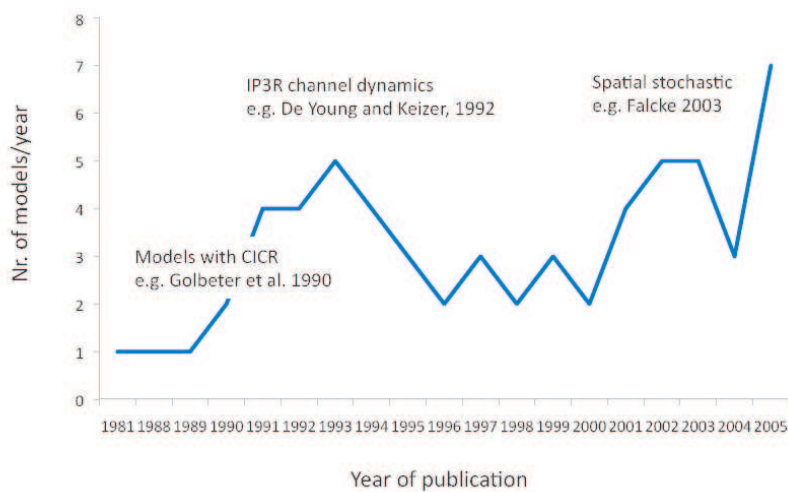
Az intracelluláris oszcillációnak mára ez az ún. „ IP_3 -függő Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} felszabadulás” az egyik legelfogadottabb modelleje. Ennek alapja tehát az a kísérleti megfigyelés, hogy az IP_3R -t a Ca^{2+} mind aktiválni mind pedig inaktiválni képes. A modell szerint az oszcilláció lefutása a következő. Külső (kémiai) inger hatására megnő a citoplazma IP_3 -koncentrációja. Mivel az IP_3 viszonylag gyorsan kötődik az IP_3R -hoz, az IP_3 -t kötött receptorok száma viszonylag gyorsan beáll egy egyensúlyi értékre. Ezek a receptorok már aktiválhatóak, egy kis részükhöz már a nyugalmi állapotban kis koncentrációban jelen lévő Ca^{2+} -ok is tudnak kötődni, ezáltal a csatornák nyitását eredményezik. Így az endoplazmatikus retikulumból lassú Ca^{2+} -áramlás indul meg, mely kezdetben a citoszol szabad Ca^{2+} -szintjének lassú emelkedését okozza (mivel a 3.1 fejezetben említett pumpák visszashállítják a Ca^{2+} -k egy részét az ER-ba, illetve egy részüket megkötik a citoplazmában található fehérjék, az ún. kalciumpufferek), majd ez a lassú emelkedés újabb receptorok nyitását eredményezi. Ez tehát egy öngerősítő folyamat, amely addig tart, amíg a Ca^{2+} -k a gátló helyekre is bekötődnek. Ekkor bezárulnak a csatornák, nem áramlik több Ca^{2+} a citoszolba és mivel onnan a 3.1 pontban említett aktív Ca^{2+} -transzporterek folyamatosan eltávolítják a Ca^{2+} -t, annak szintje ott csökkenni kezd. Az inaktiválódott receptorokról a Ca^{2+} disszociál, ami szintén lassú folyamat, így a Ca^{2+} -szint átmenetileg az egyensúlyi érték alá süllyed. Miután a Ca^{2+} disszociált a gátló helyről, a receptor újra aktiválható lesz, így indulhat az újabb ciklus.

Mindez tehát azt jelenti, hogy az IP_3 által kiváltott Ca^{2+} -felszabadulás kezdetben egy pozitív visszacsatolást indukál (CICR, Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release), majd ezt, miután a citoszolikus Ca^{2+} -koncentráció eléri a néhány száz nanomólos értéket, negatív visszacsatolás követi.

Ezt a mechanizmust először De Young és Keizer [DeYoung, Keizer, 1992] írta fel matematikai formában.

4.2. Az oszcilláció matematikai modellezése

A kísérleti tapasztalatokat már a nyolcvanas évek elején próbálták matematikai modellekkel leírni (6.ábra). A CICR jelensége több, mint 20 éve ismert, a kezdeti modellek ezen mechanizmus egyszerűbb leírásával próbálkoztak. Az igazi áttörést a kilencvenes évek elején De Young és Keizer modellje [DeYoung, Keizer, 1992] jelentette, melyet ennek számos egyszerűsített változata követett, többek között Li és Rinzel által [Li, Rinzel, 1994], ezt a későbbiekben részletesen bemutatjuk.

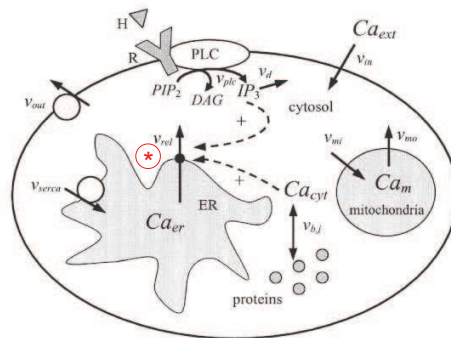


6. ábra. Az egyes években megjelent új modellek száma. 2005 után a korábbiaknál is több, elsősorban sztochasztikus modellt alkottak.

Egy matematikai modellel szemben alapvető elvárás, hogy legyen annyira egyszerű, amennyire lehet és annyira komplex, amennyire szükséges. Ca^{2+} -oszcilláció modellezése során két fontos tényezőről nem szabad megfeledkeznünk:

- Minden sejttípus különböző. Az oszcilláció háttérében álló mechanizmus sejttípusonként eltérő lehet és általában az is. Mégis, sok hasonlóság is felfedezhető, ezért általánosításokra is lehetőségünk van. Óvatosan.
- Viszonylag egyszerű feladat olyan egyenletrendszereket felírni, amelyek oszcillációt produkálnak. Szintén nem nehéz a modellt addig módosítani, amíg az adatokra hasonlítani fog. Sokkal nehezebb azonban a modell segítségével valami újat, érdekeset mondani az oszcilláció alapját képező élettani folyamatokról.

A Ca^{2+} -oszilláció modelljei a már ismertetett, sejtben lezajló alapvető áramlási folyamatokra (7.ábra), kísérleti úton megfigyelt mechanizmusokra építenek. A 3.1 fejezetben leírtakat összefoglalva: a citoplazma kapcsolatban áll az extraceluláris térrel és a különféle sejtalkotókkal, melyek közül az endoplazmás retikulum az egyik legjelentősebb a Ca^{2+} szempontjából. Az áramlási folyamatok közül itt az endoplazmás retikulumból, az annak membránjában található IP_3 -függő Ca^{2+} -csatornákon keresztüli Ca^{2+} -áramlásra fókuszálunk.



7. ábra. A sejtben lejátszódó alapvető Ca^{2+} -áramlási folyamatok részletesebb ábrázolása, (*)-al jelölve az ER membránján keresztül történő Ca^{2+} -kiáramlást.

4.2.1. Determinisztikus modellek

Gyakori feltételezés a sejtben lezajló folyamatok modellezése során, hogy a sejt egy „jól kevert” reaktorként működik, vagyis minden kémiai komponens koncentrációja mindenhol ugyanakkora a sejtben belül (homogén sejtmodell). Matematikai szempontból ez közönséges differenciálegyenletrendszereket eredményez.

A tartós (self-sustained) Ca^{2+} -oszilláció leírható viszonylag egyszerű, ún. „minimalista” modellekkel (de ha pl. a Ca^{2+} -release csatornák részletes karakteriztikáját is jellemezni szeretnénk, szélesebb körű elemzésre van szükségünk (lásd pl. [DeYoung, Keizer, 1992])). Ilyen típusú oszcilláció kinetikai egyenletrendszerrel való szimulálásakor legalább két változó szükséges is. A szabad citoszolikus Ca^{2+} -koncentrációt érdemes választani az egyik dinamikus változónak, mert ez a leggyakrabban mért mennyiség.

A minimalista modellek abban az értelemben minimálisak, hogy mindössze egy további változót tartalmaznak. Ezen változók szerint három osztályba sorolhatóak:

- $(Ca_{cyt}^{2+}, Ca_{ER}^{2+})$,
- (Ca_{cyt}^{2+}, IP_3R) ,
- $(Ca_{cyt}^{2+}, \text{fehérje})$.

Itt Ca_{cyt}^{2+} jelöli a citoszolikus Ca^{2+} -koncentrációt, Ca_{ER}^{2+} a Ca^{2+} koncentrációt az endoplazmás retikulumban és IP_3R az IP_3 -receptorok állapotát. Az ilyen modellek esetében csak a citoszolikus Ca^{2+} -koncentráció (c) dinamikájára fókuszálunk, figyelmen kívül hagyva a plazmamembránon keresztüli áramlást ("zárt sejtmodell").

Általános alakjuk a következő:

$$\begin{aligned}\dot{c}(t) &= J_{\text{release}}(Y(t), c(t), t) + J_{\text{leak}}(c(t), t) - J_{\text{uptake}}(c(t), t) \\ \dot{Y}(t) &= f(Y(t), t)\end{aligned}$$

ahol J_{release} és J_{leak} rendre az ioncsatornákon keresztüli Ca^{2+} -felszabadulást, illetve a belső Ca^{2+} -raktárakból szivárgó Ca^{2+} -áramot jelöli, J_{uptake} pedig a Ca^{2+} felvételét a citoszolból ezen raktárakba.

A dolgozatban bemutatott modellek a (Ca_{cyt}^{2+}, IP_3R) típusú modellek családjába tartoznak. Ezekben Y az IP_3R -ok egyes állapotainak arányát jelöli (tehát pl. x_{000} , x_{001} , stb.).

A kétdimenziós modellek analízise a kísérleti megfigyelésekkel összhangban azt mutatja, hogy tartós oszcilláció csak akkor következik be, ha valamelyik változó rendelkezik önmagára való aktiváló hatással, kémiai kifejezéssel élve a modellben autokatalitikus lépés is van. Mint említettük, az egyik legismertebb ilyen visszacsatolási hurok a Ca^{2+} pozitív visszacsatolása a Ca^{2+} -ra (CICR, 4.1.1). Így ezt a tényezőt mindhárom típusú minimalista modell tartalmazza.

A 4.1.1-es pontban leírt gátló mechanizmust, nevezetesen, hogy az oszcilláció kialakulásában szerepet játszhat az IP_3R Ca^{2+} -nal való gátlása is, mely a receptor konformációváltozásán keresztül jön létre, több kétdimenziós modellben is tanulmányozták [Atri et al., 1993], [Poledna, 1991], [Poledna, 1993].

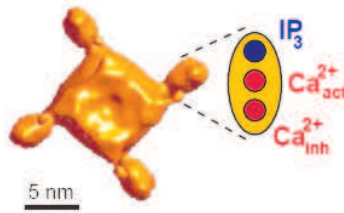
Egy részletesebb, alaposabb nyolcdimenziós modellt alkotott De Young és Keizer [DeYoung, Keizer, 1992], melyet Li és Rinzel [Li, Rinzel, 1994] kétdimenziósra egyszerűsített (a különböző időskálákra alapozva). Mind a bonyolultabb, mind pedig az ezek egyszerűsítése során nyert ($\text{Ca}_{\text{cyt}}^{2+}$, IP_3R) típusú modellek szerkezete a Hodgkin–Huxley-egyenletek alakjára emlékeztet.

Az utóbbi két modellt mutatjuk be részletesen, az utóbbinak elemzéséből pedig gyakorlati következtetéseket is levonunk.

5. Két gyakran idézett modell

5.1. De Young és Keizer modellje

De Young és Keizer IP_3 -függő Ca^{2+} -oszillációt leíró modellje abból a feltételezésből indul ki, hogy minden IP_3R három független alegységből épül fel, és ezek mindegyike három domént tartalmaz: egy IP_3 -aktivációs, egy Ca^{2+} -aktivációs és egy Ca^{2+} -inaktivációs domént. Mindegyikhez a nevének megfelelő ion vagy molekula kapcsolódhat.



8. ábra. Az IP_3R -on található domének: Ca^{2+} -aktivációs, Ca^{2+} -inaktivációs és IP_3 -aktivációs domén. Biokémiai kísérletek és elektronmikroszkópos felvételek azt mutatják, hogy az IP_3R négy alegységből épül fel (ahogy ez az ábrán is látszik, illetve lásd 3.1 fejezet) és ahhoz, hogy a csatorna nyitott állapotban legyen, szükséges, hogy a négy alegységből legalább három aktivált állapotban legyen (lásd lejjebb).

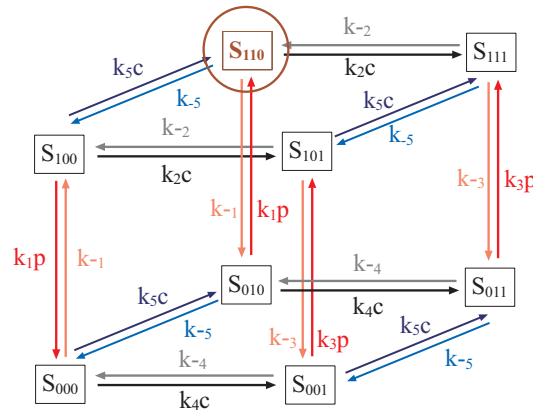
Mivel minden domén lehet szabad vagy foglalt, egy alegységnek nyolcféle állapota létezik. A 9. ábrán az egyes alegységek állapotait S_{ijk} -val jelöltük, ahol i , j és k 0 vagy 1 értéket vesz fel, attól függően, hogy az adott domén szabad-e (0) vagy foglalt (1). Az indexek az alábbi doméneket jelölik:

- i: IP_3 -aktivációs domén
- j: Ca^{2+} -aktivációs domén
- k: Ca^{2+} -inaktivációs domén

Az alegységek közötti kölcsönhatásokra vonatkozó kinetikai paraméterek hiányában feltételezték, hogy ahhoz, hogy egy IP_3 -függő Ca^{2+} -csatorna (IP_3R) nyitott állapotban legyen, szükséges, hogy mindhárom alegység esetében mindkét aktivációs domén foglalt, míg az inaktivációs domén szabad legyen. A fenti jelöléseket használva ennek az S_{110} állapot felel meg. Jelölje az S_{ijk} állapotban lévő alegységek hányadát x_{ijk} . Ekkor a csatornanyitás valószínűsége x_{110}^3 -el arányos.

(Biokémiai kísérletek és elektronmikroszkópos felvételek azt mutatják, hogy az IP_3R négy alegységből épül fel és ahhoz, hogy a csatorna nyitott állapotban legyen, szükséges, hogy a négy alegységből legalább három aktivált állapotban legyen. Ebben az esetben a csatornanyitás valószínűsége $4x_{110}^3 - 3x_{110}^4$. Ez azonban a modell viselkedését lényegesen nem befolyásolja.)

Az állapotok között a 9. ábrán látható átmenetek lehetségesek:



9. ábra. Kinetika. A De Young-Keizer-modellben definiált állapotok közti lehetséges átmenetek. c jelöli a Ca^{2+} -koncentrációt, p az IP_3 -koncentrációt.

Bár a teljes modell 24 sebességi állandót tartalmazna, De Young és Keizer a következő egyszerűsítő feltételezések mellett tízre csökkentette ezek számát: a sebességi állandók függetlenek a Ca^{2+} -aktivációs domén állapotától, a Ca^{2+} -aktiváció sebességi állandója független a Ca^{2+} -inaktivációtól és az IP_3 -tól. Végül pedig a Ca^{2+} -inaktiváció független a Ca^{2+} -aktivációtól. Így tehát tíz darab sebességi állandó maradt: $k_{\pm 1}, k_{\pm 2}, k_{\pm 3}, k_{\pm 4}, k_{\pm 5}$.

Az S_{ijk} állapotban lévő receptorok x_{ijk} hányadára vonatkozó differenciálegyenletek tömeghatás kinetikára épülnek, így a következő alakban írhatók fel:

$$\begin{aligned}
\frac{dx_{000}}{dt} &= (k_{-1}x_{100} - k_1px_{000}) + (k_{-4}x_{001} - k_4cx_{000}) + (k_{-5}x_{010} - k_5cx_{000}) \\
\frac{dx_{001}}{dt} &= (k_{-3}x_{101} - k_3px_{001}) + (k_4cx_{000} - k_{-4}x_{001}) + (k_{-5}x_{011} - k_5cx_{001}) \\
\frac{dx_{011}}{dt} &= (k_{-3}x_{111} - k_3px_{011}) + (k_4cx_{010} - k_{-4}x_{011}) + (k_5cx_{001} - k_{-5}x_{011}) \\
\frac{dx_{101}}{dt} &= (k_2cx_{100} - k_{-2}x_{101}) + (k_3px_{001} - k_{-3}x_{101}) + (k_{-5}x_{111} - k_5cx_{101}) \\
\frac{dx_{010}}{dt} &= (k_{-1}x_{110} - k_1px_{010}) + (k_{-4}x_{011} - k_4cx_{010}) + (k_5cx_{000} - k_{-5}x_{010}) \\
\frac{dx_{100}}{dt} &= (k_1px_{000} - k_{-1}x_{100}) + (k_{-2}x_{101} - k_2cx_{100}) + (k_{-5}x_{110} - k_5cx_{100}) \\
\frac{dx_{110}}{dt} &= (k_1px_{010} - k_{-1}x_{110}) + (k_{-2}x_{111} - k_2cx_{110}) + (k_5cx_{100} - k_{-5}x_{110}) \\
\frac{dx_{111}}{dt} &= (k_2cx_{110} - k_{-2}x_{111}) + (k_3px_{011} - k_{-3}x_{111}) + (k_5cx_{101} - k_{-5}x_{111})
\end{aligned}$$

Ezen egyenletek közül egyet elhagyhatunk és felírhatjuk helyette a megmaradási törvényt, mely szerint:

$$\sum_{ijk \in [0,1]^3} x_{ijk} = 1$$

Vagyis mindegyik receptor valamelyik x_{ijk} hányadhoz tartozik és a receptorok száma állandó.

Általában a Ca^{2+} -koncentráció nem konstans, ezért x_{ijk} -ra nem kapunk zárt megoldást. Az állandósult állapothoz tartozó x_{ijk} értékeket (stationary value) azonban ki tudjuk számolni szimbolikusan:

$$\begin{aligned}
\hat{x}_{000} &= d_1d_2d_5\omega_1 \\
\hat{x}_{010} &= d_1d_2\hat{c}\omega_1 \\
\hat{x}_{011} &= d_3\hat{c}^2\omega_1 \\
\hat{x}_{110} &= d_2\hat{c}p\omega_1 \\
\hat{x}_{100} &= d_2d_5p\omega_1 \\
\hat{x}_{001} &= d_3d_5\hat{c}\omega_1 \\
\hat{x}_{101} &= d_5\hat{c}p\omega_1 \\
\hat{x}_{111} &= \hat{c}^2p\omega_1
\end{aligned}$$

ahol $\omega_1^{-1} = (\hat{c} + d_5)(d_1d_2 + \hat{c}d_3 + \hat{c}p + d_2p)$, illetve $d_i = k_i/k_{-i}$.

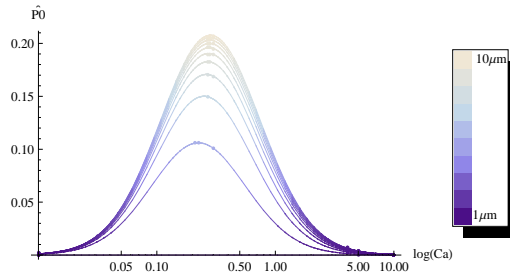
Az alábbi táblázat a De Young és Keizer eredeti cikkében szereplő sebességi állandókat tartalmazza:

$k_1 = 400(\mu Ms)^{-1}$	$d_1 = 0.13\mu M$
$k_2 = 0.2(\mu Ms)^{-1}$	$d_2 = 1.049\mu M$
$k_3 = 400(\mu Ms)^{-1}$	$d_3 = 943.3nM$
$k_4 = 0.2(\mu Ms)^{-1}$	$d_4 = 144.5nM$
$k_5 = 20(\mu Ms)^{-1}$	$d_5 = 82.34nM$

Ebből pedig az állandósult állapothoz tartozó csatornanyitási valószínűség:

$$\hat{p}_0 = \hat{x}_{110}^3 = (d_2\hat{c}p\omega_1)^3$$

melyet ábrázolva a Ca^{2+} -koncentráció függvényében egy harang alakú görbét kapunk:



10. ábra. Csatornanyitási valószínűségek a Ca^{2+} -koncentráció függvényében. A színskála elemei az IP_3 -koncentráció értékeit mutatják.

Az ábráról leolvasható, hogy alacsony Ca^{2+} -koncentráció esetén annak növekedése szignifikáns növekedést eredményez a csatornanyitási valószínűségben, míg ha a Ca^{2+} -koncentráció túlságosan magas lesz, további növekedése csökkenti a csatornanyitási valószínűségét. Látható továbbá az is, hogy minél magasabb az IP_3 -koncentráció, annál nagyobb valószínűséggel nyit ki a csatorna. Mindez összhangban van a 4.1.1-es pontban leírt kísérleti tapasztalatokkal.

Négy fontos kvalitatív következtetés vonható le DeYoung és Keizer számolásaiból.

- A modell alátámasztja, hogy az IP_3 -csatorna kísérleti úton történő citoplazmatikus Ca^{2+} -al való aktivációja és inaktivációja elengedhetetlen az intracelluláris Ca^{2+} -oszcilláció kialakulásához. A teljes mechanizmus egyetlen belső Ca^{2+} -raktárként az ER-t használja, amely csak részben ürül ki egy Ca^{2+} -pulzus alkalmával, és újratöltődik a Ca^{2+} -ATP-áz segítségével. Ez volt az első olyan modell, amely az oszcillációt egyedül az IP_3R -ra és egyetlen Ca^{2+} -raktárra alapozva írta le.
- Ebben a mechanizmusban az oszcillációt állandó IP_3 -koncentráció mellett figyelhetjük meg. Ez fontos lehet olyan kísérletek esetében, amikor az IP_3 pufferelesét nemhidrolizálható IP_3 analógokkal végzik.
- Ennek a mechanizmusnak a kombinálása a Ca^{2+} IP_3 termelésre ható pozitív visszacsatolásával fokozza az éles Ca^{2+} -tűskéket, emlékeztetve az ún. relaxációs oszcillációra, ahol minden tűskét egy hosszú, ún. refraktér periodus követ, amelyben a Ca^{2+} -koncentráció alacsony.
- Korábbi kísérletekkel összhangban úgy találták, hogy oszcilláció csak akkor jöhet létre, ha az ingerlés mértéke egy meghatározott intervallumon belül marad, és az ingerlés fokozásával növekszik a Ca^{2+} -tűskék frekvenciája.

Ezt a modellt számos újabb modell megalkotásánál tekintették kiindulási pontként.

5.2. Determinisztikus Li-Rinzel modell

Li és Rinzel DeYoung és Keizer nyolcváltozós modelljét a különböző időskálákra való tekintettel, nevezetesen, hogy a Ca^{2+} -aktiváció és az IP_3 -aktiváció sokkal gyorsabban megy végbe, mint a Ca^{2+} -inaktiváció, olyan kétváltozós modellre egyszerűsítette (elhagyva az említett két dinamikai tényezőt), amelyben a szabad inaktív domének hányadát egyetlen egyenlet írja le. Így egy, a Hodgkin–Huxley-egyenletekhez hasonló alakú rendszert kaptak. Ez a modell figyelmen kívül hagyja a sejtmembránon keresztüli Ca^{2+} -áramlást és feltételezi, hogy a különböző sebességi együtthatók függetlenek egymástól. Ez a modell összhangban van a gonadotróp sejtekben megfigyelt Ca^{2+} -oszcillációval [Sherman et al., 2002]. Sherman és mtsai. modelljét a következő nemlineáris autonóm differenciálegyenlet-rendszer írja le:

$$\begin{aligned} \dot{c} &= \frac{f_i}{V_i} \left(\left(L + P \left[\left(\frac{\lambda}{\lambda + K_i} \right) \left(\frac{c}{c + K_a} \right) y \right]^3 \right) \left(\frac{C_T}{\sigma} - c \left(1 + \frac{1}{\sigma} \right) \right) - \frac{V_s c^2}{c^2 + K_s^2} \right) \\ \dot{y} &= A (K_d (1 - y) - cy), \end{aligned}$$

ahol az állapotváltozók:

c : citoszolikus szabad Ca^{2+} koncentráció,

y : szabad Ca^{2+} inaktivációs domének hányada.

λ : a vizsgált paraméter, az IP_3 -koncentrációt jelöli.

Az egyenletben szereplő konstansokat, melyek gonadotróp sejteken mért eredményekből származnak, az alábbi táblázat tartalmazza:

Jelölés	Leírás	Tipikus érték
c	intracelluláris szabad Ca^{2+} -koncentráció	változó [μM]
y	szabad Ca^{2+} -inaktivációs domének hányada	változó
λ	IP_3 -koncentráció	változó [μM]
f_i	pufferhez nem kötött intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció	0.01
V_i	citoszol térfogata	4pL
L	Ca^{2+} -szivárgás az ER membránján keresztül	0.37pL/s
P	az IP_3 -függő Ca^{2+} -csatorna maximális vezetése	26640pL/s
C_T	teljes Ca^{2+} -koncentráció a sejtben a citoszolikus térfogat hányadában	2[μM]
σ	effektív ER-térfogat és effektív citoszolikus térfogat aránya	0.185
V_S	Ca^{2+} pumpálásának maximális sebessége	400 aMol/s
K_S	c azon értéke, amelynél a pumpálás sebessége fele a maximálisnak	0.2[μM]
K_d	Ca^{2+} -nak a Ca^{2+} -inaktivációs doménre vonatkozó disszociációs konstansa	0.4[μM]
K_a	Ca^{2+} -nak a Ca^{2+} -aktivációs doménre vonatkozó disszociációs konstansa	0.4[μM]
K_i	IP_3 -nak az IP_3 -aktivációs doménre vonatkozó disszociációs konstansa	0.4[μM]
A	\dot{y} időskálája	0.5/s

Mint láttuk, a citoszolikus szabad Ca^{2+} -koncentráció változása az endoplazmás retikulum membránján keresztüli Ca^{2+} -áramlás következménye. Ezen áramlás három tényező együttes hatásának eredményeképpen jön létre:

- áramlás IP_3 -függő Ca^{2+} -csatornán keresztül,
- szivárgás,
- Ca^{2+} -pumpa (SERCA), amely a Ca^{2+} -t visszajuttatja a citoszolból az endoplazmás retikulumba.

A fenti táblázat adatai alapján értelmezhetjük a fenti egyenlet jobb oldalán szereplő tényezőket:

$$\frac{f_i}{V_i} \left(\left(L + P \left[\underbrace{\left(\frac{\lambda}{\lambda + K_i} \right)}_2 \underbrace{\left(\frac{c}{c + K_a} \right)}_3 y \right]^3 \right) \underbrace{\left(\frac{C_T}{\sigma} - c \left(1 + \frac{1}{\sigma} \right) \right)}_5 - \underbrace{\frac{V_s c^2}{c^2 + K_s^2}}_6 \right)$$

1. effektív citoszolikus térfogat,
2. kötött IP_3 -aktivációs domének aránya,
3. kötött Ca^{2+} -aktivációs domének aránya,
4. nyitott Ca-csatornák aránya

(Mivel egy IP_3 -függő Ca^{2+} -csatorna akkor van nyitott állapotban, ha mindhárom aleggységének kötött IP_3 -, illetve Ca^{2+} -aktivációs doménje van, a nyitott Ca-csatornák arányát ez a képlet adja.

Ha ezt a kifejezést megszorozzuk a csatorna maximális vezetőképességével, P -vel, megkapjuk az IP_3 -függő Ca^{2+} -csatorna vezőképességét),

5. szivárgást és IP_3 -függő Ca^{2+} -csatornán keresztül történő áramlást reprezentáló tag (Hodgkin–Huxley-alakú),
6. Hill-függvény, a Ca^{2+} -pumpát (SERCA) reprezentálja, amely a Ca^{2+} -t a citoszolból visszapumpálja az endoplazmás retikulumba, ezért ez negatív előjellel szerepel az egyenletben.

6. Matematikai háttér

6.1. Autonóm egyenletek, dinamikai rendszerek

A különböző tudományterületeken felmerülő modellek, amelyekben egy folyamat időbeli változását vizsgáljuk, igen gyakran az ún. autonóm differenciálegyenletek osztályába tartoznak. Ezek olyan differenciálegyenletek, melyek jobb oldala nem függ az időtől, a megoldást külső hatások nem befolyásolják, továbbá a folyamat jövője csak a jelenlegi állapoton keresztül függ az időtől.

Formálisan:

1. Definíció. Legyen $M \subset \mathbb{R}^N$ tartomány, $f : M \rightarrow \mathbb{R}^N$ a lokális Lipschitz-feltételnek eleget tevő függvény. Az

$$\dot{x}(t) = f(x(t)) \tag{1}$$

differenciálegyenletet *autonóm differenciálegyenletnek* nevezzük.

Ezen differenciálegyenletek egyik legfontosabb tulajdonsága az időeltolással szembeni invariancia. A kezdeti feltételhez csak az ismeretlen függvény kezdeti értékének megadása szükséges, a kezdeti időponté nem. Vagyis, ha ugyanaból a kezdeti értékből indítunk egy-egy megoldást különböző időpillanatokban, akkor a két megoldásra ugyanaz az egyenlet fog vonatkozni, így a két megoldás lényegében azonos lesz, csupán az értelmezési tartományok lesznek egymásnak a kezdeti időpontok különbségével vett eltoltjai.

Az autonóm egyenletek másik fontos jellemzője a csoporttulajdonság, amely azt a látszólag triviális ténnyt fejezi ki, hogy ha a p pontból induló megoldás s idő alatt a q pontba jut, és a q pontból induló megoldás t idő alatt az r pontba jut, akkor a p pontból induló megoldás a $t + s$ idő alatt az r pontba jut.

1. Állítás (Csoporttulajdonság). Legyen $p \in M$; $t, s \in \mathbb{R}$ pedig olyan, amelyekre $t, s, t + s \in I(p)$. Ekkor

$$\varphi(t + s, p) = \varphi(t, \varphi(s, p)).$$

Az autonóm egyenletek ezen tulajdonságainak absztrahálásával jutunk el a dinamikai rendszer fogalmához.

2. Definíció. Legyen $M \subset \mathbb{R}^N$ tartomány. A $\varphi : \mathbb{R} \times M \rightarrow M$ folytonos függvényt *dinamikai rendszernek* nevezzük az M fázistéren, ha rendelkezik az alábbi két tulajdonsággal:

- $\varphi(0, p) = p$, minden $p \in M$ esetén
- $\varphi(t + s, p) = \varphi(t, \varphi(s, p))$, minden $p \in M$ és $t, s \in \mathbb{R}$ esetén.

Az M fázistér a rendszer állapotainak halmaza, a $\mathbb{R} \times M \ni (t, p) \mapsto \varphi(t, p)$ függvény pedig azt adja meg, hogy melyik állapotba kerül a rendszer a p állapotból indulva t idő múlva.

Az autonóm egyenlet tehát olyan folyamatokat modellez, amelyekben a rendszer pillanatnyi állapota (kezdeti érték) meghatározza, hogy az idő múlásával (vagy akár a múltban) milyen állapotokon megy (vagy ment) keresztül a rendszer. Az ilyen típusú, determinisztikus rendszereket nevezik dinamikai rendszereknek.

3. Definíció. Legyen $\varphi : \mathbb{R} \times M \rightarrow M$ dinamikai rendszer és $p \in M$ tetszőleges pont. A $\{\phi(t, p) : t \in \mathbb{R}\} = \mathfrak{R}_{\phi(\cdot, p)}$ görbét a p pont pályájának (*trajektóriájának*) nevezik.

4. Definíció. A $p \in M$ pont

- *egyensúlyi vagy stacionárius pont*, ha minden $t \in \mathbb{R}$ számra $\varphi(t, p) = p$,
- *periodikus pont*, ha van olyan $T \in \mathbb{R}^+$ szám (melyet *periódusnak* hívunk), hogy bármely $t \in \mathbb{R}$ számra $\phi(t + T, p) = \phi(t, p)$.

Ha T a legkisebb olyan pozitív szám, amelyre ez az egyenlőtlenség fennáll, akkor T *alapperiódus*, vagy *minimális periódus*. A periodikus pont pályáját periodikus pályának hívjuk.

2. Állítás. Periodikus pont pályájának minden pontja ugyanakkora alapperiódussal periodikus.

1. Tétel. Ha a $p \in M$ pont pályája metszi önmagát, akkor p vagy egyensúlyi pont, vagy periodikus pont.

A következő tétel az autonóm egyenletek és dinamikai rendszerek kapcsolatát fogalmazza meg, mely szerint dinamikai rendszerek és differenciálegyenletek egymásnak megfeleltethetőek. [Tóth, Simon, 2005]:

2. Tétel. Legyen $N \in \mathbb{N}$, $M = \mathbb{R}^N$, és legyen $f : \mathbb{R}^N \rightarrow \mathbb{R}^N$ folytonosan differenciálható függvény. Ekkor létezik olyan dinamikai rendszer, melynek pályái megegyeznek az $\dot{x} = f \circ x$ differenciálegyenlet pályáival. Valamint megfordítva, bármely kétszer folytonosan differenciálható $\varphi : \mathbb{R} \times \mathbb{R}^N \rightarrow \mathbb{R}^N$ dinamikai rendszerhez van olyan $f : \mathbb{R}^N \rightarrow \mathbb{R}^N$ folytonosan differenciálható függvény, amelyre az $\dot{x} = f \circ x$ differenciálegyenlet megoldásai a kiindulási dinamikai rendszert adják.

Egy autonóm differenciálegyenlet megoldásai dinamikai rendszert határoznak meg, ha minden teljes megoldás az egész \mathbb{R} halmazon értelmezve van. Ez a tulajdonság ugyan nem teljesül minden differenciálegyenletre, de minden differenciálegyenlethez megadható egy olyan differenciálegyenlet, melynek teljes megoldásai az egész \mathbb{R} halmazon értelmezve vannak, pályái, és rajtuk az irányítás is megegyezik az eredetiével, vagyis egy autonóm differenciálegyenlethez mindig van olyan dinamikai rendszer, melynek pályái megegyeznek a differenciálegyenlet pályáival.

5. Definíció. Azt mondjuk, hogy $x_0 \in \mathbb{R}^N$ az (1) rendszer *egyensúlyi pontja*, ha $f(x_0) = 0$. Azt mondjuk, hogy az x_0 egyensúlyi pont *hiperbolikus egyensúlyi pont*, ha f Jacobi-mártixának x_0 -ban nincsen nulla valós részű sajátértéke.

A következőkben megadjuk a kétdimenziós egyensúlyi pontok osztályozását.

6. Definíció. Írjuk fel a x_0 egyensúlyi pont egy U környezetében a megoldásokat polárkoordinátákban. Az x_0 pont

- *stabilis fókusz*, ha van olyan U környezet, hogy az abból induló összes megoldásra teljesül $\lim_{+\infty} r = 0, \lim_{+\infty} |\varphi| = +\infty$;
- *instabilis fókusz*, ha van olyan U környezet, hogy az abból induló összes megoldásra teljesül $\lim_{-\infty} r = 0, \lim_{-\infty} |\varphi| = +\infty$;
- *stabilis csomó*, ha van olyan U környezet, hogy az abból induló összes megoldásra teljesül $\lim_{+\infty} r = 0, \lim_{+\infty} |\varphi| < +\infty$;
- *instabilis csomó*, ha van olyan U környezet, hogy az abból induló összes megoldásra teljesül $\lim_{-\infty} r = 0, \lim_{-\infty} |\varphi| < +\infty$;
- *nyereg*, ha létezik két olyan pálya U -ban, amelyeken a megoldás $t \rightarrow +\infty$ esetén az x_0 ponthoz tart, létezik két olyan pálya U -ban, melyeken a megoldás $t \rightarrow -\infty$ esetén az x_0 ponthoz tart, és a többi pontból induló trajektória $t \rightarrow +\infty$ és $t \rightarrow -\infty$ esetén is elhagyja az U halmazt.
- *örvénypont (centrum)*, ha x_0 valamely környezetében minden pálya periodikus.

7. Definíció. Ha egy periodikus pályának létezik olyan környezete, melyben nincs másik periodikus pálya, akkor ezt a periodikus pályát *határciklusnak* nevezzük.

6.2. Stabilitáselmélet, bifurkációk

8. Definíció. Legyen $t_0, p_0 \in \Omega$! A $t \mapsto \Phi(t, t_0, p_0)$ megoldást **stabilisnak** nevez-
zük, ha

- $[t_0, +\infty) \subset I(t_0, p_0)$ és
- minden $\varepsilon \in \mathbb{R}^+$ és $t_1 \in [t_0, \infty)$ számhoz létezik olyan $\delta \in \mathbb{R}^+$, hogy $(t_1, q) \in \Omega$, $\|q - \Phi(t_1, t_0, p_0)\| < \delta$ esetén
 $[t_1, +\infty) \subset I(t_1, q)$ és $\|\Phi(t, t_1, q) - \Phi(t, t_0, p_0)\| < \varepsilon \quad (t > t_1)$.

A megoldást **instabilisnak** nevezük, ha nem stabilis. A megoldást **aszimptotikusan stabilisnak** nevezük, ha stabilis és a fenti $(t_1, q) \in \Omega$ mellett

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \Phi(t, t_1, q) - \Phi(t, t_0, p_0) = 0$$

Bifurkációnak nevezzük azt a jelenséget, amikor egy rendszer kvalitatív viselkedése a rendszer paramétereit folytonosan változtatva ugrásszerűen megváltozik. Így például stacionárius pont vagy periodikus pálya keletkezik, tűnik el, stabilissá vagy instabilissá válik. A bifurkációkat három csoportba sorolhatjuk:

- stacionárius pontok lokális bifurkációi,
- periodikus pályák lokális bifurkációi,
- globális bifurkációk.

Legyen adott az

$$\dot{x}(t) = f(x(t), u)$$

rendszer, ahol $x : \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}^n$, $f : \mathbb{R}^n \times \mathbb{R}^k \rightarrow \mathbb{R}^n$ folytonosan differenciálható függvények, $u \in \mathbb{R}^k$ paraméter. Legyen x_0 az $f(\cdot, u)$ vektormezőnek stacionárius pontja a u_0 paraméternél, azaz $f(x_0, u_0) = 0$. A kérdés az, hogy az u paramétert változtatva megmarad-e a stacionárius pont, és ha igen, akkor stabilitása hogyan változik. Látni fogjuk, hogy ez a vektormező (x_0, u_0) pont beli derivált mátrixának sajátértékeitől függ.

Jelölje $\partial_x f(x, u)$ a $x \mapsto f(x, u)$ függvény derivált mátrixát.

3. Tétel. *Ha a $\partial_x f(x_0, u_0)$ mátrixnak a 0 nem sajátértéke, akkor van az u_0 pontnak olyan $U \in \mathbb{R}^k$ környezete, és olyan $x : U \rightarrow \mathbb{R}^n$ függvény, hogy $x(u_0) = x_0$ és $f(x(u), u) = 0$ minden $u \in U$ esetén, azaz az u_0 egy környezetében minden paraméterértékhez egy stacionárius pont tartozik.*

A stacionárius pontban tehát bekövetkezhet minőségi változás, ha az nem hiperbolikus, azaz a derivált mátrixnak van 0 valós részű sajátértéke. Ha egy nulla sajátértéke van, akkor tipikusan nyereg-csomó bifurkáció következik be. (Ilyenkor két egyensúlyi pont összeolvad, majd eltűnik.) Ha egy tiszta képzetes sajátértékpárja van, akkor Andronov–Hopf-bifurkáció. (Ebben az esetben egy egyensúlyi pont stabilitása megváltozik, miközben egy határciklus jön létre vagy tűnik el.)

Pontosan megfogalmazva:

4. Tétel. *(nyereg-csomó bifurkáció) Legyen a kiindulási egyenletben $n=k=1$. Az általánosság megszorítása nélkül feltehető, hogy $x_0 = u_0 = 0$, azaz az $f(\cdot, 0)$ vektormezőnek a 0 stacionárius pontja. Most tegyük fel, hogy a 0 nem hiperbolikus stacionárius pont, azaz $\partial_x f(0, 0) = 0$, továbbá $\partial_u f(p, u) \neq 0$ és $(\partial_x f(0, 0))^2 \neq 0$. Ekkor $u > 0$ esetén nincs az $f(\cdot, u)$ vektormezőnek stacionárius pontja az origó egy környezetében, $u < 0$ esetén pedig egy stabilis és egy instabilis stacionárius ponja van.*

5. Tétel. *(Andronov–Hopf-bifurkáció) Legyen a kiindulási egyenletben $n=2$, $k=1$. Tegyük fel, hogy*

1. $f(p_0, u_0) = 0$

2. $\partial_x f(p_0, u_0)$ mátrixnak két tisztán képzetes sajátértéke van: $\lambda(u_0) = \pm i\beta$

3. $\frac{\partial \operatorname{Re} \lambda(u_0)}{\partial u_0} \neq 0$.

Ekkor u_0 -ban megváltozik a p_0 stacionárius pont stabilitása és születik egy határciklus.

7. A determinisztikus Li–Rinzel modell

A következőkben bemutatjuk azokat az alapvető módszereket, amelyekkel egy nemlineáris autonóm rendszer fázisképe vizsgálható.

7.1. Egyensúlyi pontok

A legegyszerűbb pályák az egyensúlyi pontok, amelyek eleget tesznek egy algebrai egyenletrendszernek. Az egyensúlyi pontok környezetében meghatározható a fáziskép a linearizálás módszerével. Ezt nevezik az egyensúlyi pontok körüli lokális vizsgálatnak, melynek lényege, hogy az egyensúlyi pont kis környezetében az egyenlet jobb oldalát adó függvényt a lineáris részével közelítjük (főként hiperbolikus egyensúlyi helyzetek esetében működik jól). Ezzel olyan lineáris rendszerhez jutunk, melynek fázisképe meghatározható. Meg lehet mutatni, hogy a linearizálással kapott fáziskép bizonyos feltételek mellett olyan, mint az eredeti rendszer fázisképe az egyensúlyi pont megfelelően kis környezetében.

Az egyensúlyi pontok stabilitásának vizsgálatában a következő tétel lesz a segítségünkre:

6. Tétel.

1. Ha az $A = f'(x_0)$ (Jacobi-) mátrix minden sajátértékének negatív a valós része, akkor x_0 aszimptotikusan stabilis egyensúlyi pontja az (1) differenciálegyenletnek.
2. Ha az $A = f'(x_0)$ (Jacobi-) mátrixnak van pozitív valósrésű sajátértéke, akkor x_0 instabilis egyensúlyi pontja az (1) differenciálegyenletnek.

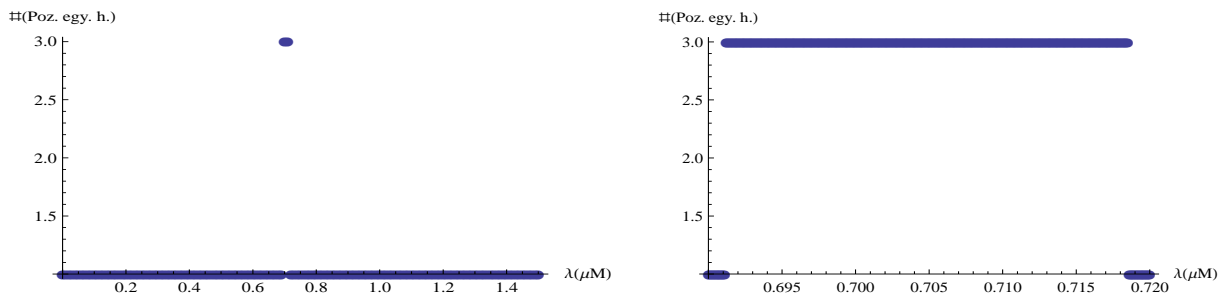
Vizsgáljuk meg, hogy a

$$\begin{aligned} \dot{c} &= \frac{f_i}{V_i} \left(\left(L + P \left[\left(\frac{\lambda}{\lambda + K_i} \right) \left(\frac{c}{c + K_a} \right) y \right]^3 \right) \left(\frac{C_T}{\sigma} - c \left(1 + \frac{1}{\sigma} \right) \right) - \frac{V_s c^2}{c^2 + K_s^2} \right) \\ \dot{y} &= A(K_d(1 - y) - cy), \end{aligned}$$

rendszernek hány pozitív egyensúlyi pontja van a vizsgált (λ) paraméter függvényében.

Mivel c és y mennyiségeket jelölnek, csak pozitív értékeket vehetnek fel. Ennek megfelelően csak a pozitív egyensúlyi helyzetekkel foglalkozunk. Az egyenlet bonyolultságából adódóan az egyensúlyi helyzetek nem fejezhetőek ki analitikusan a paraméter függvényében, annak diszkrét értékeinél azonban kiszámolhatóak.

λ -t csak a $[0;1.5]$ intervallumon tekintjük, mert ennél magasabb koncentráció már káros lenne a sejt számára.



Azt kaptuk, hogy a $[0.6912; 0.7185]$ intervallumon 3 pozitív egyensúlyi helyzet van, ezen kívül pedig 1. Ennek megfelelően az intervallum két végpontjában a rendszer kvalitatív viselkedésének változására számítunk.

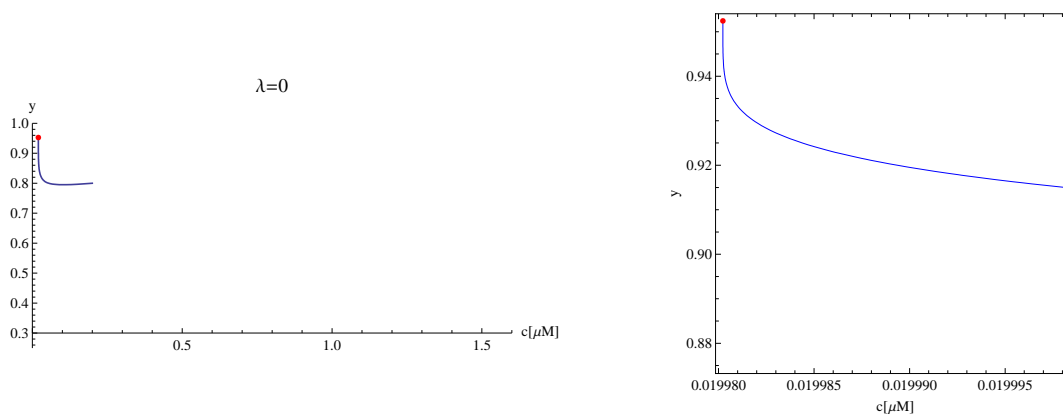
Az alábbi táblázatban szereplő paraméterértékek mellett vizsgáltam a rendszer kvalitatív viselkedésében bekövetkező változásokat. Megkerestem az egyensúlyi helyzeteket és megvizsgáltam azok stabilitását. Számolásaimat a *Mathematica* program segítségével végeztem. (A paraméterértékek kiválasztása a fentiek, illetve [Tien et al., 2005] nyomán történt.)

$\lambda[\mu\text{M}]$	Poz. egyensúlyi helyzet	Jacobi-mátrix sajátértékei	Típus
0	(0.0199802, 0.952426)	-0.98529, -0.20999	aszimp. stabilis
0.6911	(0.033407, 0.92292)	-0.188387+0.158777 <i>i</i> , -0.188387-0.158777 <i>i</i>	aszimp. stabilis
0.6912	(0.0334229, 0.922886), (0.120437, 0.768584), (0.131164, 0.753064)	-0.188056+0.158835 <i>i</i> , -0.188056-0.158835 <i>i</i> , 1.24881, -0.00491696 1.35089, 0.00493635	aszimp. stabilis, instabilis, instabilis
0.71645	(0.0417501, 0.905489), (0.0531698, 0.882671), (0.234385, 0.630532)	-0.0403403+0.124153 <i>i</i> , -0.0403403-0.124153 <i>i</i> , 0.278375, -0.0592681 1.69761, 0.107207	aszimp. stabilis, instabilis, instabilis
0.7165	(0.0418011, 0.905385), (0.0530751, 0.882856), (0.234506, 0.630411)	-0.0395612+0.123572 <i>i</i> , -0.0395612-0.123572 <i>i</i> , 0.276024, -0.0590792 1.69737, 0.107371	aszimp. stabilis, instabilis, instabilis
0.71655	(0.0418529, 0.905279), (0.0529797, 0.883042), (0.234627, 0.630291)	-0.0387712+0.122975 <i>i</i> , -0.0387712-0.122975 <i>i</i> , 0.273646, -0.0588834 1.69714, 0.107536	aszimp. stabilis, instabilis, instabilis
0.71815	(0.0443528, 0.900186), (0.0491199, 0.890631), (0.238447, 0.62652)	-0.0020602+0.0851716 <i>i</i> , -0.0020602-0.0851716 <i>i</i> , 0.165772, -0.0432576 1.68904, 0.112815	aszimp. stabilis, instabilis, instabilis
0.7182	(0.0444965, 0.899895), (0.0489349, 0.890998), (0.238565, 0.626405)	-0.00003085+0.082224 <i>i</i> , -0.00003085-0.082224 <i>i</i> , 0.159733, -0.0418518 1.68877, 0.112981	aszimp. stabilis, instabilis, instabilis
0.7183	(0.0448258, 0.899229), (0.048523, 0.891816), (0.2388, 0.626174)	0.00458866+0.0749344 <i>i</i> , 0.00458866-0.0749344 <i>i</i> , 0.145795, -0.0383 1.68823, 0.113312	instabilis, instabilis, instabilis
0.7185	(0.0459396, 0.896982), (0.0472448, 0.894365), (0.239269, 0.625714)	0.0199081+0.0399263 <i>i</i> , 0.0199081-0.0399263 <i>i</i> , 0.0953731, -0.0208024 1.68714, 0.113976	instabilis, instabilis, instabilis
0.7186	(0.239503, 0.625485)	1.68659, 0.114308	instabilis
1.1428	(0.637227, 0.385643)	0.0000489741+1.04266 <i>i</i> , 0.0000489741-1.04266 <i>i</i>	instabilis
1.2671	(0.69679, 0.364701)	-0.120536+1.09268 <i>i</i> , -0.120536-1.09268 <i>i</i>	aszimp. stabilis

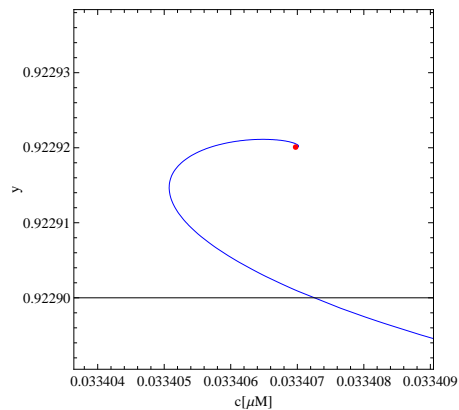
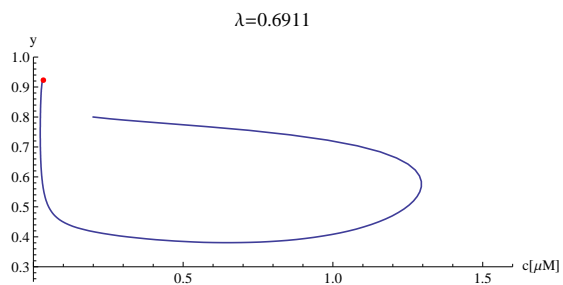
A táblázatból az következők olvashatóak le:

1. $\lambda = 0$ esetén egy aszimptotikusan stabilis egyensúlyi helyzet van a Ca^{2+} -koncentráció alacsony értéknél.
2. $\lambda = 0.6912$ értéknél megjelent még két instabilis egyensúlyi helyzet, az egyik magas Ca^{2+} -koncentrációnál.
3. $\lambda = 0.7182$ esetén megjelenik egy közelítőleg tisztán képzetes (komplex konjugált) sajátértékpár. Az aszimptotikusan stabilis egyensúlyi helyzet elveszti stabilitását. Itt tehát Andronov-Hopf-bifurkáció történt.
4. $\lambda = 0.7185$ esetén még 3 instabilis egyensúlyi helyzet van, míg $\lambda = 0.7186$ értéknél ezek száma egyre csökken, az alacsony Ca^{2+} -koncentrációhoz tartozó egyensúlyi pont eltűnik. Nyereg-csomó bifurkáció.
5. $\lambda = 1.1428$ értéknél ismét van egy tisztán képzetes (komplex konjugált) sajátértékpárunk, ami Andronov-Hopf-bifurkációt jelent.
6. $\lambda = 1.2671$ esetén egy aszimptotikusan stabilis egyensúlyi helyzet keletkezik magas Ca^{2+} -koncentráció értéknél.

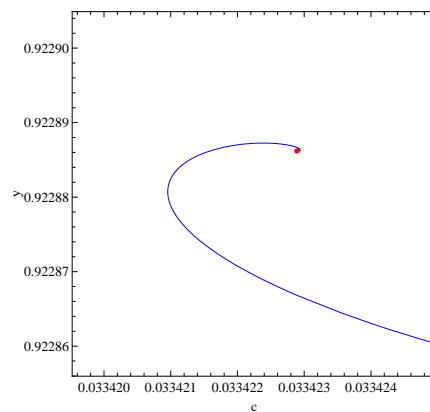
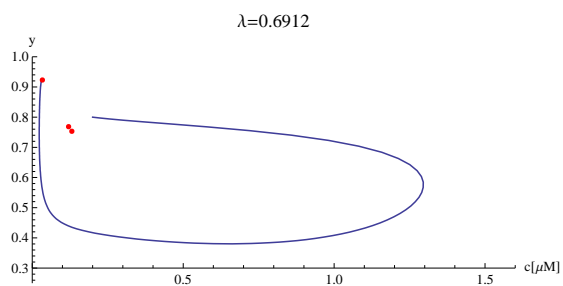
Az alábbi ábrák a trajektóriákat és egyensúlyi helyzeteket szemléltetik a λ különböző értékeinél:



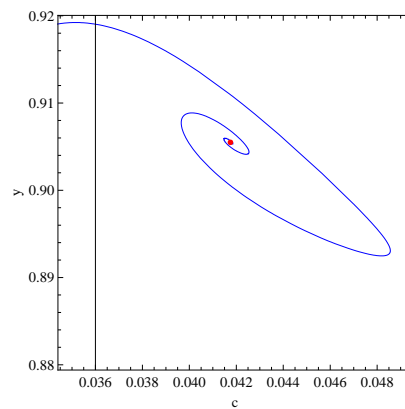
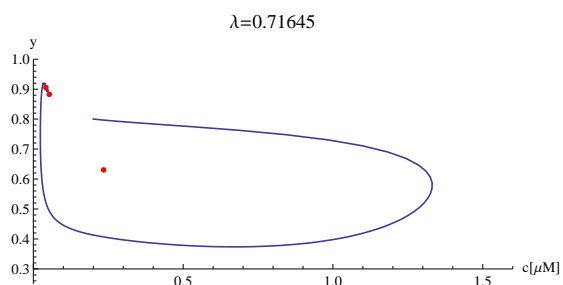
11. ábra.



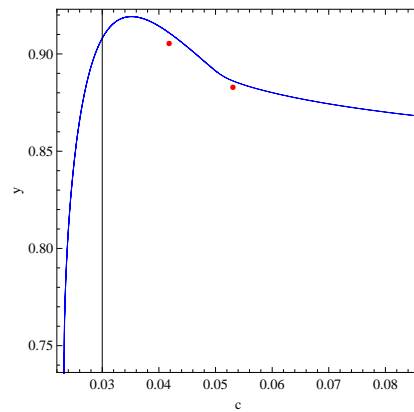
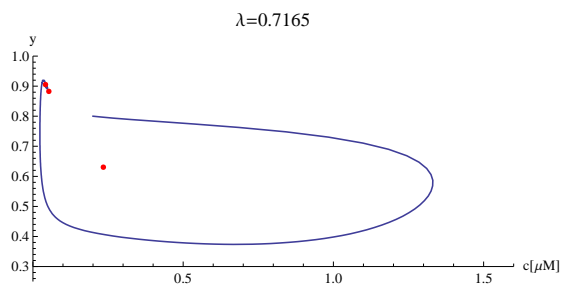
12. ábra.



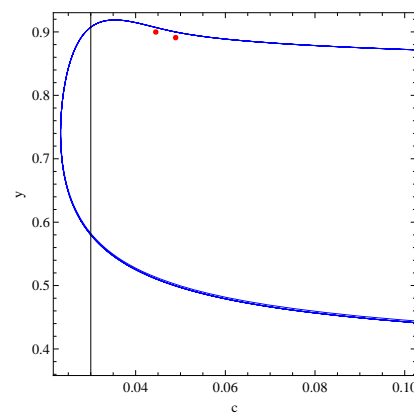
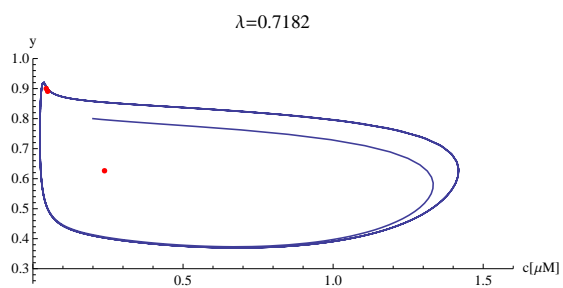
13. ábra.



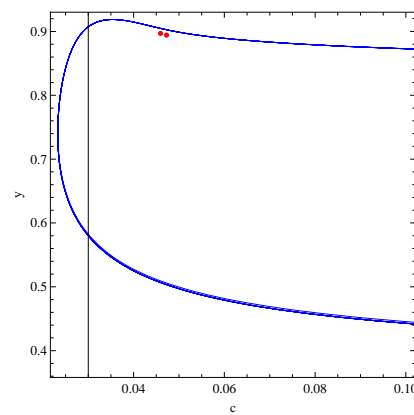
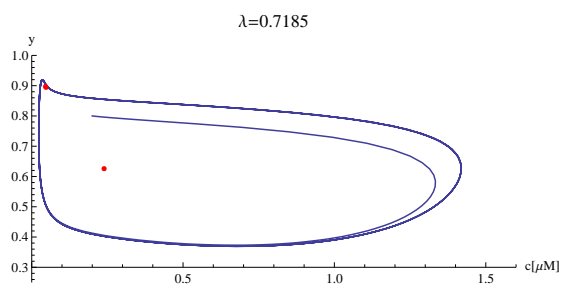
14. ábra.



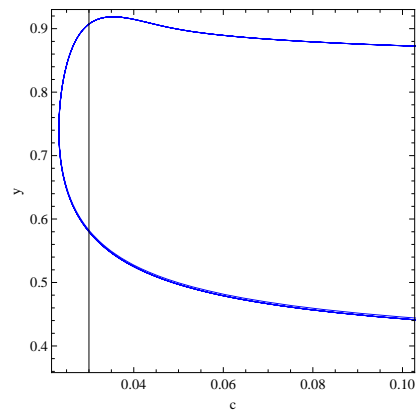
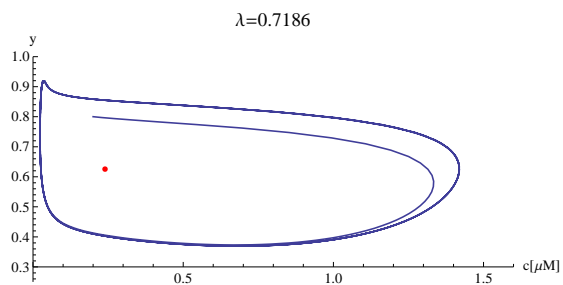
15. ábra.



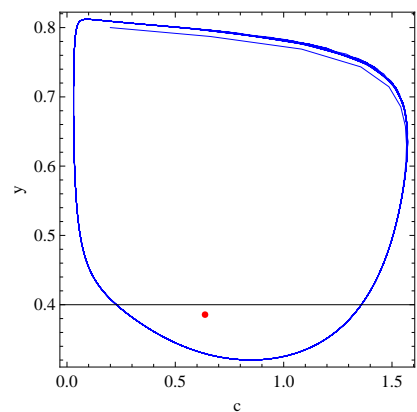
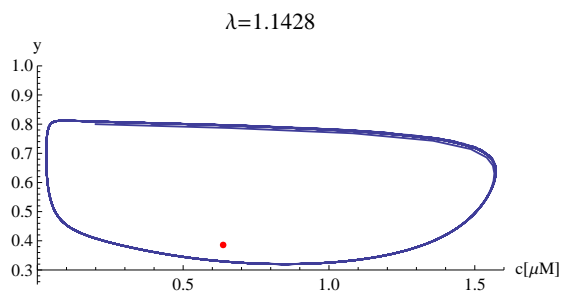
16. ábra.



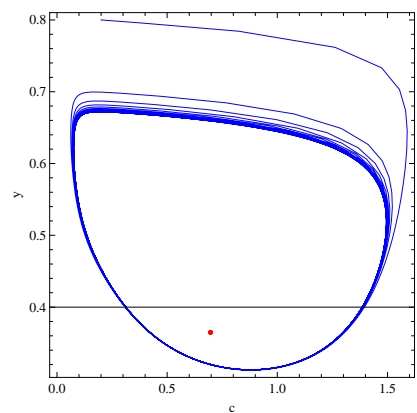
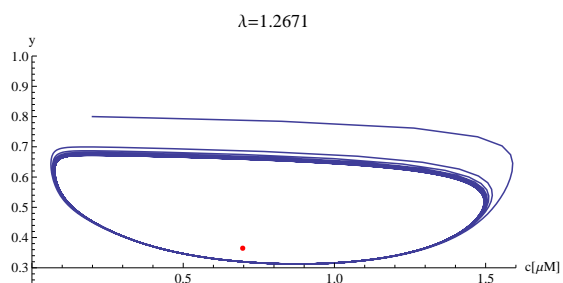
17. ábra.



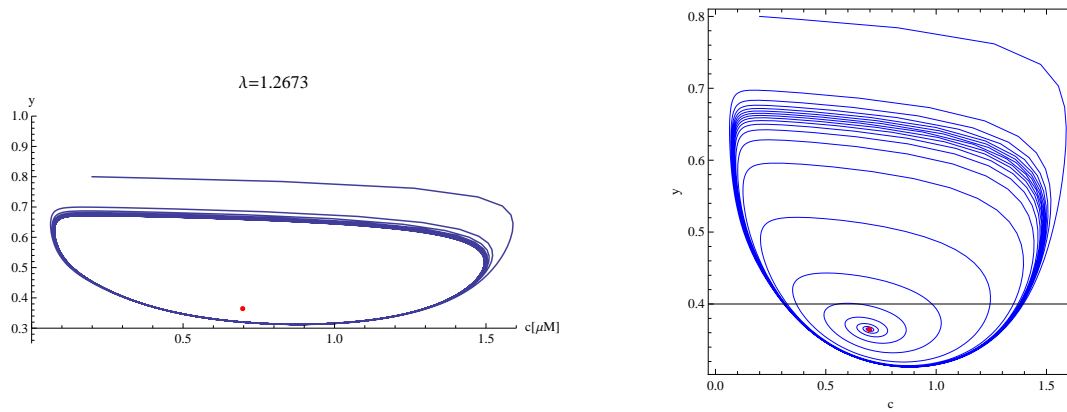
18. ábra.



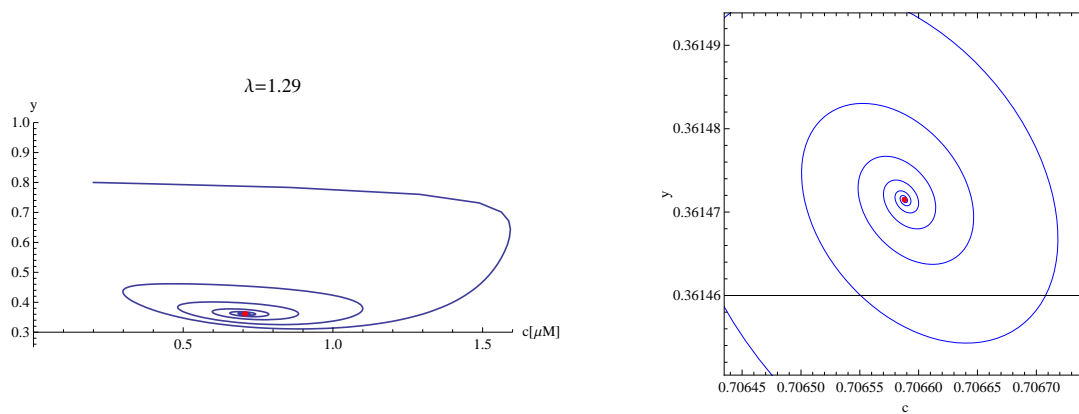
19. ábra.



20. ábra.



21. ábra.



22. ábra.

A 16. ábrán láthatjuk, hogy $\lambda = 0.7182$ értéknél már megjelent egy periodikus pálya is. Ez rögtön el is vezet a következő fontos kérdéshez, hiszen esetünkben a periodikus pálya jelenléte a Ca^{2+} -koncentráció oszcillálását fogja jelenteni.

7.2. Periodikus pályák

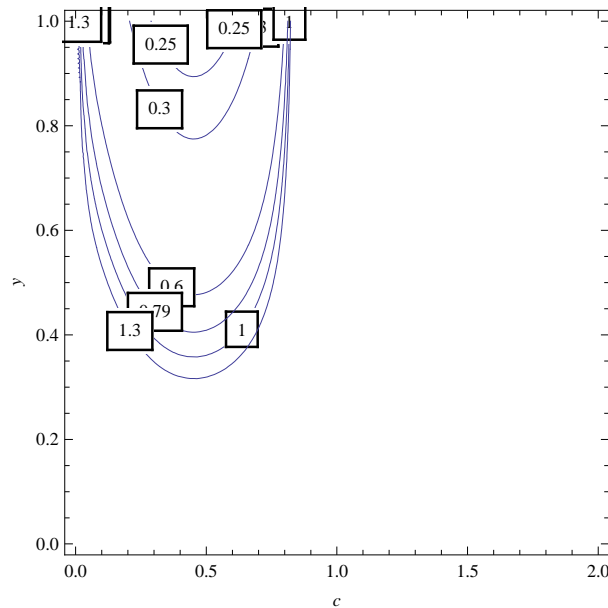
Az egyensúlyi pontok után a legfontosabb speciális struktúrájú trajektóriák a periodikus pályák. Ezek már globálisabb jellegűek, nem találhatók meg olyan egyszerűen, mint az egyensúlyi pontok. Kétdimenziós esetben azonban vannak viszonylag egyszerű módszerek periodikus pályák keresésére.

Periodikus megoldás létezését az alábbi kritériumokkal lehet kizárni:

7. Tétel (Bendixson-kritérium). *Ha $E \subset \mathbb{R}^2$ olyan egyszerűen összefüggő nyílt halmaz, amelyen a $\text{div} f = \partial_1 f_1 + \partial_2 f_2$ függvény állandó előjelű, és legfeljebb véges sok sima egyszerű zárt görbe pontjaiban tűnik el, akkor az (1) rendszernek nincs teljesen az E halmazban haladó periodikus pályája.*

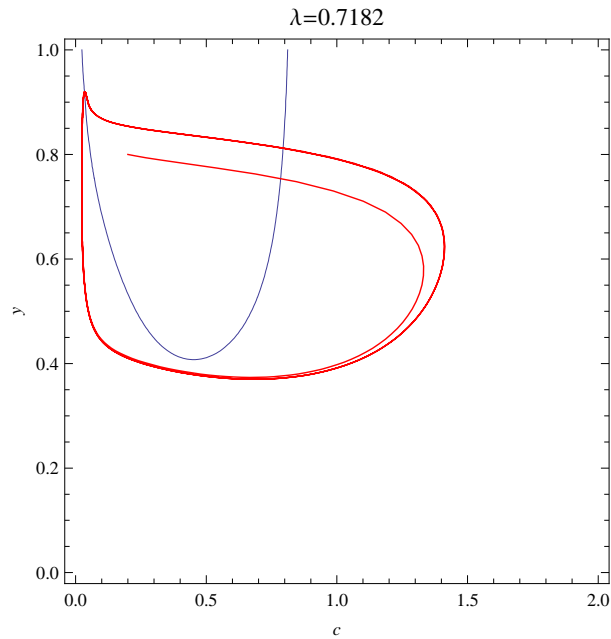
8. Tétel (Bendixson-Dulac-kritérium). *Legyen $E \subset \mathbb{R}^2$ egyszerűen összefüggő nyílt halmaz, és legyen $B : E \rightarrow \mathbb{R}$ olyan differenciálható függvény, melyre a $\text{div}(Bf)$ függvény állandó előjelű, és legfeljebb egy görbe pontjaiban tűnik el. Ekkor az (1) rendszernek nincs teljesen az E halmazban haladó periodikus pályája.*

Alkalmazzuk a Bendixson-kritériumot rendszerünkre. Vizsgáljuk λ diszkrét értékeinél, hogy a rendszer Jacobi-mátrixának nyoma hol vált előjelet. Ehhez a *Mathematica* program "ContourPlot" nevű parancsát hívtam segítségül. Az ábrán a nulla szintvonalak látszanak különböző λ paraméterértékek mellett.



23. ábra. A téglalapban szereplő számok λ értékeit jelzik.

$\lambda = 0.217$ értékig nincs nulla szintvonalunk, tehát $\lambda \in [0, 0.217]$ -re nem létezik periodikus pálya. Ezen érték felett, ha létezik periodikus pálya, annak metszenie kell a nulla szintvonalat. A fentiekben $\lambda = 0.7182$ értéknél talált periodikus pálya valóban metszeni fogja:

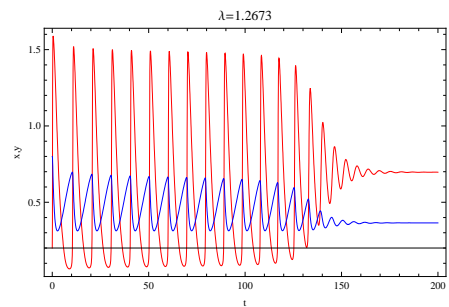
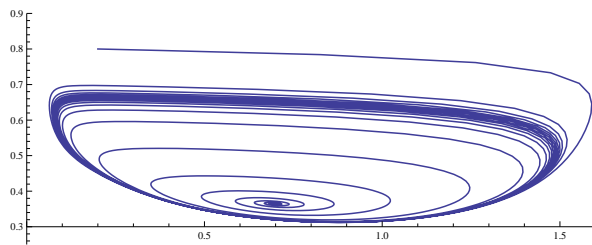
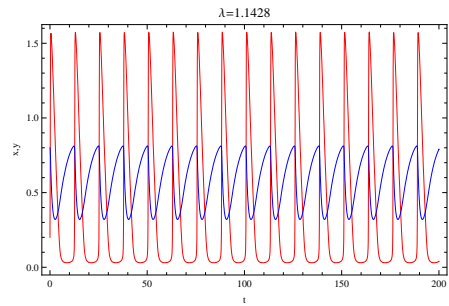
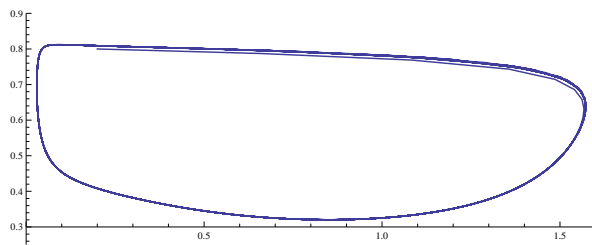
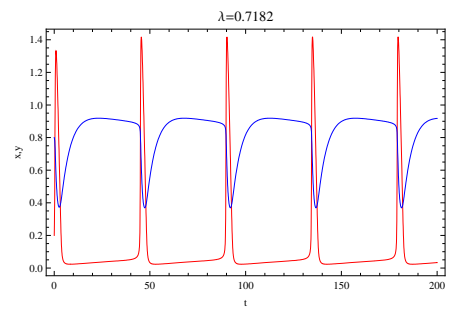
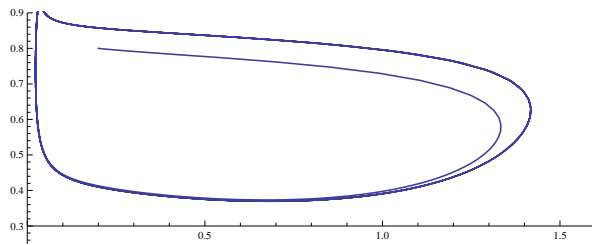
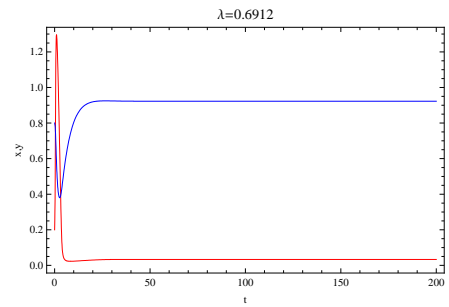
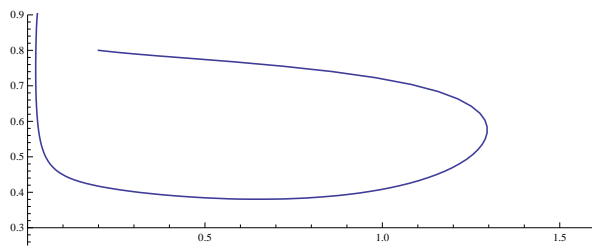


24. ábra.

Periodikus megoldás biztosan lesz Andronov-Hopf-bifurkáció esetén.

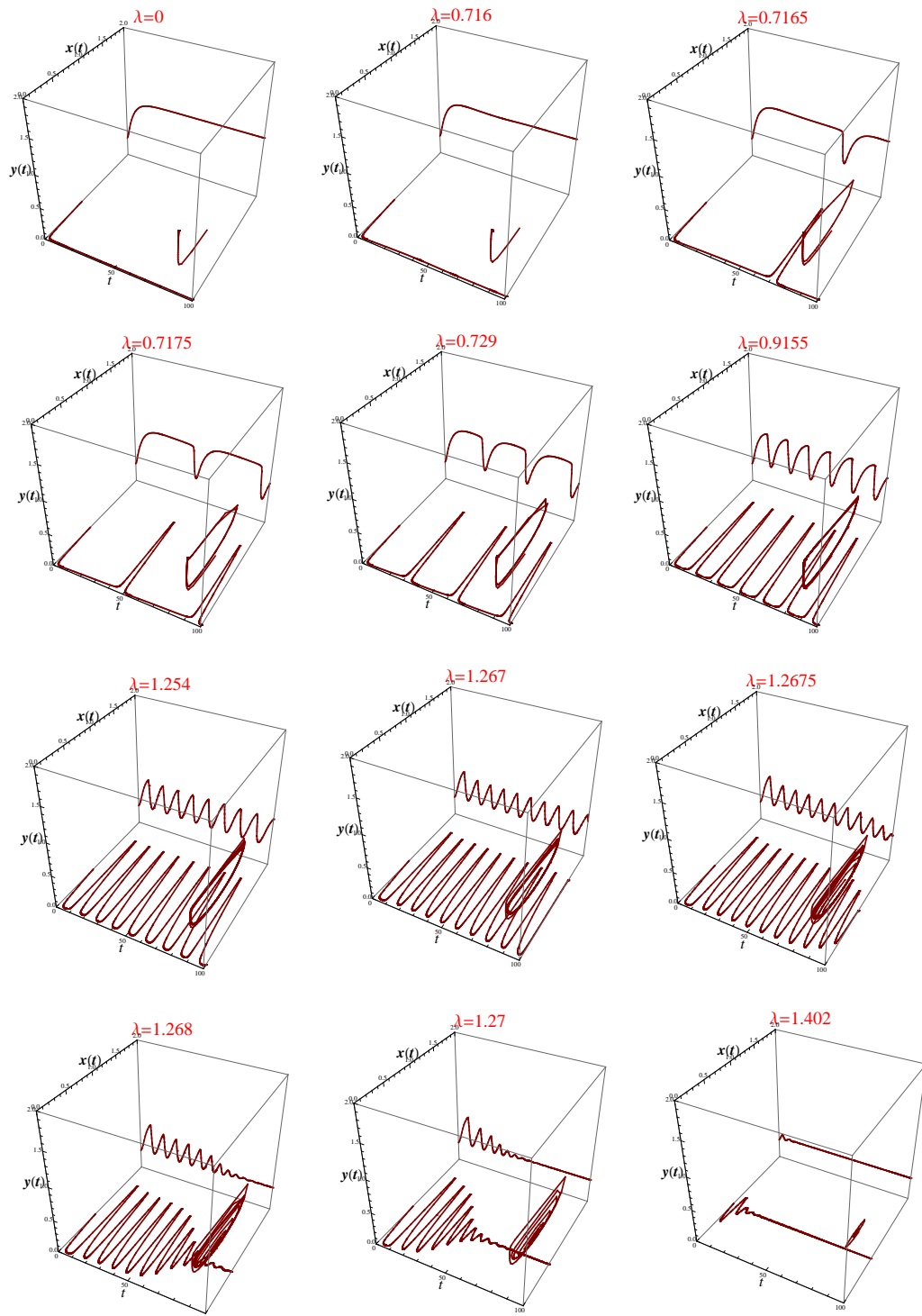
Az egyensúlyi helyzetek stabilitásának vizsgálatánál két olyan paraméterértéket is kaptunk, ahol Andronov-Hopf-bifurkációt figyelhattunk meg: $\lambda_1 = 0.7182$ és $\lambda_2 = 1.1428$.

Ábrázoljuk a trajektóriákat ezen paraméterértékek, valamint két további kitüntetett paraméterérték mellett:



Látszik, hogy λ_1 és λ_2 esetén valóban oszcillál a rendszer, míg $\lambda = 0.6912$ mellett nincs oszcilláció, $\lambda = 1.2673$ értéknél pedig éppen kezd eltűnni.

Szemléltessük mindezt több paraméterérték mellett:



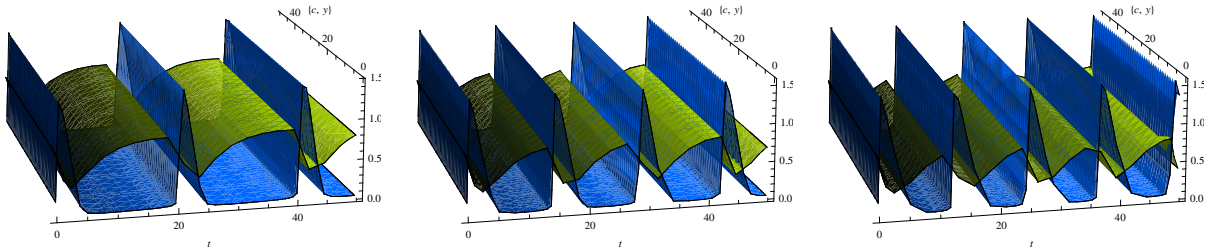
25. ábra. Az egyenlet megoldásainak viselkedése a λ paraméter értékének változtatása mellett. Itt $x(t)$ jelöli a Ca^{2+} -koncentrációt (c).

A 25. ábrán jól látszik, hogy $\lambda = 0.716$ értéknél még nincs oszcilláció, $\lambda = 0.7165$ -nél viszont már megjelent egy periodikus pálya (a $(c(t), y(t))$ síkon), és ennek megfelelően (a másik két síkon) az oszcilláció is ($\lambda = 0.7165$ -ben nyereg-csomó bifurkáció következett be). $\lambda = 1.267$ -ben még látható oszcilláció, $\lambda = 1.2675$ -ben viszont kezd eltűnni a periodikus pálya és ennek megfelelően az oszcilláció is.

7.2.1. Hogyan változik az oszcilláció frekvenciája és amplitúdója a paraméter függvényében?

Ahhoz, hogy egy biológiai oszcillációt jobban megértsünk, célszerű elemeznünk, hogy a frekvencia és az amplitúdó hogyan változik bizonyos paraméterek (mint pl. a hormonkoncentráció) függvényében. Ez segíthet megmagyarázni az oszcilláció dinamikájának szerepét az információ közvetítésében.

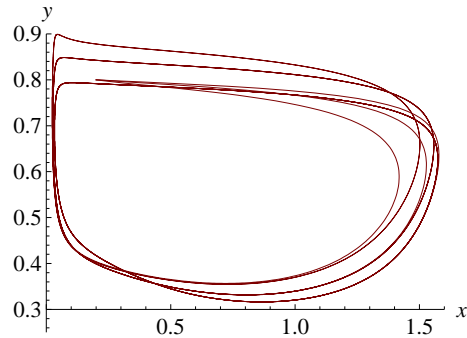
Az előző pontban kaptunk tehát az IP_3 -koncentráció értékeire egy olyan tartományt, amely oszcillációt idéz elő a citoszolikus Ca^{2+} -koncentrációban. Jelölje ezt $[\lambda_0, \lambda_1]$. Nézzük most meg, hogy mi történik ezen intervallumon belül. Ábrázoljuk ehhez c és y értékét az idő függvényében (26).



26. ábra. A citoszolikus szabad Ca^{2+} -koncentráció és a szabad Ca^{2+} -inaktivációs domének hányada az idő függvényében három különböző $\lambda \in [\lambda_0, \lambda_1]$ -érték mellett.

Jól látható, hogy λ értékének növelésével nő a Ca^{2+} -tüskék frekvenciája is. Megfigyelhetjük továbbá azt is, hogy adott λ érték mellett a szabad Ca^{2+} -inaktivációs domének aránya a Ca^{2+} -koncentráció meredeken növekvő szakaszán éri el maximumát, ezzel alátámasztva azt a tényt, hogy a Ca^{2+} -csatorna nyitásához szabad inaktivációs doménre van szükség.

A (c, y) síkra való vetületet ábrázolva viszont az is látszik, hogy az amplitúdó közel változatlan marad λ különböző értékei mellett (27. ábra).



27. ábra. Itt $x(t)$ jelöli a Ca^{2+} -koncentrációt (c).

Mindez azt jelenti, hogy az IP_3 -koncentráció azon tartományán belül, ahol oszcilláció létrejön, a Ca^{2+} -tűskék nagysága (vagyis a citoszolikus szabad Ca^{2+} -koncentráció hirtelen megnövekedett értékének nagysága) közel érzéketlen a IP_3 -koncentrációra, míg a tűskék gyakorisága növekszik, vagyis gyorsabban változik az említett ionok koncentrációja a citoszolban, ha az IP_3 -koncentráció értékét növeljük.

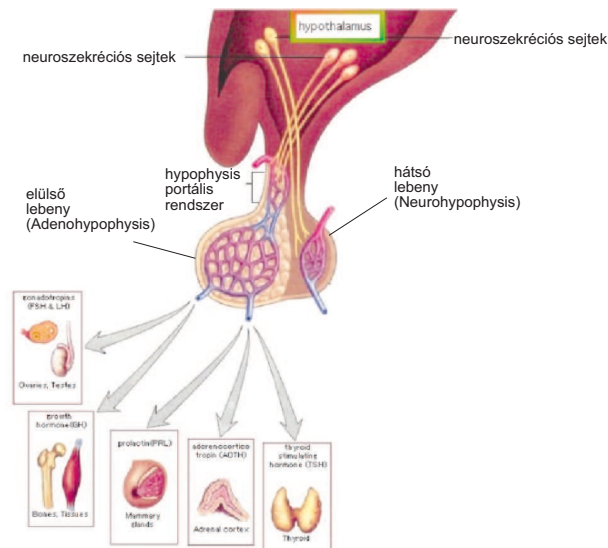
Mivel gyakran az oszcilláció sebessége szabályozza a sejt szekréciós (elválasztó) aktivitását (gyorsabb oszcilláció a szekréciós aktivitás fokozódásához vezet, lassabb oszcilláció a csökkenéséhez) a fentiek ismeretében a kívánatos módon befolyásolhatjuk a sejt működését.

8. A Ca^{2+} -oszcilláció szerepe az ovuláció szabályozásában

A fentiekben többször is utaltam arra, hogy a Ca^{2+} -oszcilláció során vizsgált paraméter lehet egy bizonyos hormon koncentrációja. Itt egy ilyen példát mutatok be, nevezetesen, a GnRH hormon hatására bekövetkező oszcillációval foglalkozom, melynek eredményeként felszabaduló hormonok az ovuláció folyamatát közvetlenül szabályozzák.

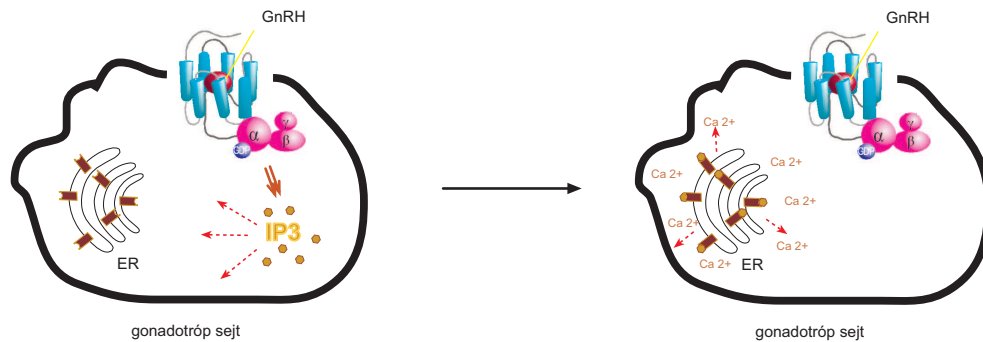
8.1. Biológiai háttér

A hypothalamus az agyvelő köztiagy részéhez tartozik, olyan idegsejtek (neuronok) építik fel, melyek azzal a speciális tulajdonsággal rendelkeznek, hogy hormonokat, így például releasing (felszabadító) hormonokat képesek szintetizálni. A hypothalamus releasing hormonjai a véráramba kerülve a hypothalamo-hypophyseális rendszer hajszálérhálózatán keresztül jutnak el a hypophysis (agyalapi mirigy) elülső lebenyébe (adenohypophysis), ahol hatásukra a megfelelő hypophysis hormonok kiválsztódnak. Ezen hormonok csoportjába tartozik a Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) is, amely az agyalapi mirigy gonadotróp sejtjeire hat, folliculus-stimuláló (FSH) és luteinizáló (LH) hormon felszabadulását eredményezve.



28. ábra. Hypophysis. A hypothalamusban termelődő GnRH a hypophysis elülső lebenyében található gonadotróp sejtjeire hat, melyekből ennek következtében LH hormon szabadul fel.

A GnRH a gonadotróp sejt G-fehérjéhez kötött receptorához kapcsolódik, ezzel beindítva egy másodlagos hírvívő kaszkádot, melyben hírvívőként IP_3 szabadul fel. Ez az endoplazmás retikulum Ca^{2+} -csatornáihoz (IP_3R -hoz) kötődik, amelyek ennek hatására kinyílnak, és Ca^{2+} áramlik a citoszolba (29. ábra).



29. ábra. A GnRH a gonadotróp sejt membránjában található receptorhoz kötődik, ez IP_3 felszabadulását eredményezi, mely az endoplazmás retikulum Ca^{2+} -csatornáihoz kötődve Ca^{2+} -kiáramlást indukál.

Az így létrejövő citoszolikus Ca^{2+} -oszcilláció váltja ki az LH-tartalmú vezikulák kiürülését. Az LH-koncentráció hirtelen növekedése (LH-hullám) pedig elindítja az ovuláció folyamatát.

Az LH-hullámok szekréciós gyakorisága a GnRH-szekréció frekvenciájának függvénye. Az ún. Kallmann's-szindrómában, amikor a GnRH endogén termelése hiányzik, infertilitás (terméketlenség) alakul ki. A betegség állandó frekvenciájú GnRH-adagolással sikeresen kezelhető. A frekvenciafüggés egy természetes mechanizmussal úgy kódolható, hogy a receptorok az ingerléssel szemben érzéketlenné, majd ismét érzékennyé válnak. A gonadotróp sejtekben mind a GnRH-receptorok, mind pedig az IP_3 receptorok képesek erre a de-, illetve reszenzitizálódásra. Az alábbiakban a gonadotróp sejtek intracelluláris calcium-dinamikájának olyan modelljét mutatom be, amelyben a receptorok IP_3 iránt érzéketlenné válhatnak [Tien et al., 2005].

8.2. A módosított modell

A Li és Rinzel által leírt rendszer a gonadotróp sejtek azon tulajdonságát ragadja meg, hogy képesek az IP_3 mennyiségének változására calcium-oszcillációval válaszolni. A modell azonban nem mutat frekvenciafüggést a sejtek válaszában, így itt a GnRH folytonos adagolása folytonos Ca-oszcillációt és szekréciós aktivitást eredményez. A gonadotróp sejteken végzett *in vivo* és *in vitro* kísérletek mérési eredményei azonban másra engednek következtetni. Hasonlóan, a Kallmann's szindróma sikeres kezeléséhez is a GnRH pulzáló adagolására van szükség. Ezért itt egy olyan kiegészített modellt mutatok be, amely már magában foglalja a frekvenciafüggést is [Tien et al., 2005]. A szerzők Li és Rinzel modelljét annyiban módosították, hogy a Ca^{2+} -aktivációs, Ca^{2+} -inaktivációs és IP_3 -aktivációs domén mellett feltételeztek egy IP_3 -inaktivációs domént is az IP_3R alegységein belül. Jelölje z ezen inaktivációs domének közül a szabadok hányadát.

8.2.1. Az egyenletrendszer

Így a következő egyenletrendszert kapták:

$$\begin{aligned}\dot{x} &= \frac{f_i}{V_i} \left(\left(L + P \left[\left(\frac{\lambda}{\lambda + K_i} \right) \left(\frac{x}{x + K_a} \right) y \right]^3 \right) z \left(\frac{C_t}{\sigma} - x \left(1 + \frac{1}{\sigma} \right) \right) - \frac{V_s x^2}{x^2 + K_s^2} \right) \\ \dot{y} &= A (K_d (1 - y) - xy) \\ \dot{z} &= \varepsilon (-\alpha(\lambda)z + \beta(\lambda, c)(1 - z))\end{aligned}$$

Az első egyenletben az IP_3 -függő Ca^{2+} -csatorna vezetőképességében megjelenik z , ezzel jelezve, hogy a Ca^{2+} -csatorna nyitásához szükség van a szabad IP_3 -inaktivációs doménre. Az újonnan bevezetett jelölések:

$\alpha(\lambda)$: az IP_3 deszenzitizálódási sebessége,

$\beta(\lambda, c)$: az IP_3 reszenzitizálódási sebessége,

c : a reszenzitizációs sebességet érintő paraméter, melynek finom változtatásával hangolni tudjuk a sejt IP_3 -pulzusokra adott válaszábanak frekvenciafüggését a menstruációs ciklus alatt.

8.2.2. IP_3 -pulzus

Mind a menstruációs ciklus, mind pedig a Kallmann's szindróma kezelése során a GnRH plazmakoncentrációja pulzáló jelleggel változik. Mivel a GnRH indukálja az IP_3 termelést, λ is pulzáló jelleggel fog változni, a modellünkben ez lesz a vizsgált paraméter. Ezen pulzusok szimulálása céljából λ időbeli függését négyzögjellel adjuk meg:

$$\lambda(t) = \begin{cases} 0 & 0 \leq t < T_a \\ \hat{\lambda} & T_a \leq t < T_a + T_p, \end{cases}$$

ahol T_p az az időtartam, amikor IP_3 jelen van, T_a pedig az az időtartam, amikor IP_3 nincs jelen. A teljes IP_3 -pulzus periódusa tehát $T_a + T_p$. A menstruációs ciklussal összhangban az említett időintervallumok a GnRH jelenlétét illetve hiányát jelentik (T_a időskálájának egysége óra (h), míg T_p időskálájának egysége perc (min)). A gonadotrop sejtek a GnRH felszabadulására Ca^{2+} -oszcillációval válaszolnak, ezért $\hat{\lambda}$ -t az előző fejezetben meghatározott $[\lambda_0, \lambda_1]$ intervallumból választjuk. Számunkra az LH-szekréciónak folyamata érdekes, mert ez a hormon felelős az ovuláció beindításáért. Minden egyes "Ca²⁺-tüske" LH-tartalmú vezikulák excitációját váltja ki, ám ennek pontos mechanizmusa még nem ismert. Így azt az egyszerűsítő feltevést alkalmazzuk, hogy az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció (x) a sejt szekréciónak aktivitásának mutatója.

8.2.3. Következtetések

A modell részletes matematikai tárgyalására itt nem térek ki, de elmondható, hogy Li és Rinzel modelljét kiegészítve az IP_3 receptor IP_3 iránti deszenzitizálódásával (vagyis egy IP_3 -inaktivációs domént bevezetve a korábban leírt IP_3 -aktivációs, Ca^{2+} -aktivációs és Ca^{2+} -inaktivációs domén mellett) a várakozásnak megfelelően olyan rendszert kapható, amelyben a sejt IP_3 -ra adott válasza már frekvenciafüggő folyamat. A GnRH endogén termelésének frekvenciája a normál menstruációs ciklus alatt folyamatosan változik, míg a Kallmann's szindróma a GnRH rögzített amplitúdójú és frekvenciájú adagolásával kezelhető. Mindkét esetben a reszenzitizációs rátát (c) a ciklus alatt változtatva magyarázatot kapunk az LH-hullám kialakulására.

Az LH-hullám egy nagymértékű, hirtelen növekedés az LH szérumbeli koncentrációban, melyet a gonadotrop sejt GnRH-pulzus alatt bekövetkező megnövekedett szekréciós aktivitása okoz. A hullám kiváltja az ovulációt. Feltételezhető tehát, hogy x -re létezik olyan küszöbérték, amely felett az ovuláció folyamata beindul. A cikk ([Tien et al., 2005]) alapján megfelelően nagy c érték esetén létezik T_a -knak olyan tartománya, amelyre az LH-hullám kialakul, és ez az intervallum c növekedésével növekszik. A maximális c érték a maximális szekréciós aktivitásnak felel meg.

Mivel a hullám a ciklus közepén alakul ki, feltételezzük, hogy c is ekkor éri el a maximumát, azután pedig csökken. Ezt követően a T_a értékek azon tartománya, amely LH-hullám kialakulásához vezet, szintén elér egy maximális értéket. Ez a maximális tartomány felelhet meg a Kallmann's szindróma kezelése során alkalmazott frekvenciatartomány (a kezelés során alkalmazott frekvenciatartomány tapasztalati adatokra épül). Megjegyezzük, hogy a modell nem igényli a hypothalamuszból felszabaduló GnRH mennyiségének változását az LH-hullám kialakulásának indoklása érdekében. Ehelyett a hullámot, mint tisztán frekvenciafüggő jelenséget mutatja be.

A Kallmann's szindróma kezelésének eredménye nem azonnali. Ha a GnRH-t az imént említett frekvenciatartományba eső frekvenciával adagoljuk, a ciklus közepén LH-hullám fog kialakulni (1–2 hét múlva).

Némileg bonyolultabb a helyzet a normál menstruációs ciklus esetén, amikor a GnRH-pulzusok frekvenciája a ciklus ideje alatt változik. Az ovulációt megelőzően a pulzusok frekvenciája enyhén megemelkedik 1 pulzus óránkénti értékre, majd az ovuláció után gyorsan lecsökken 1 pulzus néhány óránkénti értékre. Változzon c most is olyan módon, hogy miután elér egy maximális értéket, csökken a ciklus végéig. Így egyszerre van egy I intervallumunk T_a azon értékeire, amelyek az LH-hullám kialakulásához vezetnek, és T_a -nak egy csökkenő értéke. Az ovuláció akkor következik be, amikor T_a beleesik az I intervallumba.

Az IP_3 receptorok fent leírt szabályozását a gyakorlatban is megfigyelték. Kötött IP_3 receptorokat ubiquitinnel jelöltek. Az IP_3 -receptor szintézise sebességének, vagy a proteozóma aktivitásának változtatása két olyan mechanizmus, amelyek által befolyásolható a de- és reszenzitizációs sebesség. Nem ismert, hogy az ubiquitinnel ellátott receptorok működőképesek-e. Ha nem működőképesek, akkor az ubiquitin bekötődése, illetve leválása sebességének változtatása két további lehetséges szabályozó mechanizmus. Sok hatást gyakorló tényező jöhet szóba minden

egyes mechanizmus esetén. Egy lehetséges ilyen tényező a gonadotrop sejtekben a petefészek ösztadiol szteroidja. Az ösztadiolról ismert, hogy befolyásolja az agyalapi mirigy GnRH-ra való érzékenységét, és az ösztadiol sérumbeli koncentrációja tipikusan az LH-hullám napján, vagy az ezt megelőző napon éri el csúcserőértékét.

Az alapötlet, hogy a receptor deszenzitizációja és reszenzitizációja a menstruációs ciklus alatt frekvenciafüggő folyamat, nem új koncepció. Dupont és mtsai [Dupont et al., 1991] az egyenletek felírása nélkül megemlítik az intracelluláris Ca^{2+} egy olyan dinamikai modelljét, amely magába foglalja az IP_3 -receptorok IP_3 iránti deszenzitizációját. Egy, az IP_3 -receptor IP_3 iránti deszenzitizálódására vonatkozó modell tervezése, és ennek a menstruációs ciklus vonatkozásában történő elemzése, mint ahogy ezt itt is tettük, néhány biológiai eljárást sugall, amilyen például a reszenzitizációs ráta szabályozása, amely fontos szerepet játszhat a szaporodási folyamatokban.

9. Összegzés

Munkám során azt a célt tűztem ki magam elé, hogy mind biológiai mind matematikai szempontból átfogó képet adjak az élő sejtekben megfigyelhető Ca^{2+} -koncentráció változásának dinamikáját leíró modellekről. Ez a diplomamunka korlátozott terjedelme miatt korántsem bizonyult egyszerű feladatnak. Fontosnak tartottam azonban, hogy a leírtak a témában esetleg kevésbé járatos olvasók számára is közérthetőek legyenek. Céлом volt elsőként a témához kapcsolódó szakirodalom részletes és kimerítő feldolgozása. Ez sajnos a vártnál több időt igényelt, de egyben világossá is tette azt, hogy munkámat mely irányban lenne érdemes folytatni. Mindenképpen fontosnak tartottam, hogy legalább egy, alapvető fontosságú matematikai modell analízise is bemutatásra kerüljön. Választásom azért esett De Young és Keizer modelljére, mert bár segítségével a kísérleti úton mért adatokat nem lehet tökéletesen reprodukálni, mégis egy hasznos kiindulási alapot nyújtott új, jobb predikciós erővel bíró modellek megtervezéséhez. Munkám során a *Mathematica* segítségével vizsgáltam egy ilyen modellt, a determinisztikus Li-Rinzel-modell egy, a gonadotrop sejtekre alkalmazható változatát. Megkerestem az egyensúlyi helyzeteket és periodikus pályákat, valamint vizsgáltam az egyensúlyi helyzetek stabilitását is. A periodikus pályák keresése, illetve vizsgálata azért fontos, mert meglettük a Ca^{2+} -koncentráció időben periodikus változására, oszcillációjára utal. A [Tien et al., 2005] cikkben közölt adatokat sikeresen reprodukáltam. Míg az említett cikk szerzői egy programcsomag segítségével végezték számításaikat, komolyabb matematikai tárgyalás nélkül közölték eredményeiket, addig én fontosnak tartottam, hogy az általam elvégzett számítások elméleti háttere egzakt, világos legyen. A *Mathematica* használata kevésbé elterjedt ezen a területen, annak ellenére, hogy nagy előnyét látom többek között szimbolikus számítási erejében. Bár a dolgozat főként numerikus számolásokat tartalmaz, a program ilyen esetben is megállja a helyét. Segítségével szemléletes ábrák, animációk készíthetők melyek segítségével a tárgyalt rendszerek kvalitatív viselkedése jól nyomonkövethető.

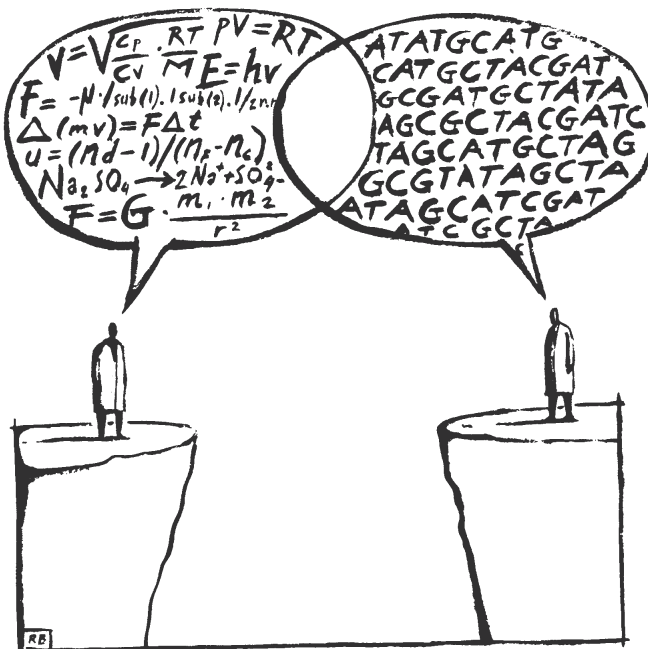
A rendszer további megismeréséhez modellezési és kísérleti munkát egyaránt tervezek. Több, már létező modell bifurkáció-analízisének elvégzésével és sztochasztikus modelljeinek tanulmányozásával elsődleges célként egy olyan modell tervezését tűztem ki, amely a legjobban közelíti a neuronokon mért eredményeket. Ígéretesnek mutatkozik a sztochasztikus modellezés szempontjából az egyes csatornák működésének tanulmányozása patch-clamp technikával.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Tóth Jánosnak végtelen türelméért, magas színvonalú szakmai segítségnyújtásáért és éveken át kitartó töretlen bizalmáért.

Hálával tartozom továbbá a European Scientific Foundation szervezetnek, hogy az általuk támogatott FUNCDYN program keretében részt vehettem egy, a Ca^{2+} -dinamikával foglalkozó nemzetközi workshop-jukon.

A dolgozat részben az OTKA támogatásával készült (NK 63066).

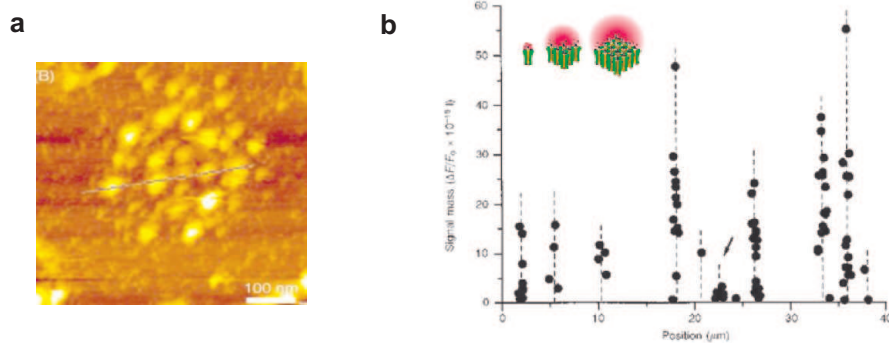


10. Függelék

10.0.4. Sztochasztikus modellek

Az IP_3R -ok eloszlása a sejtben nem homogén, egymástól 1-7 μm távolságban elhelyezkedő custerekbe csoportosulnak. Az egy clusterben található receptorok pontos száma még ismeretlen, de 5 és 100 közötti értékre becslik. Ennél pontosabb eredményről, 5-40 méretű clusterekről számolt be Swillens és mtsai.

[Swillens et al., 1999], frissebb adatokat pedig [Shuai et al., 2006] olvashatunk. A clusterok kis méretének következménye, hogy egy cluster állapota a benne található csatornák állapotának függvényében erősen fluktuál. Így a clusteren keresztüli Ca^{2+} -kiáramlás, melyet a benne található nyitott csatornák száma határoz meg, általában nem szabályosan oszcillál. Mind a tüskék között eltelt idő, mind pedig a tüskék amplitúdója erősen változik. Ez a modellezés szempontjából azt vonja maga után, hogy a kapuzásra felírt determinisztikus egyenleteket sztochasztikus megfelelőikkel kell helyettesíteni.



30. ábra. Clusterek

A sztochasztikus folyamatok eszköztára különféle módszereket kínál erre a célra [Gardiner, 2004], [van Kampen, 2001], [Risken, 1984].

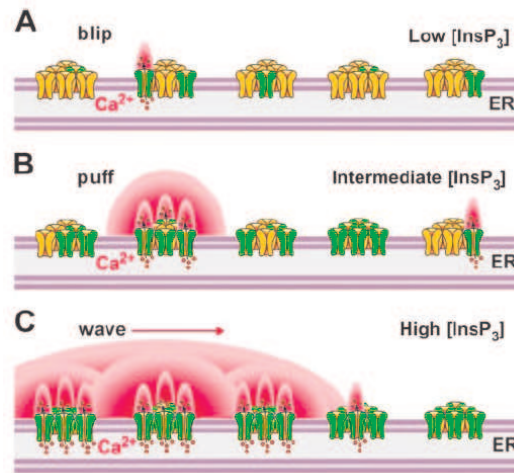
10.0.5. Ca^{2+} -hullámok

Az oszcilláció gyakran intra- (sejten belüli), illetve intercelluláris (sejtek közötti) hullámokba rendeződik. Ez a térbeli mintázatképződés az egzotikus kémiai reakciók számos érdekes tulajdonsága közé tartozik. Ilyenkor a térben monoton inhomogén kezdeti koncentrációeloszlás maximumokkal és minimumokkal rendelkező mintázatot vehet fel, térben terjedő koncentrációfrontok alakulnak ki. A Ca^{2+} -szint periodikus emelkedése és csökkenése tehát hullámszerűen tovaterjed, a sejt különböző részein különböző időpontban nő meg a Ca^{2+} koncentrációja.

Hogyan alakulnak ki a hullámok? A Ca^{2+} -raktárak a sejtben szétszórtan helyezkednek el. Ahogy azt a korábbiakban említettük, az IP_3R -ok elrendeződése az endoplazmatikus retikulum membránjában inhomogén. A hullám kiindulási pontján a fentiekben ismertett módon elkezdenek kiáramlani a Ca^{2+} -k, majd ezeknek egy része diffúzióval lassan elhagyja a kiáramlás helyét, és a szomszédos receptorokra fejti ki aktiváló hatását (CICR). Így mire a kiáramlás helyén olyan mértékben megnő a Ca^{2+} -k koncentrációja, hogy az (a fentiekben leírt gátlás következtében) ott a csatornák bezárulását okozza, a távolabbi receptoroknál a Ca^{2+} -szint éppen az aktiváló tartományban lesz, tehát ott az odadiffundáló Ca^{2+} -k felgyorsítják a kiáramlást. A Ca^{2+} -front előtt tehát az aktiválandó, mögötte pedig az inaktivált csatornák találhatók. (31.ábra)

Az sejten belüli (intracelluláris) Ca^{2+} -hullámoknak két típusa van: a nagyobb méretű sejtekben, mint pl. az oocytákban (éretlen petesejt) egy keskeny sávban emelkedik meg a Ca^{2+} -koncentráció, és ez a Ca^{2+} -front halad végig a citoplazmában, míg a kisebb méretű sejtek esetében jellemzőbb, hogy a Ca^{2+} -szint rövid időre a teljes citoplazmában megnő, és ilyenkor a szintemelkedés frontja terjed tova a sejtben.

A hullámok tulajdonságait tekintve érdekes megfigyelés, hogy az inger erőssége a terjedés sebességét alig befolyásolja, tehát különböző intenzitású ingerlés esetén is kb. ugyanolyan gyorsan terjednek a hullámok, az inger erőssége azt befolyásolja, hogy milyen gyakorisággal követik egymást a hullámfrontok. Megfigyelték továbbá azt is, hogy a hullámok gyakran a sejtnek ugyanarról a pontjáról (a sejt felszín közeléből) indulnak, melyet nem csupán a kémiai inger erőssége, hanem annak típusa sem befolyásol.



31. ábra. Az IP₃R-ok viselkedése az IP₃ növekvő koncentrációjának jelenlétében. Az IP₃R-ok clusterekbe csoportosulnak. A: alacsony IP₃-koncentráció esetében néhány receptor (zöld) IP₃-t köt. A többihez (sárga) nem kötődött IP₃, ezért ezek inaktív állapotban vannak. Így erősen lokalizált, kis Ca²⁺-jelek ("blip") alakulnak ki a néhány csatornán keresztül kiáramló Ca²⁺ következtében, ezzel növelve a citoszol Ca²⁺-koncentrációját (piros). B: Magasabb IP₃-koncentráció mellett az egy csatornából kiáramló Ca²⁺ a CICR mechanizmusán keresztül a szomszédos csatornákat aktiválja, ezzel Ca²⁺ egy clusteren belül több csatorna együttes nyitását eredményezi ("puff"). C: Még magasabb IP₃-koncentráció globálisan terjedő Ca²⁺-jeleket (hullámokat) vált ki. Az egy clusteren keresztül felszabaduló Ca²⁺ a szomszédos clustereket is aktiválja a CICR mechanizmusán keresztül. Mindez az egymást követő ciklusokban felszabaduló Ca²⁺, diffúzió és CICR folyamatán keresztül terjedő Ca²⁺-hullámok kialakulását eredményezi.

A sejtben belül terjedő Ca²⁺-hullámok szerepe valószínűleg az, hogy az inger keltette kalciumjelet a sejt minden részébe eljuttassák. Széles körben elfogadott, hogy ezek a hullámok lehetővé teszik a sejt különböző oldalai, illetve a sejtek közötti kommunikációt, ezzel kialakítva egy lokális stimulusra adott szinkronizált globális választ.

Hivatkozások

- [Atri et al., 1993] Atri, A., Amundson, J., Clapham, D. & Sneyd, J., 1993. A single pool model for intracellular calcium oscillations and waves in the *Xenopus laevis* oocyte. *Biophys. J.* **65**, 1727–1739
- [Bezprozvanny et al., 1991] Bezprozvanny, I., Watras J. & Ehrlich, B. E., 1991. Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)-P₃-and calcium gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* **351**, 751–754
- [Cutherson, Cobbold, 1985] Cuthbertson, K. S., és P. H. Cobbold., 1985. Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscillations in cell Ca²⁺. *Nature.* **316**, 541–542.
- [DeYoung, Keizer, 1992] De Young, G. W., Keizer, J., 1992. A single-pool inositol 1,4,5-triphosphate-receptor-based model for agonist-stimulated oscillations in Ca²⁺ concentration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9895–9899
- [Dupont et al., 1991] Dupont, G., Berridge, M. J., Goldbeter, A., 1991. Signal-induced oscillations: properties of a model based on Ca-induced Ca-release. *Cell Calcium* **12**, 73–85
- [Finch et al., 1991] Finch, E. A., Turner, T. J. & Goldin, S. M., 1991. Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. *Science* **252**, 443–446
- [Gardiner, 2004] Gardiner, C., 2004. Handbook of Stochastic Methods, 3rd edn. *Springer, Berlin*
- [Iino, 1990] Iino, M., 1990. Biphasic Ca²⁺ dependence of 1,4,5-trisphosphate induced Ca²⁺ release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia caeci. *The Journal of General Physiology* **95(6)**, 1103–1122

- [LeBeau et al., 1999] LeBeau, A. P., Yule, D. I., Groblewski, G. E. & Sneyd, J., 1999. Agonist-dependent phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: a possible mechanism for agonist-specific calcium oscillations in pancreatic acinar cells. *J. Gen. Physiol.* **113**, 851–872
- [Li, Rinzel, 1994] Li, Y. X., Rinzel, J., 1994. Equations for InsP receptor mediated $[Ca^{2+}]_i$ -oscillations derived from a detailed kinetic model: a Hodgkin–Huxley like formalism. *J. theor. Biol.* **166**, 461–473
- [O’Doherty et al., 1980] O’Doherty, J., S. J. Youmans, W. M. Armstrong, R. J. Stark., 1980. Calcium regulation during stimulus-secretion coupling: continuous measurement of intracellular calcium activities. *Science.* **209**, 510-3
- [Moraru et al., 1999] Moraru, I. I., Kaftan, E. J., Ehrlich, B. E. & Watras, 1999. Regulation of type 1 Inositol 1,4,5-trisphosphate-gated calcium channels by Ins and calcium: simulation of single channel kinetics based on ligand binding and electrophysiological analysis. *J. Gen. Physiol.* **113**, 837–849
- [Parker, Ivorra, 1990] Parker, I., Ivorra, I., 1990. Inhibition by $[Ca^{2+}]_i$ of inositol trisphosphate-mediated $[Ca^{2+}]_i$ liberation: a possible mechanism for oscillatory release of Ca^{2+} . *Proc. Natl Acad. Sci.* **87**, 260–264
- [Poledna, 1991] Poledna, J., 1991. Mechanism of intracellular calcium transients. *Gen. Physiol. Biophys* **10**, 475–484
- [Poledna, 1993] Poledna, J., 1993. Mechanism of intracellular calcium oscillations activated by inositol trisphosphate. *Gen. Physiol. Biophys* **12**, 381–389
- [Risken, 1984] Risken, H., 1984. The Fokker-Planck equation. *Springer, Berlin*

- [Schuster et al., 2002] Schuster, S., Mahrl, M., Hofer, T., 2002. Modelling of simple and complex calcium oscillations. *Eur. J. Biochem.* **269**, 1333–1355
- [Sherman et al., 2002] Sherman, A. S., Li, Y.X., Keizer, J. E., 2002. Whole cell models. *Computational Cell Biology Springer, New York*, pp. 101–139
- [Shuai et al., 2006] Shuai, J., Rose, H.J., Parker, I., 2006. The number and spatial distribution of IP₃ receptors underlying calcium puffs in *Xenopus* oocytes. *Biophysical Journal*, **91(11)**, pp. 4033–4044
- [Sneyd, Falcke, 2005] Sneyd, J., Falcke, M., 2005. Models of the inositol trisphosphate receptor. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **89(3)**, 207–45
- [Strogatz, 1994] Strogatz, S.H., 1994. Nonlinear Dynamics and Chaos: With Applications in Biology, Chemistry, and Engineering. Reading, MA. *Westview Press*.
- [Swillens et al., 1999] Swillens, S., Dupont, G., Combettes, L., Champeil, P., 1999. From calcium blips to calcium puffs: theoretical analysis of the requirements for interchannel communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96:13**, 750–13, 755
- [Thul et al., 2008] Thul, R., Bellamy, T. C., Roderick, H. L., Bootman, M. D., and Coombes, S., 2008. Calcium oscillations. *Adv. Exp. Med. Biol.* **641**, 1–27
- [Tien et al., 2005] Tien, J. H., Lyles, D., Zeeman, M.L., 2005. A potential role of modulating inositol 1,4,5-triphosphate receptor desensitization and recovery rates in regulating ovulation. *J. theor. Biol.* **232**, 105–117
- [Tóth, Simon, 2005] Tóth, J., Simon, P., 2005. Differenciálegyenletek. Bevezetés az elméletbe és az alkalmazásokba. *Typotex, Budapest* 2005, 101-139

- [Ueda et al., 1983] Ueda, S., S. Oiki, és Y. Okada., 1983. Cyclic changes in cytoplasmic free Ca^{2+} during membrane potential oscillations in fibroblasts. *Biomed. Res.* **4**, 231–234.
- [van Kampen, 2001] van Kampen, N., 2001. Stochastic Processes in Physics and Chemistry. *North-Holland, Amsterdam*
- [Woods et al., 1986] Woods, N. M., K. S. Cuthbertson, P. H. Cobbold., 1986. Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature.* **319**, 600-2.