

УДК 578:621.039.85:681.3

**МЕТОДИКА РАЗЛОЖЕНИЯ КРИВЫХ КИНЕТИКИ
СОВМЕСТНОГО ПОГЛОЩЕНИЯ И ВЫДЕЛЕНИЯ
НЕСКОЛЬКИХ МЕЧЕНЫХ ИОНОВ КЛЕТКАМИ КОРНЕЙ КУКУРУЗЫ
С ПРИМЕНЕНИЕМ МИНИ-ЭВМ**

**Б. И. ШКАРИН, Ю. Я. МАЗЕЛЬ, В. В. РАЧИНСКИЙ
(Кафедра прикладной атомной физики и радиохимии)**

Механизм минерального питания растений давно привлекает внимание исследователей. В работах, посвященных этой проблеме, в основном приводятся данные о поглощении или выделении какого-либо одного элемента минерального питания и практически отсутствуют данные о совместном поступлении в растение нескольких меченых ионов в динамике. Развитие инструментальных методов ядерной физики на базе современной микропроцессорной техники открывает все большие возможности их применения в различных областях научных исследований [4]. Введение микро- или мини-ЭВМ непосредственно в измерительный

комплекс в режиме «он-лайн» позволяет управлять проведением эксперимента, регистрировать необходимые параметры, обрабатывать получаемые данные и выдавать окончательную или промежуточную информацию в цифровом или графическом виде. Указанные выше возможности компьютерной аппаратуры были использованы при разработке методики регистрации динамических процессов, в которых принимает участие несколько радионуклидов [7].

В данном сообщении рассматривается пример разложения на составляющие кривых совместного поглощения и выделения меченых ионов Ca^{2+} (^{85}Sr), K^+ (^{86}Rb) и

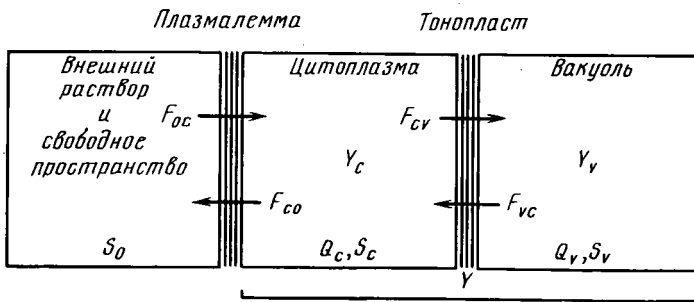


Рис. 1. Трехкомпарментальная модель растительной клетки (экспликация дана в тексте).

Na^+ (^{22}Na), полученных на основе гамма-спектрометрических измерений. Известно, что поведение К, Са и Na в ряде случаев играет существенную роль в балансе элементов минерального питания растений. К сожалению, гамма-спектрометрические измерения радионуклидов Са и К связаны с определенными трудностями. Если Na имеет гамма-излучающий изотоп ^{22}Na , то радиоактивный изотоп ^{45}Ca является чистым бета-излучателем, а гамма-излучающие изотопы ^{42}K и ^{43}K обладают очень коротким периодом полураспада и их использование в длительных экспериментах осложняется. Однако поступление ионов Sr^{2+} и Rb^+ в растительную клетку во многом сходно с поступлением соответственно Ca^{2+} и K^+ [9—11, 13—15, 20]. Изотопы ^{85}Sr и ^{86}Rb , используемые как неизотопные индикаторы, наряду с бета-излучением испускают и гамма-излучение, которое может быть зарегистрировано гамма-спектрометром. Поэтому в качестве метки для изучения кинетики взаимовлияния Са, К и Na в отдельных корнях кукурузы нами были выбраны радиоактивные изотопы ^{85}Sr , ^{86}Rb и ^{22}Na .

Ниже представлен алгоритм обработки данных, полученных по методике, описанной в работе [7]. Все расчеты проводились в режиме «оф-лайн» на мини-ЭВМ «MULTI-4», на базе которой создан программируемый многоканальный амплитудный анализатор «IN-90» фирмы «Intertechnique» (Франция).

Для определения значений ионных потоков через мембраны клетки чаще всего используют трехкомпарментальную модель клетки, схема которой дана на рис. 1. Транспорт ионов в рассматриваемой модели растительной клетки может быть описан системой дифференциальных уравнений, характеризующих кинетику поглощения и выделения ионов [21],

$$\frac{dY_c}{dt} = F_{oc}S_0 + F_{vc}S_v - (F_{co} + F_{cv})S_c, \quad (1)$$

$$\frac{dY_v}{dt} = F_{oc}S_0 - F_{co}S_c,$$

где Y — содержание меченого иона; Q — суммарное содержание иона; S — удельная активность; F — поток через мембрану; o , c и v — индексы относятся соответственно к внешнему раствору, цитоплазме и вакуолю. В работе [19] рассмотрены решения этой системы уравнений для двух различных на-

чальных условий: 1) чистый поток $\Phi_{\text{netto}}=0$ (равновесное состояние), 2) чистый поток $\Phi \neq 0$ (квазистационарное состояние). Решением системы (1) для равновесного состояния являются уравнения:

$$Y_n(t) = A_1(1 - e^{-K_1 t}) + A_2(1 - e^{-K_2 t}) = \sum_{i=1}^n A_i(1 - e^{-K_i t}), \quad (2)$$

которое описывает процесс накопления (индекс n) меченых ионов, и

$$Y_v(t) = B_1 e^{-K_1 t} + B_2 e^{-K_2 t} = \sum_{i=1}^n B_i e^{-K_i t}. \quad (3)$$

описывающее процесс выделения (индекс v) меченых ионов. В свою очередь, параметры A_i и B_i , характеризующие содержание ионов в отдельных компарментах, имеют вид

$$A_1 = C(F_{oc} - K_2 Q), \quad (4)$$

$$A_2 = C(K_1 Q - F_{oc}), \quad (5)$$

$$B_1 = A_1(1 - e^{-K_1 T}), \quad (6)$$

$$B_2 = A_2(1 - e^{-K_2 T}), \quad (7)$$

где T — время накопления; K_1 и K_2 — кинетические константы поступления или выхода меченых ионов; $C = S_0 / (K_1 - K_2)$; $Q = (A_1 + A_2) / S_0$.

Метод графического разложения кривых выделения иона на составляющие экспоненты, базирующийся на последовательной линеаризации в полулогарифмическом масштабе экспериментальных данных, был предложен в работе [18]. В результате таких операций определяли параметры B_i и K_i функции (3), аппроксимирующей поведение экспериментальной кривой выделения меченого иона. В работе [1] рассматриваются три различных метода расчета потоков по трехкомпарментальной модели для равновесных и квазистационарных состояний. При использовании каждого метода также требуется определение параметров уравнения (3).

Разложение кривых накоплений элементов в клетке связано с определенными трудностями. Обычно содержание меченого элемента в цитоплазматическом и вакуолярном пулах клетки по кривым накопления, когда насыщение не достигается, оценива-

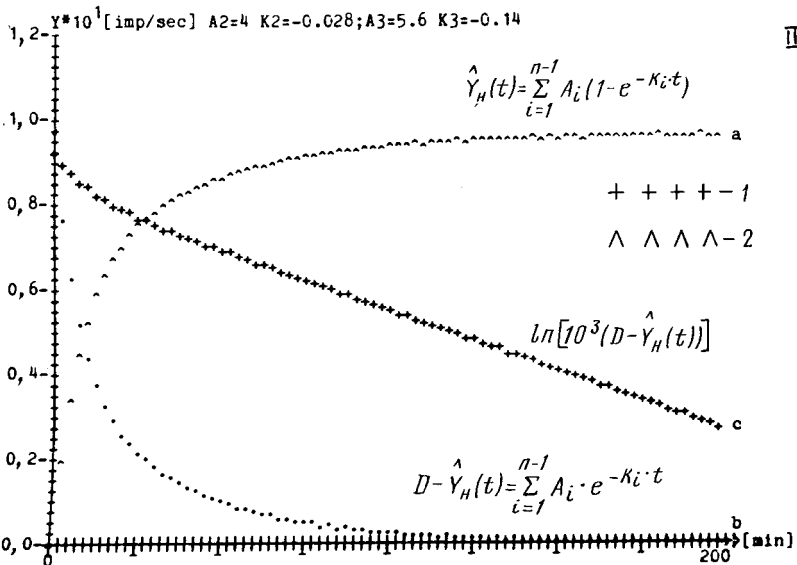
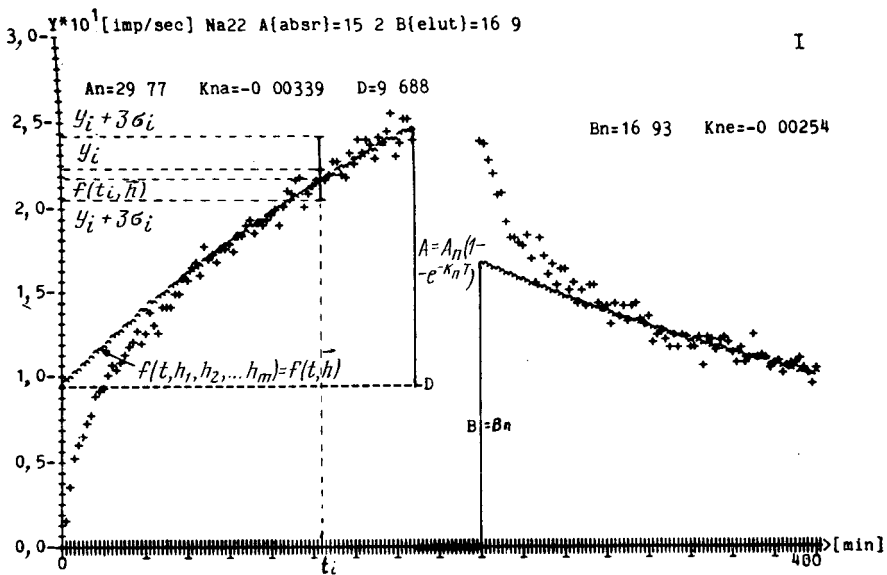


Рис. 3. Графический листинг (I, II) аппроксимации вакуолярных составляющих кривых накопления и выделения меченых ионов $^{22}\text{Na}^+$ в отделенных корнях кукурузы (1 — экспериментальные и 2 — аппроксимирующие кривые); a — кривая с насыщением; b — преобразованная кривая с насыщением; c — логарифм кривой b.

или после преобразований:

$$\sum_{i=1}^n \frac{1}{\sigma_i^2} \left(\sum_{j=1}^m A_{ij} \xi_j \right) A_{ik} = - \sum_{i=1}^n \frac{1}{\sigma_i^2} c_i A_{ik}. \quad (22)$$

Умножим (22) на δ_{ik} , учитывая (18) и $A_{ik} = A_{ki}^T$:

$$\sum_{i=1}^n A_{ki}^T (G_y^{-1} A \vec{\xi})_i = - \sum_{i=1}^n A_{ki}^T (G_y^{-1} \vec{c})_i. \quad (23)$$

Окончательно систему уравнений (16) можно представить:

$$A^T G_y^{-1} A \vec{\xi} = - A^T G_y^{-1} \vec{c}, \quad (24)$$

тогда искомым вектор коррекции $\vec{\xi}$ рассчитывается по матричному уравнению:

$$\vec{\xi} = - (A^T G_y^{-1} A)^{-1} A^T G_y^{-1} \vec{c}. \quad (25)$$

Вычисленный по формуле (25) вектор коррекции $\vec{\xi}$ прибавляется к \vec{h}_0 , и результат используется в качестве следующего приближения $\vec{h}_{0+1} = \vec{h}_0 + \vec{\xi}_1$. Итерационный процесс следует закончить, когда функция M (20) будет слабо изменяться от од-

P PDON

- А. Ввод параметров:
1. Имя файла данных?
 2. Сколько кривых в повторности?
 3. Число точек суммарной кривой?
 4. Число точек кривой накопления?
 5. Вес корней?
 6. Зона корней?
 7. Концентрация по каждому элементу рабочего раствора?
 8. Имеются ли совпадающие пики на γ -спектре?
- В. Считывание экспериментальных данных с гибкого диска (ГД)
- С. Запись экспериментальных данных в графическом виде на ГД.



P PRDQ

Определение параметров вакуолярной составляющей кривых накопления и выделения:

1. Запрос о наличии плато у кривой накопления.
2. Сглаживание данных
3. Запрос о предварительной обработке (F PAUX).
4. Расчет по МНК параметров вакуолярной составляющей кривой накопления [P MSQ (F MATR)].
5. Расчет по МНК параметров вакуолярной составляющей кривой выделения [P MSQ (F MATR)].
6. Расчет и сравнение содержания в вакуоли меченого иона на основе полученных параметров в момент окончания накопления (F PAUX).
7. Вывод в графическом и цифровом виде результатов на экране дисплея для контроля (F PAUX).
8. Вычитание вакуолярных составляющих из исходных данных.



P PRDI

Определение параметров остальных составляющих кривых накопления и выделения.

- А. Обработка отдельной составляющей:
1. Интерполяция оставшихся экспериментальных данных.
 2. Логарифмирование интерполированных данных.
 3. Линеризация логарифмированных данных по МНК.
 4. Расчет на основе полученных параметров отдельной составляющей.
 5. Вывод в графическом и цифровом виде результатов на дисплее для контроля (F PAUX)
 6. Вычитание отдельной составляющей из имеющихся данных.
- В. Повторение пункта А для каждой составляющей.

P PDFI

Подготовка, вывод и запись результатов расчета отдельной повторности по каждому иону:

1. Считывание экспериментальных данных в графическом виде с ГД на дисплей.
2. Расчет эмпирических кривых накопления и выделения и вывод их на дисплей (F EXON).
3. Вывод в графическом виде на одном графике экспериментальных и аппроксимирующих кривых [P GRDE] для каждого иона.
4. Вывод листинга рассчитанных параметров.
5. Запись рассчитанных параметров на ГД для последующей обработки.

ного приближения к другому, т.е. уточнения, получающиеся в результате очередной итерации, будут пренебрежимо малы. Далее на основе промежуточных и конечных результатов можно вычислить ковариационную матрицу неизвестных параметров $G_h^{-1} = (A^T G_y^{-1} A)^{-1}$, у которой квадратные корни из диагональных элементов $\Delta h_j = \sqrt{G^{-1}}_{h_{jj}}$ ($j=1, 2, \dots, m$) рассматриваются как «ошибки измерения» \vec{h}_0 [2], хотя непосредственно эти величины не измеряются. Затем находится вектор уточненных измерений $\vec{\eta}$

$$\vec{\eta} = \vec{y} - \vec{\epsilon}, \quad (26)$$

и из ковариационной матрицы уточненных измерений $G_{\eta}^{-1} = A G_h^{-1} A^T$ выбираются ее диагональные элементы $\Delta \eta_i = \sqrt{G_{\eta}^{-1}}_{\eta_{ii}}$ ($i=1, 2, \dots, n$), определяющие коридор ошибок аппроксимирующей кривой. Приведенный алгоритм реализует укрупненная блок-схема программы MSQ (рис. 2).

Последовательность второго этапа обработки экспериментальных данных можно проследить по укрупненной структурной схеме, иллюстрирующей работу пакета программ CALCDM. Программа PDON предназначена для ввода необходимых данных и параметров в форме диалога, а также для загрузки экспериментальных данных в оперативную память мини-ЭВМ. Поскольку в процессе обработки к первоначальным данным приходится обращаться несколько раз, они записываются на магнитных гибких дисках (ГД) в виде графиков, вызов которых осуществляется на порядок быстрее, чем файла данных. После загрузки в оперативную память мини-ЭВМ заданной повторности последовательно для каждого элемента в отдельности проводится разложение экспериментальных кривых на составляющие. Сначала программа PRDQ выполняет операцию нелинейного сглаживания первоначальных данных по 7 точкам, используя формулу [6]

$$\tilde{y}_0 = (-2y_{-3} + 3y_{-2} + 6y_{-1} + 7y_0 + 6y_1 + 3y_2 - 2y_3)/21, \quad (27)$$

чтобы снизить разброс экспериментальных данных, получившихся при определении площади под фотопиком. Далее программой выбираются последние, начиная с 50-й, точки кривой накопления. Это соответствует 125 мин от начала проведения эксперимента. Анализ опубликованных данных [12, 16, 17, 21] показывает, что такой отрезок соответствует примерно 7—10 периодам полунакопления для цитоплазматического компартмента подобных растительных клеток. Затем выбранный участок кривой аппроксимируется сначала функцией

$$y = Ht \frac{1}{E}, \quad (28)$$

которая по форме конечного участка близка функции (2). Предварительно рассчитываются приближенные параметры H и E для выражения (28) с использованием системы уравнений:

$$\begin{aligned} y_{50} &= Ht \frac{1}{E}, \\ y_l &= Ht_{50} \frac{1}{E}, \end{aligned} \quad (29)$$

где индексы 50 и l соответствуют 50-й и конечной точкам кривой накопления. Полученные параметры уточняются подпрограммой МНК, затем рассчитывается аппроксимирующая кривая по формуле (28) с последующим ее численным дифференцированием на основе интерполяционного многочлена Лагранжа [3] и логарифмирования. Это, естественно, не линеаризует полученную кривую, но аппроксимация ее по методу наименьших квадратов функцией

$$z = kt + b \quad (30)$$

позволяет найти грубое приближение параметров самой медленной компоненты уравнения (8) $e^b \sim \bar{A}_n K_n$ и $k \sim K_n$. Дальнейший шаг — это уточнение параметров \bar{A}_n , K_n , $B = Y_n(t) - \bar{A}_n(1 - e^{-K_n t})$ и аппроксимация конечного участка экспериментальной кривой накопления по МНК функцией

$$Y_n(t) = D + A_n(1 - e^{-K_n t}), \quad (31)$$

$$\text{где } D = \sum_{i=1}^{n-1} A_i (1 - e^{-K_i t}) = \sum_{i=1}^{n-1} A_i$$

при $t \rightarrow \infty$ (рис. 3, 1).

После определения параметров вакуолярной составляющей кривой накопления программа PRDQ переходит к нахождению параметров того же компартмента кривой вымывания (3) по методу, рассмотренному ранее [18]. На основе найденных параметров сравниваются значения $A = A_n(1 - e^{-K_n T})$ и $B = B_n$ (T — время накопления), близкие значения которых являются критерием правильности определения параметров вакуолярной составляющей кривых накопления и вымывания (рис. 2, 1). На этом рисунке представлен один из графических листингов промежуточных расчетов, отображаемый на экране дисплея для визуального и числового контроля результатов аппроксимации экспериментальных данных. Как видно из числовых данных,

$B > A$. Нами было установлено, что в B входит константа, обусловленная сорбированием меченого элемента на внутренней поверхности стеклянной колонки за время накопления T . Как правило, эта константа составляла 7—10% B . На конечном этапе программа PRDQ осуществляет вычитание вакуолярных составляющих из кривых накопления и выделения.

Экспериментальные данные после вычитания вакуолярных составляющих обрабатываются по программе PRDL. Следует отметить, что после вычитания из суммарной кривой накопления получаем кривую с насыщением (рис. 3, 1а) или в виде функциональной зависимости

$$\hat{Y}_n(t) = \sum_{i=1}^{n-1} A_i (1 - e^{-K_i t}), \quad (32)$$

которая легко преобразуется посредством выражения

$$D - \hat{Y}_n(t) = \sum_{i=1}^{n-1} A_i e^{-K_i t} \quad (33)$$

в кривую (рис. 3, 1б), графическое разложение которой аналогично (3). В программе PRDL такая операция осуществлялась путем предварительной интерполяции нелинейных участков кривой с целью дальнейшего более точного определения на экране дисплея начального участка прямой в полупологарифмическом масштабе.

В конечном итоге данные, полученные в результате последовательного разложения кривой по каждому элементу и повторности, записываются на ГД по программе PDFI для дальнейших расчетов потоков на мембранах клетки. Графическое разложение кривых по пакету программ CALCDM всегда начинается с изотопа, имеющего наибольшую энергию γ -излучения при заданной комбинации ионов. Таким образом, при обработке результатов совместного поглощения ^{85}Sr и ^{22}Na первоначально получают усредненные данные, характеризующие поведение ионов Na^+ . Далее данные кривой ^{22}Na для энергии $E_\gamma = 1,275$ МэВ умножаются на соответствующий коэффициент [7]. В результате находим кривую, которая могла быть получена при регистрации только пика полного поглощения ^{22}Na с энергией $E_\gamma = 0,511$ МэВ. После вычитания этой кривой из суммарной кривой, образованной скоростями счета от гамма-линий с $E_\gamma = 0,514$ МэВ для ^{85}Sr и $E_\gamma = 0,511$ МэВ для ^{22}Na , находим зависимость, характеризующую поведение ионов Sr^{2+} , которая в дальнейшем обрабатывается по вышеприведенной методике. Такую операцию по подготовке экспериментальных данных для ^{85}Sr в случае необходимости обеспечивает программа PDFI.

На рис. 4 приведен пример распечатки графического листинга, полученного в результате обработки трех повторностей регистрации совместного поступления ионов Sr^{2+} , Rb^+ и Na^+ . На этом рисунке даны усредненные экспериментальные (1) и эмпирические кривые (2) с соответствующими доверительными интервалами, рассчитанными на основе распределения Стьюдента при $P_0 = 0,9$.

Программы обработки данных были написаны на языке ЛЕМ-II (модификация

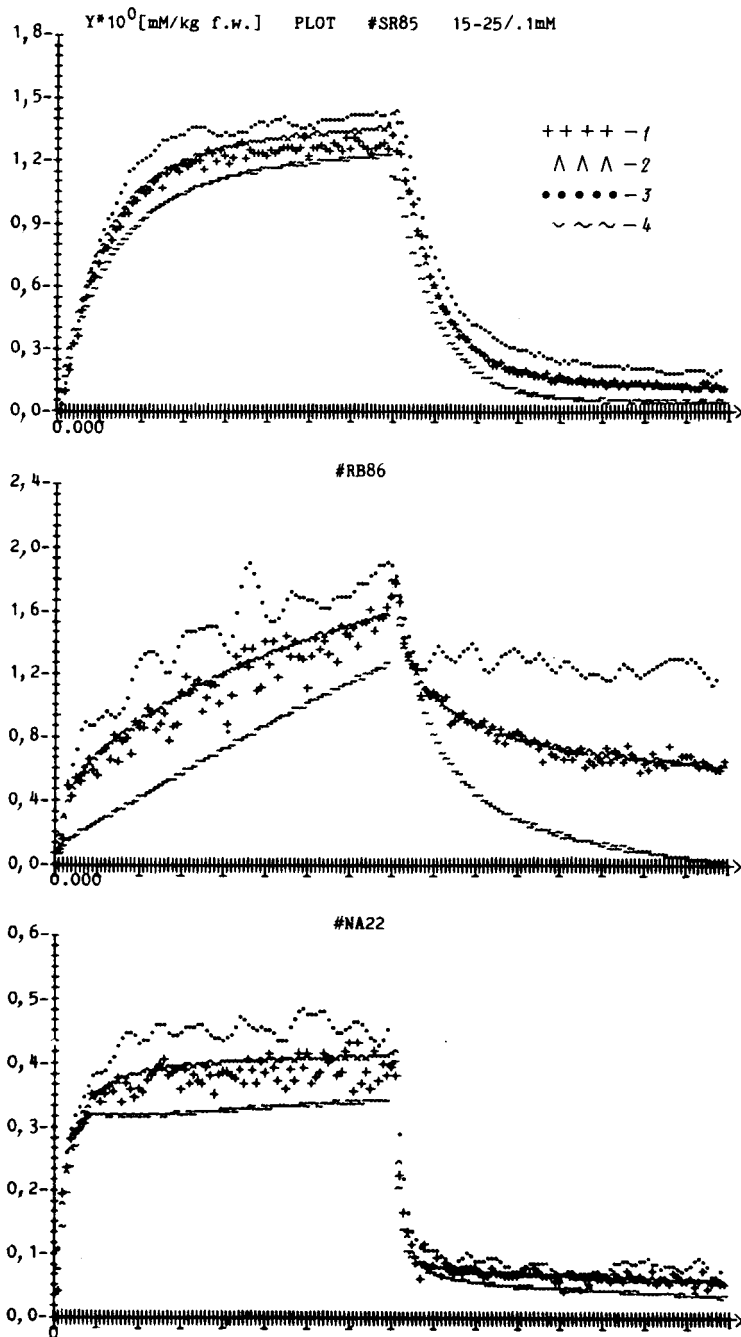


Рис. 4. Графический листинг усредненных экспериментальных (1) и аппроксимирующих (2) кривых динамики совместного накопления и вымывания меченых ионов $^{85}\text{Sr}^{2+}$, $^{86}\text{Rb}^+$ и ^{22}Na в отделенных корнях кукурузы.

3-4 — соответствующие доверительные интервалы при $P_0=0.9$.

языка БЭЙСИК), который позволяет легко строить диалоговые элементы программ. Использовались также программы, предварительно написанные на языке ФОРТРАН-IV

(для ускорения расчетов) с последующей их трансляцией в АССЕБЛЕР, после чего в виде функций они применялись в программах, созданных на языке ЛЕМ-II.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барабанщиков М. Н., Мазель Ю. Я., Шкарин Б. И. Применение компартмент-анализа для определения по-

токов ионов кальция в клетках корня кукурузы.— Изв. ТСХА, 1979, вып. 1, с. 10—16.— 2. Брандт З. Статистические мето-

- ды анализа наблюдений. М.: Мир, 1975. — 3. Воробьев А. Ф., Данелян Т. Я., Данилина Н. И. Вычислительная математика. М.: Статистика, 1966. — 4. Куценко А. В., Полосьянц Б. А., Ступин Ю. В. Мини-ЭВМ в экспериментальной физике. М.: Атомиздат, 1975. — 5. Рачинский В. В., Ойеджола Б. О. Кинетика изотопного обмена фосфора между корнями растений и питательной средой. — Изв. ТСХА, 1979, вып. 4, с. 93—99. — 6. Румшинский Л. З. Математическая обработка результатов эксперимента. М.: Физматгиз, 1972. — 7. Шкарин Б. И., Рачинский В. В. Радиондикаторная регистрация кинетики совместного переноса нескольких меченых ионов гамма-спектрометрическим методом с применением мини-ЭВМ. — Изв. ТСХА, 1985, вып. 3, с. 178—183. — 8. Vange G. — *Physiol. Plant.*, 1979, vol. 46, p. 179—183. — 9. Epstein E. — *Agrochimica*, 1962, vol. 6, N 4, p. 293—322. — 10. Handley R., Babcock K. L. — *Radiation Botany*, 1973, vol. 13, p. 273—281. — 11. Handley R., Overstreet R. — *Plant Physiol.*, 1963, vol. 38, N 2, p. 180—184. — 12. Higinbotham N., Graves I. S. — *J. Membrane Biol.*, 1970, vol. 3, p. 210—222. — 13. Jacoby B. — *Plant Physiol.*, 1975, vol. 55, N 6, p. 978—981. — 14. Kochian L. V., Lucas W. J. — *Plant Physiol.*, 1982, vol. 70, N 6, p. 1723—1731. — 15. Lauchli A., Epstein E. — *Plant Physiol.*, 1970, vol. 45, N 5, p. 639—641. — 16. Macklon A. E. S. — *Planta*, 1975, vol. 122, p. 109—130. — 17. MacRobbie E. A. C. — *Gen. Physiol.*, 1962, vol. 45, p. 861—878. — 18. MacRobbie E. A. C., Dainty J. — *J. Gen. Physiol.*, 1958, vol. 42, p. 335—353. — 19. Pallaghy C. K., Soott B. I. — *Aust. J. Biol. Scin.*, 1969, vol. 22, p. 585—600. — 20. Pettersson S. — *Physiol. Plant.*, 1981, vol. 52, N 4, p. 431—436. — 21. Pitman M. G. — *Aust. J. Biol. Scin.*, 1963, vol. 16, p. 647—668.

Статья поступила 5 января 1985 г.

SUMMARY

The article considers graphical decomposition of separate experimental curves of accumulation and leaching obtained when studying dynamics of combined behaviour of labelled atoms $^{85}\text{Sr}^{2+}$, $^{86}\text{Rb}^{+}$ and $^{22}\text{Na}^{+}$ in the cell with the application of the least squares methods. Graphical listings of experimental data and curves approximating them calculated on the basis of parametres found are given. Programmes of data processing are written in the language LEM-II (modification of the BASIC). Programmes written in advance in FORTRAN-IV (for speeding up calculations) are also applied with further translating them into ASSEMBLER and applying them in the form of functions in the programmes made up in LEM-II.