



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ ΙΙ: ΑΝΑΛΥΣΗΣ, ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ &  
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

του ΘΕΟΔΩΡΟΥ Α. ΖΩΤΟΥ

ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ  
ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΑΡΚΟΜΕΡΙΟ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
**ΑΝΔΡΕΑΣ Γ. ΜΠΟΥΝΤΟΥΒΗΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2011

## **Ευχαριστίες**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ανδρέα Μπουντουβή – επιβλέποντα της διπλωματικής αυτής εργασίας – για την επιστημονική καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας. Η στήριξη του υπήρξε πολύ σημαντική πριν και κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης της διπλωματικής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υπεύθυνο καθηγητή μου Κωνσταντίνο Θεοδωρόπουλο από το Πανεπιστήμιο του Μάντσεστερ, στο οποίο έγινε πολύ σημαντικό μέρος αυτής της διπλωματικής στα πλαίσια του προγράμματος ERASMUS, για την υποστήριξή του και την επιστημονική του καθοδήγηση, καθώς και την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον Δρα Ιωάννη Μπόνη, ο οποίος συνέβαλε τα μέγιστα στην ολοκλήρωση της εργασίας με την επιμελή και ακούραστη καθοδήγησή του, ιδιαίτερα με τις γνώσεις του πάνω στην Comsol καθώς και με την τεχνική υποστήριξη που παρείχε.

Ευχαριστώ θερμά τον Δρα Michael Binns για την συνεργασία του στην ανάλυση των αποτελεσμάτων και δημοσιοποίηση της εργασίας αυτής στο ICSB 2011.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Υποψήφιο Διδάκτορα Ιωάννη Φραγκόπουλο, για τις εύστοχες παρατηρήσεις του από την εμπειρία του στα υπολογιστικά θέματα και το Comsol.

## Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη.....	4
Κεφάλαιο 1 – Εισαγωγή - Θεωρία.....	5
1.1 Ιστορία της έρευνας του μυϊκού συστήματος .....	5
1.2 Μυϊκή δομή και λειτουργία .....	6
1.2.1 Μυϊκή δομή.....	6
1.2.2 Λειτουργία της εγκάρσιας γέφυρας.....	12
1.3 Σκοπός και Στόχοι αυτής της εργασίας .....	15
Κεφάλαιο 2 - Βιβλιογραφική ανασκόπηση.....	16
2.1 Μοντελοποίηση του συστήματος .....	16
2.2 Κινητικοί Μηχανισμοί .....	18
2.2.1 ΑΤΡαση .....	19
2.2.2 Αδενυλική Κινάση.....	20
2.2.3 Κινάση της Κρεατίνης.....	22
Κεφάλαιο 3 – Μοντελοποίηση.....	24
3.1 COMSOL Multiphysics .....	24
3.2 1-D Μοντελοποίηση στο Comsol .....	25
3.2.1 Μοντέλο με απουσία φωσφοκρεατίνης .....	26
3.2.2 Μοντέλο με παρουσία φωσφοκρεατίνης .....	29
3.2.3 Αποτελέσματα μοντέλου 1-D.....	34
Κεφάλαιο 4 – Νέα προσέγγιση .....	44
4.1 Ρεαλιστική Γεωμετρία .....	44
4.2 2-D Γεωμετρία .....	52
4.2.1 Μοντέλο με απουσία φωσφοκρεατίνης .....	53
4.2.2 Μοντέλο με παρουσία φωσφοκρεατίνης .....	55
4.2.3 Αποτελέσματα μοντέλου 2-D .....	58
Κεφάλαιο 5 – Συμπεράσματα και μελλοντική δουλειά.....	67
Βιβλιογραφία .....	68

## Περίληψη

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η υπολογιστική μελέτη του μηχανισμού κατανομής των νουκλεοτιδίων αδενοσύνης (με παρουσία και απουσία φωσφοκρεατίνης) στο σαρκομέριο, το οποίο είναι η βασική δομική μονάδα των μυών. Τα νουκλεοτίδια αδενοσύνης, κυρίως το ATP, είναι σημαντικά διότι είναι τα μόρια τα οποία, μέσω των μεταβολικών τους οδών, καθιστούν δυνατή την κίνηση των σαρκομερίων. Η κίνηση αυτή οφείλεται στην αλληλεπίδραση των ινιδίων μυοσίνης και κητίνης, τα οποία είναι σύμπλοκα μακρομορίων με πρωτεΐνες, που βρίσκονται στο εσωτερικό των σαρκομερίων. Το ATP προσδένεται στις πρωτεΐνες αυτών των ινιδίων και υδρολύεται προσφέροντας την απαραίτητη χημική ενέργεια ώστε να τεθούν σε κίνηση οι μύες. Κατά τόπους μπορεί να δημιουργηθεί έλλειψη ATP, γι' αυτό το λόγο η χωρική κατανομή της συγκέντρωσης του ATP στο εσωτερικό των σαρκομερίων είναι σημαντική.

Το υπολογιστικό μοντέλο που κατασκευάστηκε, θεωρεί μηχανισμό διάχυσης - αντίδρασης των νουκλεοτιδίων εντός του σαρκομερίου. Αρχικά γίνεται μοντελοποίηση σε γεωμετρία μίας διάστασης (1-D), για τον υπολογισμό της κατανομής των νουκλεοτιδίων. Ο συντελεστής διάχυσης καθορίζεται από το μοντέλο συγκρίνοντας τα πειραματικά δεδομένα με τα υπολογιστικά αποτελέσματα της μέσης κατανομής ενεργότητας της ATPασης, πρωτεΐνης που καταλύει την υδρόλυση του ATP. Ωστόσο, προκύπτει φαινόμενος συντελεστής διάχυσης τρεις τάξεις μεγέθους μικρότερος από τον πειραματικά μετρούμενο με NMR. Αυτό πιστεύεται ότι οφείλεται στην αντίσταση διάχυσης που προκαλείται από εσωτερικά εμπόδια π.χ ινίδια. Για να βελτιωθεί ο συντελεστής διάχυσης, κατασκευάστηκε μοντέλο σε γεωμετρία δύο διαστάσεων (2-D) που εισήχθησαν εσωτερικά ινίδια (μυοσίνης και κητίνης). Έτσι, κατασκευάστηκε μία πιο ρεαλιστική αναπαράσταση του εσωτερικού χώρου των σαρκομερίων. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως αυτό το μοντέλο είναι προς τη σωστή κατεύθυνση καθώς βελτιώνεται η προβλεπόμενη τιμή του φαινόμενου συντελεστή διάχυσης.

# Κεφάλαιο 1 – Εισαγωγή - Θεωρία

## 1.1 Ιστορία της έρευνας του μυϊκού συστήματος

Η απαρχή της έρευνας του μυϊκού συστήματος χρονολογείται από τα αρχαία χρόνια. Συστηματική έρευνα για τη δομή των μυών πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά το δεύτερο αιώνα μ. Χ. από τον Γαληνό [14]. Το δέκατο έβδομο αιώνα μ.Χ., ο Leeuwenhoek έδειξε την ινώδη και ραβδωτή δομή που έχουν οι σκελετικοί μύες χρησιμοποιώντας μικροσκοπικές μεθόδους εξέτασης [27]. Λίγο αργότερα, δύο τύποι ινών ανακαλύφθηκαν από τον Lorenzini (1678). Από το 1850, οι ερευνητές είχαν στα χέρια τους συσκευές όπως μικροσκόπια πολωμένου φωτός, που τους επέτρεπαν να παρατηρήσουν της μικροδομές των μυϊκών ινών (όπως οι A- και οι I-ζώνες, ο Z- δίσκος).

Η πρώτη προσπάθεια επεξήγησης της λειτουργίας των μυών ήρθε από τον Ερασίστρατο τον τρίτο αιώνα π.Χ. [43]. Ο Ερασίστρατος πίστευε ότι τα νεύρα και οι μύες αποτελούν ένα σύστημα που χρησιμοποιεί αέρα υπό πίεση (πνευματικό) και καθοδηγείται από το πνεύμα. Τη δεκαετία του 1660 ο Swammerdam και ο Glisson διέψευσαν αυτή τη θεωρία δείχνοντας ότι ο όγκος των μυών παραμένει σταθερός κατά τη διάρκεια της μυϊκής σύσπασης [39], σε αντίθεση με ότι θα συνέβαινε με τη σύσπαση των μυών με πνευματικό σύστημα. Τότε η θεωρία που έλεγε ότι ο μυς λειτουργεί ως θερμική μηχανή κέρδισε έδαφος. Η θεωρία αυτή διαψεύστηκε όταν ένα μοντέλο προέβλεπε ότι η εσωτερική θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος θα έπρεπε να ήταν 130 °C υποθέτοντας θερμοδυναμική απόδοση 20 – 30 %. Ανάμεσα στο 1910 και 1950 ο A. V. Hill μελέτησε τη μυϊκή σύσπαση και την παραγωγή θερμότητας με λογικά μηχανικά πειράματα. Αφού χρησιμοποιήθηκε η μικροσκοπία ηλεκτρονίων στο πρώτο μισό του περασμένου αιώνα, αρκετοί ερευνητές, κυρίως οι A. F. Huxley και H. E. Huxley πρότειναν ότι οι αλληλεπιδράσεις των ινιδίων, που είναι παράλληλα ευθυγραμμισμένα, προκαλούν την παραγωγή δύναμης. Οι συνεχόμενες ολισθήσεις αυτών των ινιδίων προκαλούν την κίνηση των μυών. Αυτή η θεωρία για ολισθαίνοντα ινίδια είναι ευρέως αποδεκτή στις σύγχρονες κοινότητες

ερευνητών. Περαιτέρω έρευνες στη μοριακή βιολογία απέδειξαν τη θεωρία ότι γέφυρες ανάμεσα στα ινίδια ακτίνης και μυοσίνης, όταν ενεργοποιηθούν, παράγουν τάσεις. Είναι κοινώς αποδεκτό ότι αυτές οι κυκλικές αλληλεπιδράσεις είναι ο κύριος παράγοντας για την ολίσθηση των ινιδίων με αποτέλεσμα τη μυϊκή σύσπαση και την παραγωγή δύναμης.

## **1.2 Μυϊκή δομή και λειτουργία**

### **1.2.1 Μυϊκή δομή**

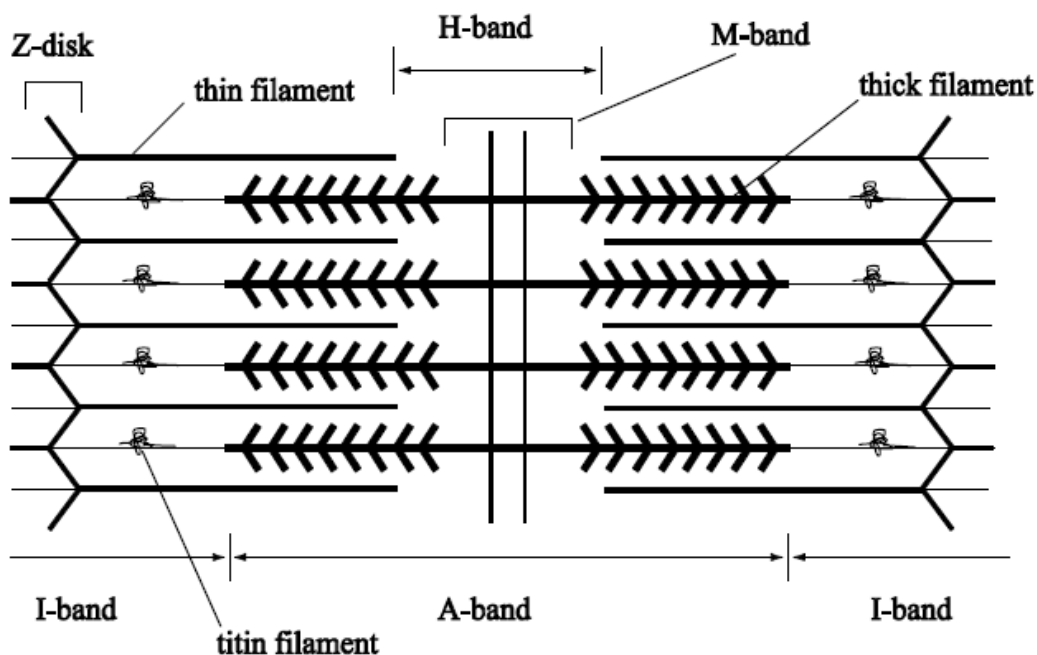
Οι σκελετικοί μύες αποτελούνται από ίνες που είναι πολυπύρρηνα κύτταρα με διάμετρο ανάμεσα στα 10 με 100 μm και καλύπτουν το συνολικό μήκος της ίνας. Το σαρκόπλασμα περιβάλλει την κάθε ίνα. Περιέχει τα μιτοχόνδρια, την εσωτερική μεμβράνη του σαρκοπλασμικού δικτύου και ένα σύστημα εγκάρσιου σωληναρίου σύνδεσης. Η κάθε ίνα είναι επίσης ιεραρχικά οργανωμένη, περιέχοντας εκατοντάδες μυϊκά ινίδια, διαμέτρου περίπου 1 μm που βρίσκονται κατά μήκος της ίνας σε παράλληλη διάταξη. Κάθε μυϊκό ινίδιο αποτελείται από μια στοιχισμένη σειρά από σαρκομέρια.

Με μικροσκοπία φωτός, ένα χαρακτηριστικό μοτίβο των ινών αποκαλύπτεται με επαναλαμβανόμενες φωτεινές (ισοτροπικό, I- δεσμός) και σκοτεινές ζώνες (ανισοτροπικό, A- δεσμός). Αυτές οι διασταυρούμενες ραβδώσεις οφείλονται στην κανονική κατανομή των ινιδίων των σαρκομερίων μέσα στη μυϊκή ίνα. Το σαρκομέριο είναι η μικρότερη δομική μονάδα των μυών. Παρόλα αυτά, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η λειτουργική μονάδα είναι το μισό σαρκομέριο [36]. Το σαρκομέριο αποτελείται από παράλληλα ευθυγραμμισμένα ινίδια ακτίνης, μυοσίνης και τιτίνης καθόλο το μήκος του. Τα λεπτά ινίδια ακτίνης είναι στερεωμένα τη μία πλευρά στο Z- δίσκο και φτάνουν από τη μέση της I- ζώνης μέσα στην A- ζώνη μέχρι το όριο της H- ζώνης. Το ινίδιο της ακτίνης παρέχει τις θέσεις

πρόσδεσης για τις κεφαλές που παράγουν δύναμη. Τα ινίδια μυοσίνης ξεκινάνε από το μέσο του σαρκομερίου (M- ζώνη) και πηγαίνουν και από τις δύο κατευθύνσεις μέχρι το τέλος της A- ζώνης. Το ινίδιο τιτίνης συνδέει το τέλος του ινιδίου μυοσίνης με το Z- δίσκο λειτουργώντας ως μη ενεργό ινίδιο για την εξασφάλιση της μη υπερέκτασης του σαρκομερίου.

### **Ινίδιο Μυοσίνης και Γέφυρες**

Το 1954 δύο ανεξάρτητες μελέτες [19,20] ανακάλυψαν ότι η σύσπαση του ενεργού μυός οφείλεται στην ολίσθηση των ινιδίων μυοσίνης κατά μήκος των ινιδίων ακτίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συμμετρική σύσπαση των σαρκομερίων προς το κέντρο τους. Αυτή η περιοχή αλληλεπίδρασης των δύο ινιδίων ονομάζεται A- ζώνη. Στη σημερινή εποχή, ενισχύεται η υπόθεση ότι η σύσπαση των μυών οφείλεται στην παραγωγή δύναμης που προκαλείται από την κίνηση των ινιδίων ακτίνης – μυοσίνης. Αυτή η υπόθεση βασίστηκε κυρίως σε τρεις μελέτες. Πρώτον, ο Huxley (1953) βρήκε τις προβολές των συνδέσεων μεταξύ ακτίνης και μυοσίνης, κοιτάζοντας άκαμπτες ίνες χρησιμοποιώντας ακτίνες X. Ο Hanson & Huxley [15] αργότερα έδειξαν ότι αυτές οι συνδέσεις αποτελούνται από πρωτεΐνες μυοσίνης. Δεύτερον, οι Ramsey & Street [29] έδειξαν ότι η εφαρμοζόμενη δύναμη είναι ανάλογη με την αλληλοεπικάλυψη των ινιδίων ακτίνης και μυοσίνης. Τρίτων, οι Huxley & Julian (1964) ανακάλυψαν ότι η μέγιστη ταχύτητα σύσπασης των ινών είναι ανεξάρτητη από την αλληλοεπικάλυψη των ινιδίων.

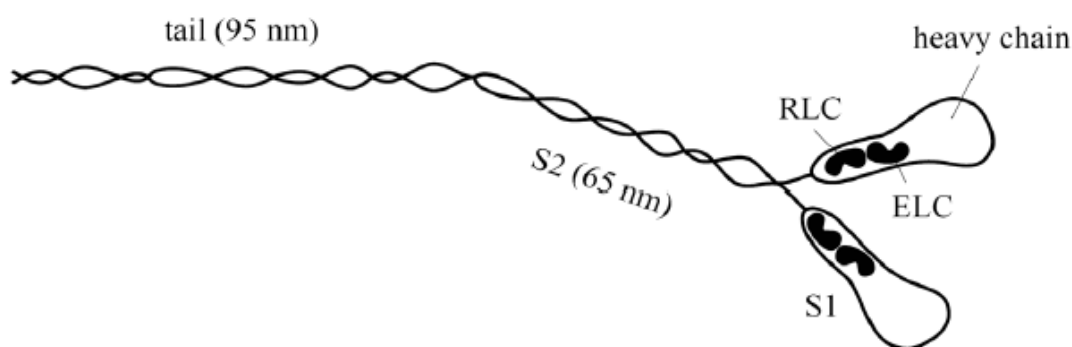


Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση του σαρκομερίου. Τα (παχιά) ινίδια μυοσίνης και τα (λεπτά) ινίδια ακτίνης είναι παράλληλα οργανωμένα και εναλλάσσονται μεταξύ τους. Η Α- ζώνη αντιπροσωπεύει την περιοχή όπου τα ινίδια ακτίνης και μυοσίνης αλληλοεπικαλύπτονται και μικροσκόπιο η περιοχή αυτή φαίνεται πιο σκούρα από την Ι- ζώνη. Τα ινίδια μυοσίνης ενώνονται με ινίδια τιτίνης και στερεώνονται στο Ζ- δίσκο στο όριο του σαρκομερίου. Στο κέντρο του σαρκομερίου τα παχιά ινίδια συνδέονται μέσω πρωτεϊνών στην Μ- ζώνη.

Πολλές μελέτες αποκαλύπτουν τη δομή και οργάνωση του συμπλόκου ακτίνης – μυοσίνης (γέφυρες ακτίνης – μυοσίνης). Κάθε τέτοια γέφυρα είναι μία μοριακή μηχανή αποτελούμενη από πρωτεΐνη μυοσίνη II. Αυτή η μοριακή μηχανή έχει δύο σφαιρικές κεφαλές που συνδέονται με μία μακριά ουρά που είναι στραμμένη προς το κέντρο του ινιδίου (βλέπε εικόνα 2). Αποτελείται από δύο βαριές πολυπεπτιδικές αλυσίδες (200kDa η κάθε μία, Da είναι η μονάδα μέτρησης μοριακού βάρους Dalton) και δύο ζευγάρια από ελαφριές πολυπεπτιδικές αλυσίδες (20kDa η κάθε μία). Η σφαιρική κεφαλή κάθε βαριάς αλυσίδας σχετίζεται με δύο ελαφριές αλυσίδες – μία βασική και μία ρυθμιστική. Οι δύο βαριές αλυσίδες ενώνονται σχηματίζοντας σπείρα 150nm που ονομάζεται ουρά. Οι κεφαλές της μοριακής μηχανής μπορούν να διασπαστούν βιοχημικά για να φτιάξουν τρία τμήματα, την ουρά, το υποτμήμα 2 (S2) και το υποτμήμα 1 (S1). Το S1 συνδέεται με



τις κεφαλές, ενώ το S2 συνδέεται με ένα τμήμα της μακριάς ουράς 95nm που προεξέχει στον ενδο-νηματώδη χώρο. Το S1 περιέχει τα λειτουργικά τμήματα όπως τις περιοχές πρόσδεσης του ATP, τα τμήματα πρόσδεσης της ακτίνης και το βραχίονα. Αυτά τα τμήματα συχνά αναφέρονται ως κεφαλές μυοσίνης (ή cross-bridges).

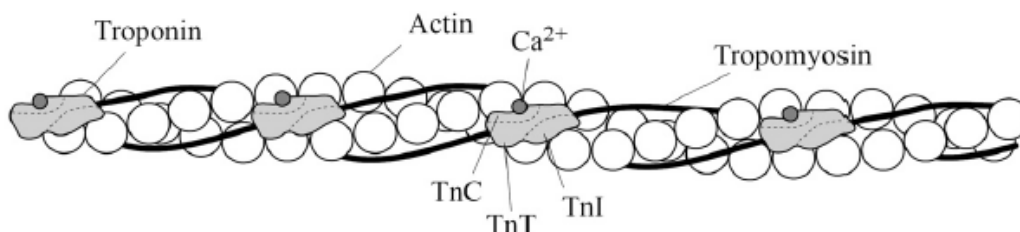


Εικόνα 2: Διάγραμμα της μυοσίνης II. Τα υποτμήματα (S1 και S2) είναι συζευγμένα με την ουρά, η οποία είναι ενωμένη με το ινίδιο μυοσίνης. Η κεφαλή (S1) αποτελείται από δύο βαριές αλυσίδες με κάθε μία τους να περιέχει μία ρυθμιστική (RLC) και μία βασική ελαφριά αλυσίδα (ELC).

### Ινίδιο Ακτίνης

Το ινίδιο της ακτίνης είναι κατασκευασμένο από δύο σκέλη της F-ακτίνης που είναι ελικοειδώς ενωμένα. Η F-ακτίνη είναι μία αλυσίδα από πολυμερισμένα μονομερή G-ακτίνης, που έχουν μεταξύ τους αξονική απόσταση 5.5 nm. Η ελικοειδής περιοδικότητα της δομής είναι 36.5 nm. Γύρω από την F-ακτίνη υπάρχουν ρυθμιστικές πρωτεΐνες: η τροπομυοσίνη (Tm) και η τροπονίνη (Tn). Η τροπομυοσίνη βρίσκεται κατά μήκος του χώρου ανάμεσα στη F-ακτίνη και εκτείνεται πάνω σε επτά ζεύγη μονομερών G-ακτίνης (βλέπε εικόνα 3). Στη σύνδεση δύο τροπομυοσινών (Tm) υπάρχει μία τροπονίνη (Tn) που έχει μία μονάδα για πρόσδεση καλίου (TnC), μία ανασταλτική μονάδα (TnI) και μία μονάδα για πρόσδεση τροπομυοσίνης. Η ανασταλτική μονάδα με την τροπομυοσίνη

μπλοκάρουν το τμήμα πρόσδεσης της κεφαλής μυοσίνης στο ινίδιο της ακτίνης. Εάν στη TnC προσδεθεί κάλιο ακυρώνεται η ανασταλτική δράση της TnI καθώς μετακινεί ολόκληρη τη μονάδα και ξεμπλοκάρει τα μονομερή της ακτίνης [35].

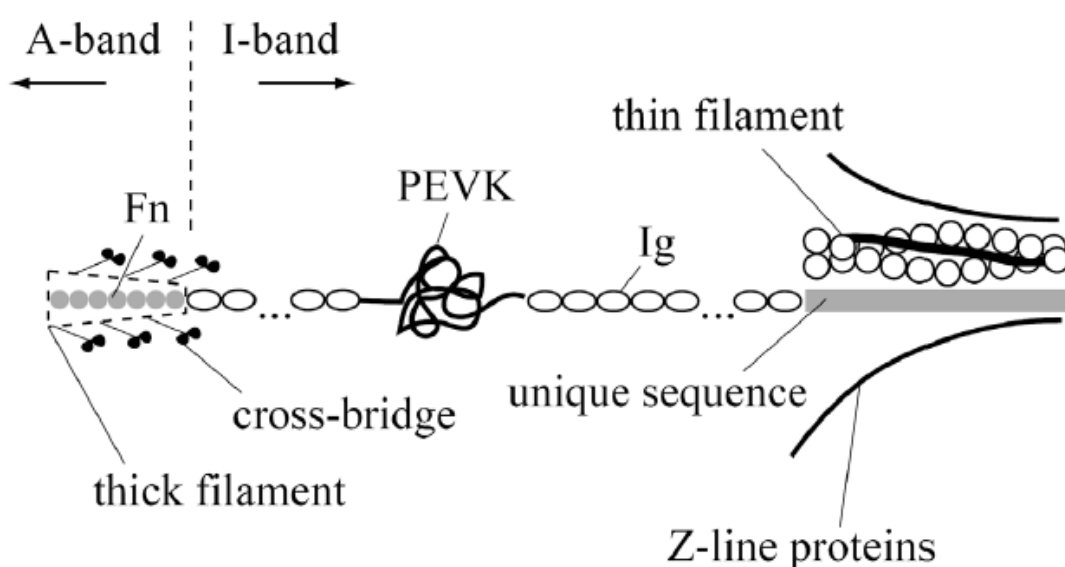


**Εικόνα 3:** Αναπαράσταση του ινιδίου της ακτίνης. Το ινίδιο της ακτίνης αποτελείται κυρίως από δύο έλικες της F-ακτίνης που είναι τυλιγμένες με δύο αλυσίδες τροπομυοσίνης. Το νήμα τροπομυοσίνης είναι βασικά μόρια τροπομυοσίνης που είναι ενωμένα με σύμπλοκα τροπονίνη. Η τροπονίνη περιέχει τρία υποτμήματα (TnC, TnI, TnT).

### Ινίδιο Τιτίνης

Το τρίτο είδος ινιδίου μέσα σε ένα σαρκομέριο είναι μία μεγάλη πρωτεΐνη, η τιτίνη. Η τιτίνη ενώνει τα ινίδια μυοσίνης με το Z- δίσκο εμποδίζοντας την υπερέκταση του σαρκομερίου. Ανακαλύφθηκε πρώτη φορά από τους Maruyama et al. το 1977. Η τιτίνη είναι μία τεράστια πρωτεΐνη με μοριακή μάζα περίπου 3.0-3.7 MDa. Αποτελείται κυρίως από τρία μέρη: τμήματα Ig το ένα πίσω από το άλλο που είναι ενωμένα με τρόπο όμοιο με της ανοσοσφαιρίνης, μη αρθρωτό τμήμα PEVK και περιοχές όμοιες με της φμπρονεκτίνης (Fn), (βλέπε εικόνα 4). Το τμήμα PEVK βρίσκεται στη μέση της I-ζώνης, ενώ οι Fn περιοχές βρίσκονται μέσα στην A-ζώνη, και λειτουργεί ως πρότυπο για τη δημιουργία μορίων μυοσίνης [38]. Το μέγεθος των τμημάτων Ig και η περιοχή PEVK ποικίλει ανάλογα με το είδος του μυός. Η βασική λειτουργία της I-ζώνης του ινιδίου τιτίνης είναι να λειτουργεί ως μοριακό ελατήριο. Το μήκος του κυμαίνεται από μία τυχαία κουλουριασμένη διάταξη σε ηρεμία σε επιμηκυμένες Ig περιοχές για μικρά τεντώματα μέχρι επιμηκυμένες PEVK περιοχές για μεγαλύτερα τεντώματα [9]. Ένα τέτοιο είδος ελατηρίου διασφαλίζει τη

δομή των ινιδίων σε ένα σαρκομέριο και είναι ένας λόγος για παθητική μυϊκή ακαμψία. Καθώς το μήκος της PEVK περιοχής διαφοροποιείται ανάμεσα σε διαφορετικά είδη μυών, μπορεί να σχετίζεται με την ελαστικότητα και κατ' επέκταση με τη μηχανική λειτουργία των μυών [3].



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση του ινιδίου της τιτίνης. Το τεράστιο μόριο της τιτίνης αποτελείται Ig περιοχές που βρίσκονται στην I-ζώνη και είναι στερεωμένες στο Z-δίσκο. Από την άλλη πλευρά η τιτίνη είναι στερεωμένη στο ινίδιο μουσίνης με την περιοχή Fn. Η μοναδική PEVK ακολουθία στο μέσο της τιτίνης δίνει τη χαρακτηριστική συμπεριφορά κατά το τέντωμα.

### Z-δίσκος

Ο Z-δίσκος είναι το σημείο σύνδεσης των σαρκομερίων, ενώ παράλληλα ομαδοποιεί τα ινίδια ακτίνης των παρακείμενων σαρκομερίων σε ένα τετραγωνικό πλέγμα. Τα ινίδια ακτίνης είναι ενωμένα μέσα στο Z-δίσκο με  $\alpha$ -ακτινίνη. Ο Z-δίσκος είναι ο πομπός της έντασης του σαρκομερίου στους γείτονές του. Άλλη μία σταθεροποιητική εγκάρσια δομή βρίσκεται στη μέση του σαρκομερίου, η M-ζώνη.

Πιστεύεται ότι η Μ-ζώνη συνδέει τα ινίδια μυοσίνης και ακτίνης. Πέρα από τη μυοσίνη και την ακτίνη, η Μ-ζώνη αποτελείται επίσης κυρίως από δομικές πρωτεΐνες, τις μυομεσίνες και τις Μ-πρωτεΐνες. Η μυομεσίνη φαίνεται να είναι απαραίτητη για τη συναρμολόγηση της Μ-ζώνης.

### 1.2.2 Λειτουργία της εγκάρσιας γέφυρας

Μελέτες με μικροσκοπία ηλεκτρονίων και ακτίνες Χ οδήγησαν στην θεωρία της εγκάρσιας γέφυρας. Ο Huxley (1969) πρότεινε με βάση τις έρευνές του πάνω στη δομή, ότι κατά τη διάρκεια της συστολής η συνδεδεμένη S1 κεφαλή αλλάζει τη γωνία με αποτέλεσμα να δημιουργεί τάση που οδηγεί σε ολίσθηση των ινιδίων. Περισσότερο από 15 χρόνια αργότερα, οι Huxley et al. (1981) απέδειξαν πειραματικά τη θεωρία αυτή. Αργότερα ο Cooke (1986) τόνισε ότι οι κινήσεις αυτές θα έπρεπε να προέρχονται από μικρότερη μάζα απ ό τι ολόκληρη η S1 κεφαλή. Έτσι η θεωρία της εγκάρσιας γέφυρας βελτιώθηκε, ενώ ταυτόχρονα προτάθηκε η υπόθεση του περιστρεφόμενου μοχλού – βραχίονα. Αυτή η θεωρία εξακολουθεί να κυριαρχεί, ενώ επιπλέον έχει εμπλουτιστεί στις λεπτομέρειες της. Μία λεπτομερής ανασκόπηση του θέματος έχει δημοσιευθεί από τους Geeves et al. (2005). Η κεφαλή S1 έχει δύο ευδιάκριτες καταστάσεις, ‘ανοικτή’ και ‘κλειστή’, που σχετίζονται με τη μορφολογική αλλαγή που προκαλεί τη μηχανική δύναμη και την κίνηση των μυών. Η κεφαλή της μυοσίνης βρίσκεται στην ‘ανοικτή’ κατάσταση της αφού απελευθερωθεί η διφωσφορική αδενοσύνη (ADP), και έχει μεγάλη τάση για πρόσδεση στην ακτίνη όταν η κεφαλή είναι ελεύθερη από τριφωσφορική αδενοσύνη. Η ‘κλειστή’ κατάσταση αντιστοιχεί τον ATP δεσμό με την κεφαλή της μυοσίνης ενισχύοντας την ΑΤΡαση (βλ. στο εδάφιο “Ο κύκλος της ΑΤΡασης”). Η μετάβαση από ‘κλειστή’ σε ‘ανοικτή’ προκαλεί περιστροφή της επηρεαζόμενης περιοχής περίπου κατά 60ο με αποτέλεσμα μία μετακίνηση περίπου κατά 10nm πάνω στο ινίδιο της ακτίνης. Οι κεφαλές μυοσίνης μπορούν να μεταπηδούν ανάμεσα στις δύο καταστάσεις ως αντίδραση στην εξωτερική δύναμη που ασκείται

[6]. Ωστόσο, είναι ακόμη ασαφές πού ακριβώς βρίσκεται η πηγή της δύναμης (force-bearing compliance) στη κεφαλή της μυοσίνης. Πιστεύεται ότι βρίσκεται στην S2 περιοχή.

### **Ο κύκλος της ATPασης**

Η κεφαλή της μυοσίνης σε σκελετικούς μύες είναι μία μοριακή μηχανή που υποβάλλεται σε μορφολογική αλλαγή κατά την υδρόλυση της τριφωσφορικής αδενοσύνης (ATP). Ο ρυθμός της υδρόλυσης ενισχύεται από την παρουσία της ακτίνης αλλά μειώνεται από την υψηλή συγκέντρωση των προϊόντων που απέμειναν μετά την υδρόλυση, τα μόρια της διφωσφορικής αδενοσύνης (ADP) και τα φωσφορικά ιόντα ( $P_i$ ). Η κατασκευή των εγκάρσιων γεφυρών βασίζεται στη πρόσδεση του ATP και στην υδρόλυση του. Η δέσμευση της ακτίνης καταλύει την υδρόλυση του ATP και η δέσμευση του ATP καταλύει την αποδέσμευση της ακτίνης [7]. Τα ευρήματα δείχνουν ότι η μηχανική μορφολογική αλλαγή της κεφαλής της μυοσίνης είναι ισχυρά συνδεδεμένη με βιοχημικά μονοπάτια. Ο μοριακός κύκλος προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Lyman & Taylor (1971). Αυτός ο κύκλος που περιέχει επτά στάδια, αναφέρεται ως σχεδιάγραμμα Bagshaw-Trentham [1]. Ο βασικός κινητικός μηχανισμός αποτελείται από αντιστρεπτές αντιδράσεις, όπου ορισμένες από αυτές είναι πιο πιθανόν να κινηθούν προς τα εμπρός. Για αποτελεσματική παραγωγή δύναμης, η κατεύθυνση της αντίδρασης που προκαλεί μορφολογική αλλαγή πρέπει να είναι έντονα προς τα εμπρός (δεξιά κατεύθυνση). Τα επτά στάδια αποτελούνται από τέσσερα βασικά βήματα: (i) την ένωση του ATP στη κεφαλή σε δύο στάδια, (ii) την υδρόλυση του ATP σε ADP και  $P_i$ , (iii) την απελευθέρωση του  $P_i$  σε δύο στάδια και (iv) την απελευθέρωση του ADP σε δύο στάδια. Τα μεμονωμένα γεγονότα μπορεί να έχουν περισσότερες από δύο βαθμίδες, λόγω της πολυπλοκότητας των δομικών αλλαγών. Ωστόσο, για τις περισσότερες από τις περιπτώσεις, το προτεινόμενο σύστημα είναι μία καλή προσέγγιση.

### **Ο κύκλος των μορφολογικών αλλαγών**

Η δομική διαδικασία της πρόσδεσης της κεφαλής της μυοσίνης στο ινίδιο της ακτίνης μπορεί να αναλυθεί στα παρακάτω στάδια: (i) δημιουργία συμπλέγματος ακτίνης – S1 (κατάσταση ασθενούς δεσμού), (ii) υδρόφοβη αλληλεπίδραση και αναδιάταξη του συμπλέγματος (κατάσταση ισχυρού δεσμού), (iii) ισομερισμός με μεγάλη αύξηση του όγκου (κατάσταση ακαμψίας). Η αναδιάταξη στο δεύτερο στάδιο ενισχύει το δεσμό της ακτίνης και εξασθενεί το δεσμό του ATP με τη κεφαλή μυοσίνης [13]. Το τρίτο στάδιο σχετίζεται με την παροχή δύναμης του βιοχημικού κύκλου της ATPασης [10]. Οι Guo & Guilford (2006) ανακάλυψαν επιπλέον στάδια των τεντωμένων κεφαλών μυοσίνης ενώ ερευνούσαν μεμονωμένα μόρια.

### **Τύποι μυών**

Τα χαρακτηριστικά της σμίκρυνσης του μυός και της ανάπτυξης της δύναμης μπορούν να διαφέρουν πολύ ανάμεσα σε διαφορετικούς τύπους μυϊκών ινών. Αυτές οι διαφορές συσχετίζονται με τις διαφορές στο κύκλο της ATPασης των διαφορετικών μορφών της μυοσίνης. Υπάρχουν κυρίως τρεις τύποι μυϊκών ινών: (i) τύπος I (οξειδωτικός), κόκκινος, ανθεκτικός στην αργή κόπωση, (ii) τύπος IIa (οξειδωτικός γλυκολύτης), κόκκινος, ανθεκτικός στην γρήγορη κόπωση, (iii) τύπος IIb (γλυκολύτης), λευκός, ευαίσθητος στην γρήγορη κόπωση. Επιπλέον, υπάρχει ένας τύπος IIx με ιδιότητες ανάμεσα στους τύπου IIa και IIb. Ο κινητικός κύκλος κυμαίνεται από αργός έως γρήγορος ανάλογα με το είδος του μυός [26]. Στο καρδιακό μυ των θηλαστικών, μπορούν να βρεθούν δύο μορφές της μυοσίνης: βαριά αλυσίδα α-μυοσίνης (MHC) και β- MHC. Κυρίως διαφέρουν στη μέγιστη ταχύτητα σμίκρυνσης που η α- MHC είναι τρεις φορές ταχύτερη από τη β- MHC [30]. Εκτός από αυτά τα βασικά είδη σκελετικών μυών, άλλα πολύ εξειδικευμένα είδη υπάρχουν στη φύση, π.χ. ο υπερ-ταχύς μυς ενός είδους ψαριού (swimbladder of a toadfish).

### 1.3 Σκοπός και στόχοι αυτής της εργασίας

Αυτή η εργασία σκοπό έχει την προσομοίωση των χημικών και φυσικών διεργασιών που συμβαίνουν στο εσωτερικό των σαρκομερίων. Πιο συγκεκριμένα, επιχειρείται μια κατά το δυνατόν ακριβής μοντελοποίηση της διάχυσης και των χημικών αντιδράσεων των νουκλεϊκών οξέων με και χωρίς την παρουσία κρεατίνης. Αυτό επιτυγχάνεται με την κατασκευή λεπτομερούς γεωμετρίας σε 2 διαστάσεις χρησιμοποιώντας το εμπορικό πακέτο Comsol Multiphysics [44]. Κατασκευάστηκαν, με ήδη υπάρχον μαθηματικό μοντέλο, ρεαλιστικές γεωμετρίες σαρκομερίων που περιλαμβάνουν τα ινίδια μυοσίνης και ακτίνης σε διαφορετικές πυκνότητες πλέγματος. Οι διαφορετικές πυκνότητες αντιστοιχούν σε διαφορετικά μήκη των σαρκομερίων (επιμηκυμένη κατάσταση, κατάσταση χαλάρωσης).

Με αυτό τον τρόπο επιδιώκεται καλύτερη κατανόηση της κατανάλωσης του ATP κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Ακόμη, έχοντας την κατατομή της συγκέντρωσης του ATP στο σαρκομέριο, γίνεται δυνατός ο καθορισμός της επίδρασης του στο ενεργειακό προφίλ των μυών. Αυτό μπορεί ενδεχομένως να οδηγήσει σε βελτιωμένες τεχνικές διάγνωσης και θεραπείας ασθενειών που σχετίζονται με την έλλειψη ATP, λαμβάνοντας υπόψη την ποσότητα που λείπει, πότε λείπει (σε ποιο κύκλο είναι ο μυς) και που υπάρχει αυτή η έλλειψη. Είναι αυτονόητο ότι η υπολογιστική ανάλυση μειώνει την ανάγκη για *in vivo* πειραματικές μετρήσεις για τα επίπεδα του ATP και την ενεργειακή κατανάλωση των μυών.

## Κεφάλαιο 2 - Βιβλιογραφική ανασκόπηση

### 2.1 Μοντελοποίηση του συστήματος

Η σύγχρονη τάση στις βιολογικές επιστήμες σε μεγάλο βαθμό φανερώνει τη μετάβαση από τις *in vitro* βιοχημικές αναλύσεις μεμονωμένων αντιδράσεων στις *in situ* αναλύσεις ολόκληρου του βιοσυστήματος [33]. Αυτή η νέα τάση απαιτεί την ανάπτυξη και εφαρμογή νέων πειραματικών τεχνικών και εργαλείων βιοπληροφορικής για την ανάλυση των δεδομένων, ώστε να υπάρξει η δυνατότητα να ξεπεραστεί η πολυπλοκότητα των βιολογικών συστημάτων. Ένα παράδειγμα θα μπορούσε να είναι η ανάλυση δεδομένων ιχνηθέτη σταθερού ισοτόπου, όπου η μη επεμβατική μέθοδος εντοπισμού *in situ* βιοδιεργασιών συμπληρώνεται από πολύπλοκο αναλυτικό λογισμικό, που αυτόματα κατασκευάζει και αναλύει τις χιλιάδες εξισώσεις του συστήματος. Μέχρι πρόσφατα, τέτοιου είδους ανάλυση ήταν διαθέσιμη μόνο για συνθήκες σταθερής κατάστασης [42], ενώ πλέον επιτρέπει τον υπολογισμό και την αξιολόγηση των παραμέτρων του συστήματος και των μεταβολικών ροών χρησιμοποιώντας αποτελέσματα σε δυναμικές συνθήκες [31,32,34]. Η σωστή περιγραφή της χωρικής κατανομής των μεταβολιτών, που ορίζονται από τοπικές δομές όπως “ασαφείς χώρους” (fuzzy spaces) [22] θα ενισχύσει την κατανόησή μας πάνω στις κυτταρικές λειτουργίες. Οι “ασαφείς χώροι” θα μπορούσαν να δημιουργήσουν μεγάλες κλίσεις των μεταβολιτών εμποδίζοντας τη διάχυση, ώστε να εμφανίζεται αρκετά μικρότερη από την αναμενόμενη με βάση το γενικό κυτταρικό συντελεστή διάχυσης. Επί του παρόντος, η ανάλυση *in situ* των ενδοκυτταρικών διαδικασιών, δεν λαμβάνει υπόψη τη χωρική κατανομή των μεταβολιτών, χρησιμοποιώντας το μέσο όρο των κατανομών τους στον ενδοκυτταρικό χώρο. Παίρνοντας τους μέσους όρους των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών, η πραγματική εικόνα θα μπορούσε να αλλοιωθεί σε σημαντικό βαθμό, εμποδίζοντας την κατανόηση των βιολογικών διεργασιών. Ο Selivanov et. al. [33] επιχειρεί να ξεπεράσει αυτόν τον περιορισμό στην περίπτωση των καρδιακών



κυττάρων υπολογίζοντας με το μαθηματικό μοντέλο του [33], το οποίο χρησιμοποιείται και στην παρούσα εργασία, την κατανομή του ATP στα μυοϊνίδια.

Τα καρδιακά κύτταρα καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες ATP, και ανισορροπία ανάμεσα στη ζήτηση του ATP, την παραγωγή του και τη μεταφορά του μπορεί να είναι ένδειξη για μία σειρά από ασθένειες [5,23]. Η υψηλή τιμή του συντελεστή διάχυσης του ATP, όπως προκύπτει από τη τεχνική του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, υπονοεί ότι το ATP ακολουθεί ομογενειακή κατανομή. Σε αυτή την περίπτωση, η συγκέντρωσή του παραμένει επαρκής για να διατηρήσει την λειτουργία όλων των διεργασιών που απαιτούν κατανάλωση ενέργειας στα κύτταρα. Έτσι, στη περίπτωση που η μέση συγκέντρωση του ATP παραμένει υψηλή, η ύπαρξη ελλείμματος ενέργειας φαίνεται ως παράδοξο [4], αλλά παρόλα αυτά μπορεί να συμβεί [17]. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι το ATP κατανέμεται ανομοιόμορφα στο χώρο, έτσι ώστε μία μεγάλη μείωση σε μικρές περιοχές θα μπορούσε να εκδηλωθεί ως μια μικρή μείωση στη μέση τιμή της συγκέντρωσης. Αυτή η εξήγηση συνάδει με το γνωστό γεγονός ότι εάν η διάχυση του ATP διευκολύνεται από την παράλληλη διάχυση του PCr και της Κινάσης της Κρεατίνης, το εύρος των συγκεντρώσεων του ATP είναι υψηλότερο [28]. Ακόμη, *in vitro* πειραματικές μελέτες έχουν δείξει περιορισμούς στη διάχυση του ATP στα μυοϊνίδια [2,25].

Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε μία διαδικασία [33] για την εκτίμηση του φαινομένου συντελεστή διάχυσης σε απομονωμένα μυοϊνίδια, χρησιμοποιώντας μία συγκεκριμένη υπολογιστική μέθοδο που βασίζεται στην ανάλυση της ενεργότητας της ATPασης. Σε απουσία της φωσφοκρεατίνης, η μυοϊνιδιακή ATPαση εκφρασμένη ως συνάρτηση του ATP φαίνεται να είναι λιγότερο ενεργή απ' ό,τι στη παρουσία της φωσφοκρεατίνης. Περιορισμοί στη διάχυση του ATP παράλληλα με την κατανάλωσή του στο εσωτερικό των μυοϊνιδίων, θα είχαν σαν αποτέλεσμα μικρότερη συγκέντρωση του ATP στο εσωτερικό απ' ό,τι στον ενδιάμεσο χώρο των ινιδίων. Στα επόμενα κεφάλαια περιγράφεται λεπτομερώς η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε και παρατίθενται τα αποτελέσματα για τα μοντέλα.

## 2.2 Κινητικοί μηχανισμοί

Το μοντέλο το οποίο επιλέχθηκε για αυτήν την εργασία θεωρεί σύστημα Διάχυσης – Αντίδρασης των στοιχείων τριφωσφορικής αδενοσύνης (ATP), διφωσφορικής αδενοσύνης (ADP), μονοφωσφορικής αδενοσύνης (AMP), φωσφοκρεατίνης και κρεατίνης. Για να πραγματοποιηθούν αυτές τις αντιδράσεις απαιτείται η ύπαρξη κάποιων πρωτεϊνών που χρησιμεύουν ως καταλύτες. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι η ΑΤΡαση, η Αδενυλική Κινάση και η Κινάση της Κρεατίνης.

Οι αντιδράσεις που συμβαίνουν στο εσωτερικό των μυϊκών ινών είναι:



Όταν ένα μόριο ATP συνδέεται στην κεφαλή της μυοσίνης, αντιδρά σύμφωνα με την αντίδραση (2.1) και δίνει ως προϊόντα ADP και φωσφορική ρίζα. Ακόμα, στο εσωτερικό των μυϊκών ινών δύο μόρια ADP αντιδρούν μεταξύ τους και δίνουν ένα μόριο ATP και ένα μόριο AMP, σύμφωνα με την αντίδραση (2.2). Τέλος, στην περίπτωση που υπάρχει φωσφοκρεατίνη, το ADP και το CrP αντιδρούν και παράγονται ATP και Cr, σύμφωνα με την αντίδραση (2.3). Η συγκέντρωση του ATP στο κυτταρόπλασμα, είναι συνήθως επτά με δέκα φορές υψηλότερη από αυτή του ADP και περισσότερο από εκατό φορές από αυτή του AMP. Παρακάτω παρουσιάζονται οι κινητικές των αντιδράσεων (2.1), (2.2) και (2.3).

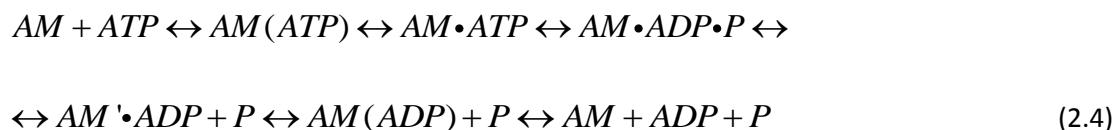
### 2.2.1 ΑΤΡαση

Η ΑΤΡαση είναι το ένζυμο που καταλύει την αποσύνθεση της τριφωσφορικής αδενοσύνης (ATP) σε διφωσφορική αδενοσύνη (ADP) και ένα ελεύθερο φωσφορικό ιόν. Αυτή η αντίδραση ελευθερώνει ενέργεια, όπου χρησιμοποιείται για να πραγματοποιηθούν άλλες χημικές ή φυσικές δράσεις.

Ο κινητικός μηχανισμός της ΑΤΡασης έχει ερευνηθεί εκτενώς τα τελευταία 40 χρόνια. Οι περισσότερες έρευνες έχουν γίνει για τμήμα του ινιδίου μυοσίνης που περιέχει μία μόνο κεφαλή, επειδή η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών στην υψηλότερη φυσιολογική ιοντική ισχύ είναι πιο αδύναμη [24]. Μετέπειτα έρευνες έγιναν και σε ολόκληρα μυϊκά ινίδια [41]. Τα δύο συστήματα ήταν συμπληρωματικά. Το πλεονέκτημα με τις ίνες είναι ότι σε αυτές μπορεί να μελετηθεί η επίδραση της μηχανικής τάσης στο ρυθμό των αντιδράσεων, ενώ τα μυϊκά ινίδια επιτρέπουν πιο ακριβείς μετρήσεις αρκετών σταδίων του μηχανισμού, περιλαμβανομένου και της αντίδρασης υδρόλυσης.

Ένας απλοποιημένος μηχανισμός αντίδρασης περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα: τη δέσμευση της τριφωσφορικής αδενοσύνης (ATP) στη κεφαλή της μυοσίνης, την αντίδραση του ATP πάνω στη ΑΤΡαση, την απελευθέρωση της διφωσφορικής αδενοσύνης (ADP) και του φωσφορικού ιόντος (Pi), που είναι τα προϊόντα [37].

Πιο πρόσφατα πειράματα αποκαλύπτουν ένα πιο περίπλοκο κινητικό μηχανισμό:



Οι κινητικές σταθερές ρυθμού υπολογίστηκαν από τον Ma and Taylor (1994) σε μόνιμες συνθήκες στο εσωτερικό των μυϊκών ινών.

Η ενεργότητα της ΑΤΡασης θεωρείται ότι ακολουθεί κινητική Michaelis – Menten:

$$J_{ATP} = \frac{V_m [ATP]}{K_m \left( 1 + \frac{[ADP]}{K_i} \right) + [ATP]} \quad (2.5)$$

Όπου  $V_m$  είναι η μέγιστη ταχύτητα που μπορεί να φτάσει το σύστημα και έχει την τιμή 0.22 mM/s (28) (όπου  $[M]=\text{mol/L}$ ). Το  $K_m$  είναι η συγκέντρωση υποβάθρου στην οποία η ταχύτητα αντίδρασης είναι η μισή της μέγιστης, και παίρνει την τιμή 200  $\mu\text{M}$  (29). Οι μονάδες του  $J_{ATP}$  είναι  $[\text{mM/s}]$ .

### 2.2.2 Αδενυλική Κινάση

Η Αδενυλική Κινάση (ΑΚ) είναι ένα ένζυμο που καταλύει την μετατροπή της διφωσφορικής αδενίνης σε ΑΤΡ και ΑΜΡ (αντίδραση (2.2)). Ο κινητικός μηχανισμός της Αδενυλικής Κινάσης είναι δευτέρου βαθμού. Η μαθηματική έκφραση του ρυθμού της αντίδρασης (2.2) είναι [33]:

$$J_{AK} = \frac{\left( \frac{v_1 [ATP][AMP]}{K_{ai} K_b} - \frac{v_{01} [ADP][ADP]}{K_{id} K_d} \right)}{\text{den}} \quad (2.6)$$

Όπου den είναι μία αδιάστατη μεταβλητή και η έκφραση της είναι:

$$\text{den} = 1 + \left( \frac{[\text{AMP}]}{K_{ib}} \right) + \left( \frac{[\text{ADP}]}{K_{id}} \right) + [\text{ATP}] \left( \frac{1}{K_{ia}} + \frac{[\text{AMP}]}{K_{ia} K_b} \right) + [\text{ADP}] \left( \frac{1}{K_{ic}} + \frac{[\text{ADP}]}{K_d K_{ic}} + \frac{[\text{AMP}]}{K_{ic} K_{1b}} \right) \quad (2.7)$$

Η σταθερά ισορροπίας της Αδενυλικής Κινάσης  $K_{AK} = (\text{ATP} \times \text{AMP} / \text{ADP}^2)$ , έχει μετρηθεί πειραματικά στο κυτταρόπλασμα και έχει βρεθεί ότι είναι περίπου ίση με 1 (30-32). Οι μονάδες του ρυθμού της Αδενυλικής Κινάσης ( $J_{AK}$ ) είναι [mM/s].

Οι τιμές των παραμέτρων και οι μονάδες τους παρουσιάζονται στο παρακάτω πίνακα.

Παράμετρος	Τιμή	Μονάδες
$v_1$	300	mM/s
$v_{01}$	300	mM/s
$K_{ia}$	0,1	mM
$K_{ib}$	0,1	mM
$K_b$	0,1	mM
$K_d$	0,1	mM
$K_{1b}$	34,9	mM
$K_{id}$	0,1	mM
$K_{ic}$	0,1	mM

### 2.2.3 Κινάση της Κρεατίνης

Η Κινάση της Κρεατίνης είναι το ένζυμο που καταλύει την αντιστρεπτή αντίδραση (2.3). Μετατρέπει ένα μόριο ADP και ένα μόριο CrP σε ATP και Cr. Το ένζυμο αυτό, συνήθως εμπλέκεται στο μεταβολισμό της ενέργειας στα κύτταρα με υψηλή ενεργειακή ζήτηση. Η κινητική της αντίδρασης είναι πρώτης τάξης. Η μαθηματική έκφραση του μηχανισμού είναι η εξής:

$$J_{CK} = \frac{\left( \frac{v_1 [ATP][Cr]}{K_{ic} K_b} - \frac{v_{01} [ADP][CrP]}{K_{id} K_d} \right)}{\text{den}} \quad (2.8)$$

Όπου den είναι μία αδιάστατη μεταβλητή και η έκφραση της είναι:

$$\begin{aligned} \text{den} = & 1 + \left( \frac{[Cr]}{K_{ib}} \right) + \left( \frac{[CrP]}{K_{id}} \right) + [ATP] \left( \frac{1}{K_{ia}} + \frac{[Cr]}{K_{ia} K_b} \right) \\ & + [ADP] \left( \frac{1}{K_{ic}} + \frac{[CrP]}{K_d K_{ic}} + \frac{[Cr]}{K_{ic} K_{lb}} \right) \end{aligned} \quad (2.9)$$

Οι τιμές των παραμέτρων και οι μονάδες τους παρουσιάζονται στο παρακάτω πίνακα.

Παράμετρος	Τιμή	Μονάδες
$v_1$	6,886	mM/s
$v_{01}$	29,333	mM/s
$K_{ia}$	0,9	mM
$K_{ib}$	34,9	mM
$K_b$	15,5	mM
$K_d$	4,73	mM
$K_{1b}$	34,9	mM
$K_{id}$	4,73	mM
$K_{ic}$	0,2224	mM

Η σταθερά ισορροπίας της Κινάσης της Κρεατίνης  $K_{CK} = (ATP \times Cr / ADP \times CrP)$ , έχει μετρηθεί πειραματικά στο κυτταρόπλασμα και έχει βρεθεί ότι είναι περίπου ίση με 160. Οι μονάδες του ρυθμού της Κινάσης της Κρεατίνης ( $J_{CK}$ ) είναι [mM/s].

## Κεφάλαιο 3 – Μοντελοποίηση

### 3.1 COMSOL Multiphysics

Για την μοντελοποίηση του φυσικού προβλήματος χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό πακέτο Comsol Multiphysics [44]. Το πακέτο προσφέρει τη δυνατότητα στο χρήστη να χρησιμοποιήσει ένα ιδιαίτερα εύχρηστο περιβάλλον για την προσομοίωση του προβλήματος του. Υπάρχει ακόμα η δυνατότητα χρήσης πολλαπλών μοντέλων για τη περιγραφή του φυσικού προβλήματος, καθώς επίσης δίνεται η δυνατότητα σύνδεσης του Comsol με το Matlab. Η κατασκευή της γεωμετρίας του προβλήματος μπορεί να γίνει στο ίδιο το Comsol, μέσα από ένα CAD. Για περίπλοκες γεωμετρίες, δίνεται η δυνατότητα κατασκευής της γεωμετρίας σε άλλα πακέτα, π.χ. AutoCAD, και στη συνέχεια να γίνει εισαγωγή της στο Comsol.

Για την μοντελοποίηση του συστήματος Διάχυσης – Αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε η Μερική Διαφορική Εξίσωση του Comsol σε μορφή συντελεστών (coefficient form) [44]. Η γενική μορφή αυτής της εξίσωσης είναι :

$$e_a \frac{\partial^2 u}{\partial t^2} + d_a \frac{\partial u}{\partial t} + \nabla \cdot (-c \nabla u - au + \gamma) + \beta \cdot \nabla u + \alpha u = f \quad (3.1)$$

- $u = u(x,y,z,t)$  είναι η άγνωστη βαθμοτή συνάρτηση
- $e_a$  είναι ο συντελεστής μάζας (mass coefficient)
- $d_a$  είναι ο συντελεστής απόσβεσης ή μάζας (dumping or a mass coefficient)
- $c$  είναι ο συντελεστής διάχυσης (diffusion coefficient)



- $\alpha$  είναι ένας συντελεστής συναγωγής (conservative flux convection coefficient)
- $\beta$  είναι το διάνυσμα του συντελεστή συναγωγής (convection coefficient)
- $a$  είναι ο συντελεστής απορρόφησης (absorption coefficient)
- $\gamma$  είναι ο όρος ροής πηγής (conservative flux source)
- $f$  είναι ο όρος πηγής (source term)

Μπορούμε να αναπαραστήσουμε τις δικές μας διαφορικές εξισώσεις, αντικαθιστώντας κατάλληλα τις παραπάνω ποσότητες.

Το Comsol επιλύει τις διαφορικές εξισώσεις με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων [44,45]. Το λογισμικό κατασκευάζει τα πεπερασμένα στοιχεία με αυτόματο τρόπο δημιουργώντας στη γεωμετρία ένα πλέγμα πάνω στο οποίο διακριτοποιούνται οι εξισώσεις και μετασχηματίζονται σε συστήματα μη γραμμικών αλγεβρικών εξισώσεων με αγνώστους τις τιμές των άγνωστων συναρτήσεων στους κόμβους του πλέγματος. Οι μη γραμμικές αλγεβρικές εξισώσεις γραμμικοποιούνται και στη συνέχεια επιλύονται από έναν επιλύτη του συστήματος, όπως οι MUMPS, PARDISO, SPOOLES. Ο γραμμικός επιλύτης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν ο άμεσος (Direct) επιλύτης MUMPS, κατάλληλος για την επίλυση μεγάλων αραιών συστημάτων γραμμικών αλγεβρικών εξισώσεων.

### 3.2 1-D Μοντελοποίηση στο Comsol

Η γεωμετρία που επιλέχθηκε για την επίλυση του μοντέλου σε μία διάσταση είναι 1-D axial symmetry. Για την επίλυση του συστήματος Διάχυσης-Αντίδρασης σε γεωμετρία 1-D χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση (3.1)

### 3.2.1 Μοντέλο με απουσία φωσφοκρεατίνης

Οι Μερικές Διαφορικές Εξισώσεις που περιγράφουν την κατανομή των συγκεντρώσεων των ATP, ADP και AMP κατά το μήκος της ακτίνας ενός κυλινδρικού μυϊκού ινιδίου για κάθε χρονική στιγμή, είναι οι ακόλουθες, και προκύπτουν από την εξίσωση (3.1) θέτοντας τις παραμέτρους  $e_a$ ,  $a$ ,  $\alpha$  και  $\gamma$  μηδέν. Ο  $d_a$  θεωρείται μηδέν ή ένα, ανάλογα με το μοντέλο (Μόνιμη και Δυναμική Κατάσταση αντίστοιχα).

Ο  $\beta$  για την 1-D γεωμετρία είναι  $-\frac{D}{r}$ . Ο  $c$  αντικαθίσταται με τον όρο  $D$  (μία παράμετρος που εμείς ελέγχουμε). Στο  $f$  (Συντελεστής Πηγής) τοποθετείται ο όρος  $-J_{ATP} - J_{AK}$  για το μοντέλο που απουσιάζει η φωσφοκρεατίνη. Για αυτό το μοντέλο

(1-D axial symmetry) ο τελεστής κλίσης ορίζεται ως  $\nabla = \left[ \frac{\partial}{\partial r} \right]$ .

Για την κατανομή του ATP:

$$\frac{\partial ATP[r,t]}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 ATP[r,t]}{\partial r^2} + \frac{\partial ATP[r,t]}{r \partial r} \right) - J_{ATP} - J_{AK} \quad (3.2)$$

Για την κατανομή του AMP:

$$\frac{\partial AMP[r,t]}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 AMP[r,t]}{\partial r^2} + \frac{\partial AMP[r,t]}{r \partial r} \right) - J_{AK} \quad (3.3)$$

Σύμφωνα με το ισοζύγιο μάζας, η συγκέντρωση του ADP, δίνεται από τον παρακάτω τύπο :

$$ADP[r,t] = ANT - ATP[r,t] - AMP[r,t] \quad (3.4)$$

Όπου ANT είναι η συνολική συγκέντρωση των νουκλεοτιδίων, που θεωρείται ίση με το εξωτερικό ATP.

### Συνοριακές Συνθήκες

Τα όρια του χωρίου στο οποίο γίνεται επίλυση είναι  $0 < r < 1\mu\text{m}$ . Οι συνοριακές συνθήκες της εξίσωσης (3.2) είναι τύπου Dirichlet. Η συνοριακή συνθήκη Dirichlet χρησιμοποιείται για να καθορίσει τις τιμές μίας λύσης που θα πρέπει να λάβει στο σύνορο του χωρίου επίλυσης της εξίσωσης.

Το ATP, που παράγεται στα μιτοχόνδρια, διαχέεται αρχικά στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια μεταφέρεται στο εσωτερικό του ινιδίου, όπου καταναλώνεται. Στο εξωτερικό όριο ( $R=1\mu\text{m}$ ), η συνολική συγκέντρωση των νουκλεοτιδίων αδενίνης θεωρείται ίση με το εξωτερικό ATP [33], (Dirichlet Boundary Condition  $ATP=a$ ,  $a=[\text{set value}]$ ).

$$ATP[R,t] = ANT \quad (3.5)$$

Όπου ANT είναι η συνολική εξωτερική συγκέντρωση των νουκλεοτιδίων αδενίνης.

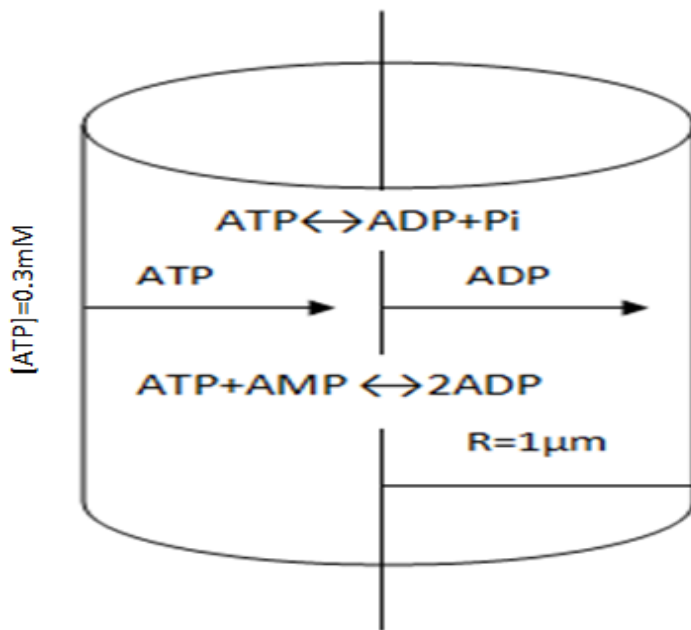
Στο εσωτερικό όριο ( $r = 0$ ) τέθηκε συνθήκη μηδενικής ροής (Zero Flux), λόγω αξονικής συμμετρίας.

Για την εξίσωση (3.3), στο εξωτερικό όριο ( $R=1\mu\text{m}$ ) τέθηκε συνοριακή συνθήκη Dirichlet. Η τιμή που του δώσαμε είναι μηδέν.

$$AMP[R,t] = 0 \quad (3.6)$$

Στο εσωτερικό όριο ( $r = 0$ ) τέθηκε συνθήκη μηδενικής ροής (Zero Flux), λόγω αξονικής συμμετρίας.

Το  $r$  είναι κατά μήκος της ακτίνας ενός κυλινδρικού μυϊκού ινιδίου, όπου το μήκος του είναι  $R=1\mu\text{m}$ . Στην Εικόνα 5 παρουσιάζεται το μοντέλο σχηματοποιημένο, απεικονίζοντας τις αντιδράσεις, τη διάχυση του ATP προς το εσωτερικό του σαρκομερίου και την αντίστροφη διάχυση του ADP.

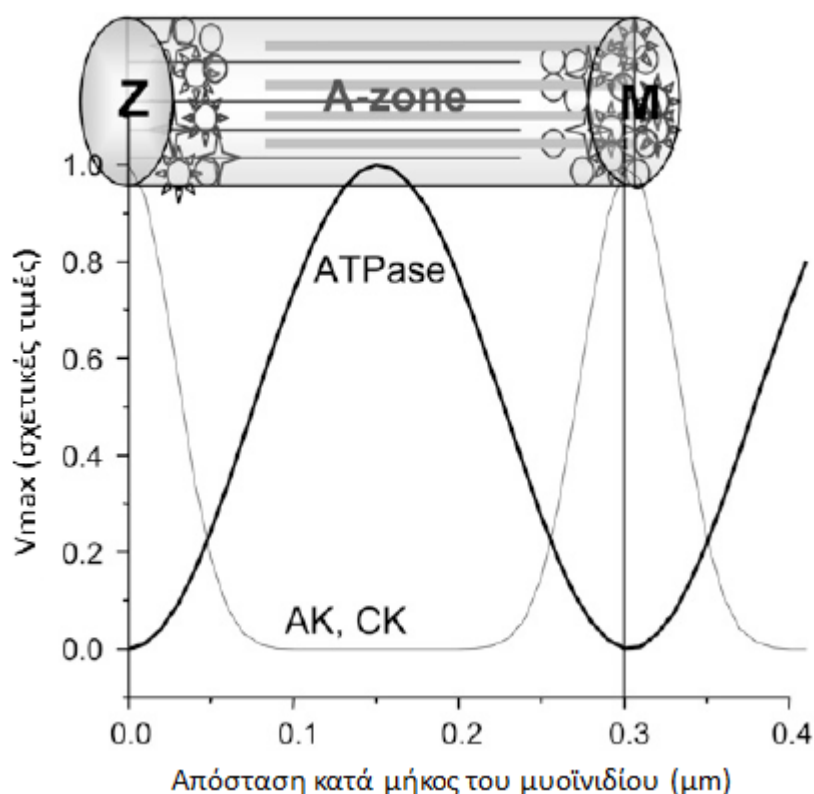


Εικόνα 5: Σχηματοποιημένο μοντέλο μίας διάστασης

### 3.2.2 Μοντέλο με παρουσία φωσφοκρεατίνης

Σε αυτήν την μελέτη περίπτωσης, το μοντέλο επεκτάθηκε για να περιλαμβάνει δύο επιπλέον ενώσεις (Cr and CrP) και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ όλων των συστατικών του συστήματος. Συνολικά στο μοντέλο προστέθηκαν ένας επιπλέον ρυθμός αντίδρασης (2.8) και μία μερική διαφορική εξίσωση που περιγράφει τη διασπορά του CrP κατά μήκος της ακτίνας του ινιδίου.

Δεδομένα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο [40] δείχνουν ότι οι μέγιστες ενεργότητες των CK και AK εντοπίζονται στις M- και Z- γραμμές του σαρκομέριου, ενώ σε αυτά τα σημεία η ATPase είναι ελάχιστη. Αντίθετα η μέγιστη ενεργότητα της ATPase εντοπίζεται στη μέση της ζώνης A, ανάμεσα στα αλληλεπικαλυπτόμενα μέρη των ακτινών και των μυοσινών, όπως φαίνεται στην εικόνα 6. Η απόσταση ανάμεσα στις M- και Z- γραμμές θεωρήθηκε σταθερή και ίση με 0.3  $\mu\text{m}$  [33].



Εικόνα 6: Σχετικές τιμές των ρυθμών των ενζύμων κατά μήκος του σαρκομέριου.

Πειραματικά η μέγιστη ενεργότητα της ΑΤΡασης εντοπίζεται στο τμήμα εκείνο του σαρκομερίου όπου αλληλεπικαλύπτονται τα ινίδια μυοσίνης και ακτίνης. Οπότε, για να έχουμε την μεγαλύτερη κατανάλωση ΑΤΡ, εργαζόμαστε στο  $z = 0.15 \mu\text{m}$ .

Οι Μερικές Διαφορικές Εξισώσεις που περιγράφουν την κατανομή των συγκεντρώσεων των ΑΤΡ, ΑDΡ, ΑΜΡ, CrP και Cr κατά το μήκος της ακτίνας ενός κυλινδρικού μυϊκού ινιδίου για κάθε χρονική στιγμή, είναι οι ακόλουθες, και προκύπτουν από την εξίσωση (3.1) θέτοντας τις παραμέτρους  $e_a$ ,  $a$ ,  $\alpha$  και  $\gamma$  μηδέν.

Ο  $d_a$  θεωρείται μηδέν (Μόνιμη Κατάσταση). Ο  $\beta$  για την 1-D γεωμετρία είναι  $-\frac{D}{r}$ . Ο  $f$  αντικαθίσταται με τον όρο  $D$  (μία παράμετρος που εμείς ελέγχουμε). Στο  $f$  (Συντελεστής Πηγής) τοποθετείται ο όρος  $-J_{ATP} - J_{AK} - J_{CK}$  για το μοντέλο με την με την φωσφοκρεατίνη παρούσα. Για αυτό το μοντέλο (1-D axial symmetry) ο τελεστής κλίσης ορίζεται ως  $\nabla = \left[ \frac{\partial}{\partial r} \right]$ .

Για την κατανομή του ΑΤΡ:

$$\frac{\partial ATP[r,t]}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 ATP[r,t]}{\partial r^2} + \frac{\partial ATP[r,t]}{r \partial r} \right) - J_{ATP} - J_{AK} - J_{CK} \quad (3.7)$$

Για την κατανομή του ΑΜΡ:

$$\frac{\partial AMP[r,t]}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 AMP[r,t]}{\partial r^2} + \frac{\partial AMP[r,t]}{r \partial r} \right) - J_{AK} \quad (3.8)$$

Για την κατανομή του CrP:

$$\frac{\partial CrP[r,t]}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 CrP[r,t]}{\partial r^2} + \frac{\partial CrP[r,t]}{r \partial r} \right) - J_{CK} \quad (3.9)$$

Για τις κατανομές του ADP ισχύουν:

$$ADP[r,t] = ANT - ATP[r,t] - AMP[r,t] \quad (3.10)$$

Η κατανομή του Cr δίνεται από το παρακάτω ισοζύγιο μάζας:

$$Cr[r,t] = CrT - CrP[r,t] \quad (3.11)$$

### **Συνοριακές Συνθήκες**

Οι ενεργότητες των Αδενυλική Κινάση (AK) και Κινάση Κρεατίνης (CK) που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, θεωρούμε ότι βρίσκονται σε κατάσταση ισορροπίας. Η συνολική συγκέντρωση των νουκλεοτιδίων (ANP), θεωρείται ίση με 7 mM ([ANP]= 7 mM) και η συνολική συγκέντρωση της κρεατίνης (CrT) θεωρείται ίση με 40 mM ([CrT] = 40 mM) [33].

Οι συνοριακές συνθήκες για την εξίσωση (3.7) είναι τύπου Dirichlet:

$$ATP[R, t] = c_0 \quad (3.12)$$

Στο εσωτερικό όριο ( $r = 0$ ) επιβάλλεται συνθήκη μη ροής (Zero Flux) λόγω αξονικής συμμετρίας.

Συνοριακή συνθήκη Dirichlet χρησιμοποιήθηκε επίσης στο  $r = R$  για την εξίσωση (3.8):

$$AMP[R, t] = [ANP] - c_0 - d_0 \quad (3.13)$$

Όπου  $d_0$  είναι η συγκέντρωση του ADP στο κυτταρόπλασμα. Υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση, που προέκυψε από τη σταθερά ισορροπίας της αντίδρασης (2.2) [33]:

$$d_0 = \frac{-c_0 + \sqrt{c_0^2 + 4[\text{ANP}]c_0K_{AK} - 4c_0^2K_{AK}}}{2K_{AK}} \quad (3.14)$$

Όπου  $t_0$  η συγκέντρωση του ATP στο κυτταρόπλασμα και το  $K_{AK}$  η σταθερά ισορροπίας της αντίδρασης (2.2). Η  $K_{AK}$  στο κυτταρόπλασμα έχει τιμή περίπου ίση με 1.

Στο εσωτερικό όριο ( $r = 0$ ) ορίστηκε συνθήκη μη ροής (Zero Flux) λόγω αξονικής συμμετρίας.

Για την εξίσωση (3.9) το εξωτερικό όριο ορίστηκε με συνοριακή συνθήκη Dirichlet:

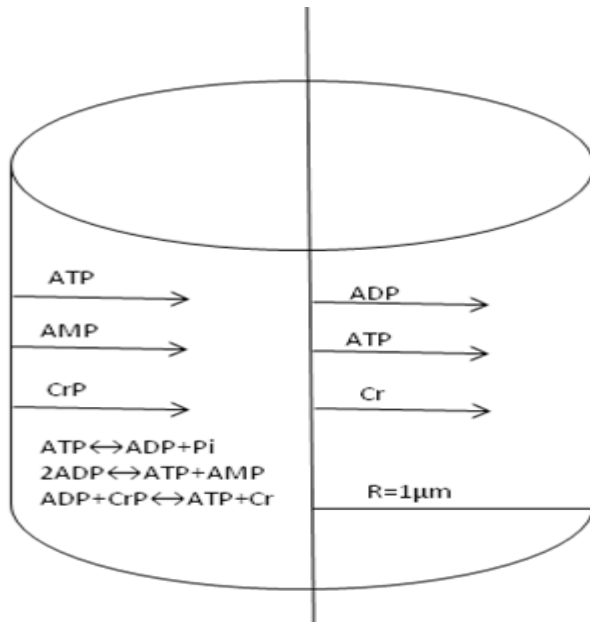
$$CrP[R, t] = \frac{[CrT]c_0}{d_0K_{CK} + c_0} \quad (3.15)$$

Η παραπάνω εξίσωση προκύπτει από την εξίσωση ισορροπίας της CK. Η τιμή της  $K_{CK}$  στο κυτταρόπλασμα είναι 160 [32].

Στο εσωτερικό όριο ( $r = 0$ ) αυτής της εξίσωσης ορίστηκε συνθήκη μη ροής, λόγω αξονικής συμμετρίας.

Οι αρχικές τιμές όλων των μεταβλητών ορίστηκαν ίσες με τις τιμές τους στις Συνοριακές Συνθήκες.





Εικόνα 7: Σχηματοποιημένο μοντέλο μίας διάστασης.

### **Μέση ενεργότητα της ΑΤΡασης**

Για να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα του μοντέλου με τις πειραματικές τιμές της ενεργότητας της ΑΤΡασης μέσα σε ένα μυϊκό ινίδιο, τα αποτελέσματα του μοντέλου πρέπει να παρουσιαστούν ως μέσες τιμές. Έτσι, η μέση ενεργότητα της ΑΤΡασης υπολογίστηκε για ένα εύρος εξωτερικών ΑΤΡ, αντίστοιχων με αυτών της βιβλιογραφίας. Η εξίσωση που δίνει τη μέση ενεργότητα της ΑΤΡασης είναι:

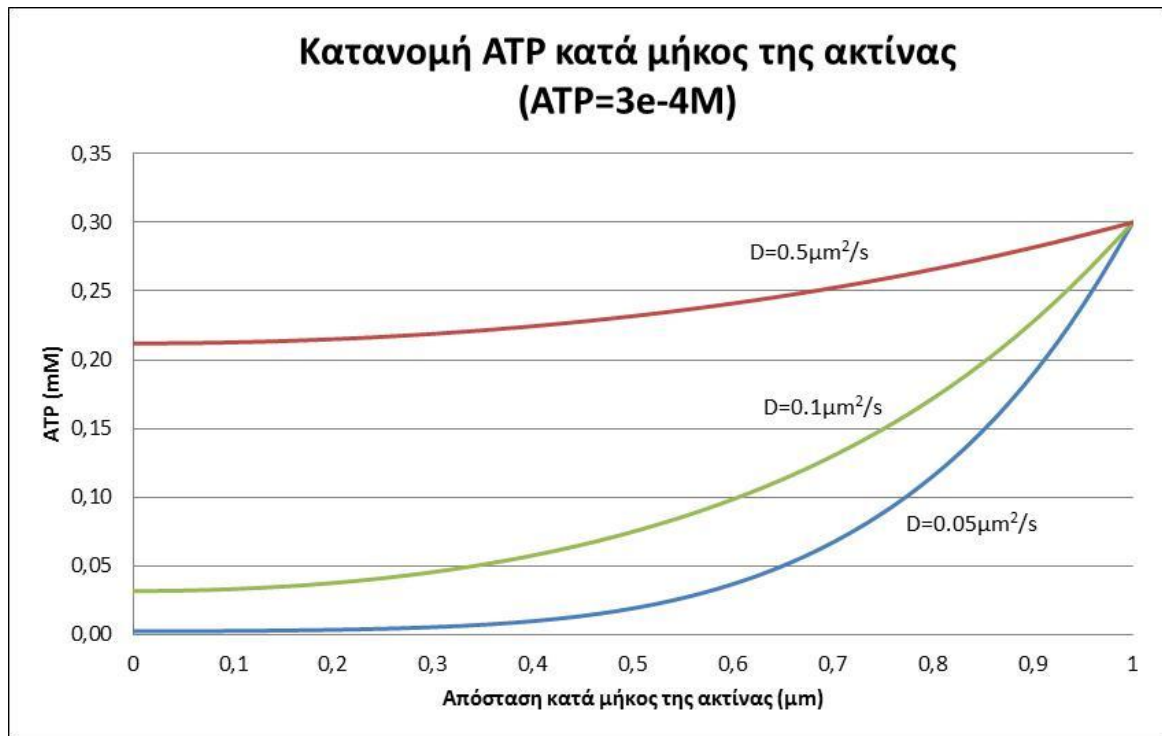
$$V_{\text{ATP}} = \frac{\int J_{\text{ATP}}(r) 2r dr}{R^2} \quad (3.16)$$

### 3.2.3 Αποτελέσματα μοντέλου 1-D

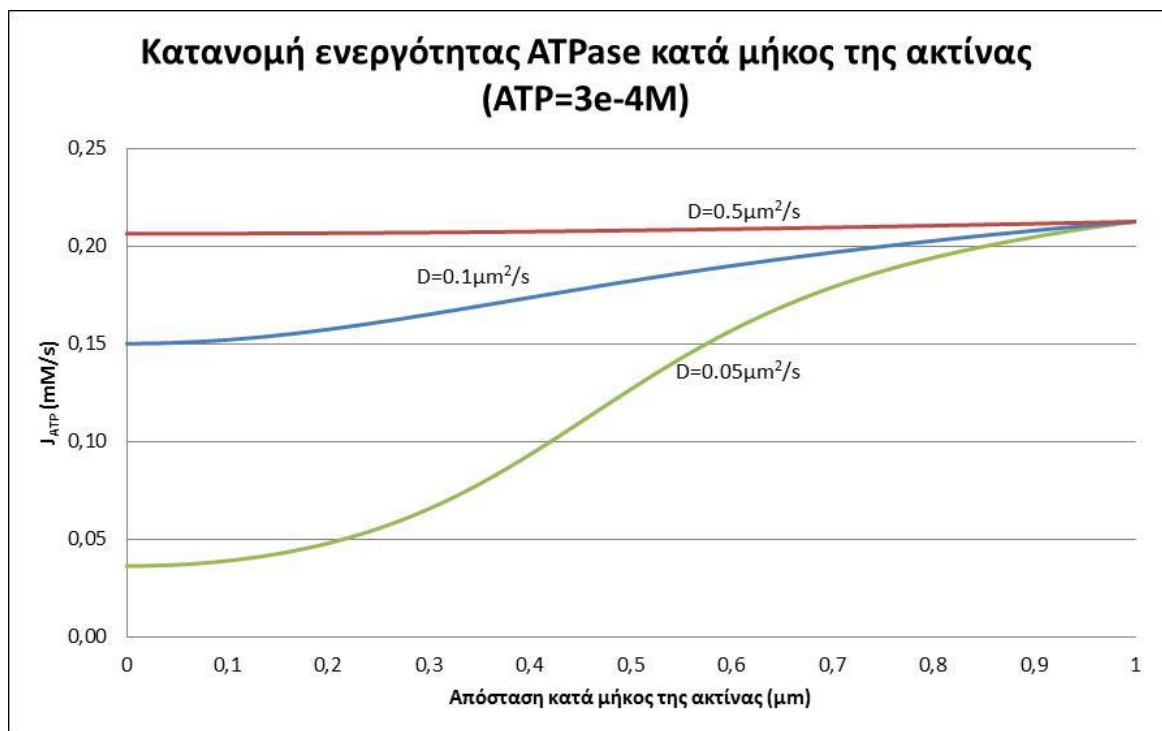
Η επίλυση του μοντέλου σε μία διάσταση ήταν υπολογιστικά εύκολη. Η απλή γεωμετρία επέτρεψε την ύπαρξη ενός πυκνού πλέγματος με λίγους βαθμούς ελευθερίας (180) και γρήγορη σύγκλιση. Η σύγκλιση επετεύχθη με ανοχή σφάλματος  $10^{-6}$ .

Τα παραπάνω μοντέλα επιλύθηκαν για διάφορες τιμές συγκέντρωσης του εξωτερικού ATP, το εύρος των οποίων καθορίζεται από τη βιβλιογραφία. Κρίθηκε σκόπιμο τα μοντέλα να επιλυθούν σε δυναμική κατάσταση με σκοπό να δημιουργηθεί ένα χρονικό προφίλ των συγκεντρώσεων. Ο μέγιστος χρόνος επίλυσης ήταν τα 15 δευτερόλεπτα. Το σύστημα έφτασε σε μόνιμη κατάσταση μετά από χρόνο 10 δευτερολέπτων, δηλαδή τα προφίλ κατανομής των συγκεντρώσεων παρέμεναν σταθερά.

Το μοντέλο με απουσία της φωσφοκρεατίνης επιλύθηκε με εξωτερικό ATP 0.3 mM και 0.4 mM. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την κατανομή του ATP και της ενεργότητας (activity) της ATPασης κατά μήκος της ακτίνας. Οι κατανομές προέκυψαν επιλύοντας τις εξισώσεις του κεφαλαίου 3.2.1 σε μόνιμη κατάσταση. Οι εξισώσεις αντιπροσωπεύουν την διάχυση του ATP, την κατανάλωση του από το σύμπλοκο ακτομυοσίνης και της αδενυλικής κινάσης.



a)

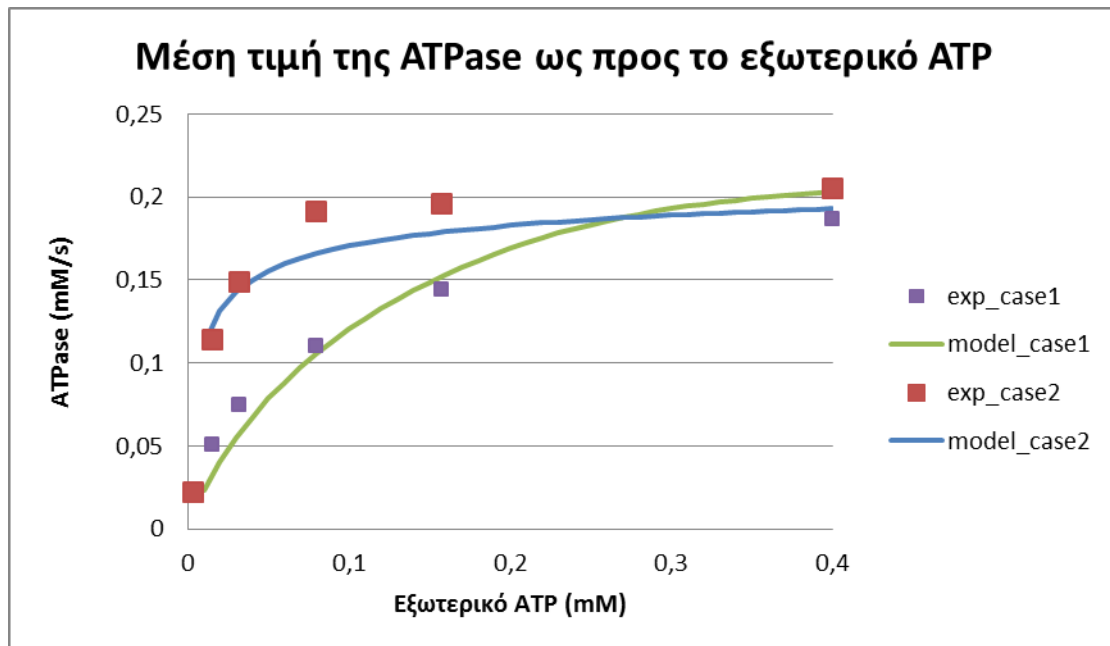


b)

Εικόνα 8: Παραμετρική ανάλυση ως προς το συντελεστή διάχυσης, με σταθερό εξωτερικό ATP ίσο με των κατανομών του ATP (a) και της ενεργότητας της ATPase (b) κατά μήκος της ακτίνας.

Η κατανομή του ATP κατά μήκος της ακτίνας υπολογίστηκε για διαφορετικές τιμές του συντελεστή διάχυσης ( $D$ ). Για χαμηλό συντελεστή, η συγκέντρωση του ATP στο εσωτερικό του σαρκομερίου είναι πολύ μικρότερη από την εξωτερική συγκέντρωση. Κατά συνέπεια, το  $D$  καθορίζει το ρυθμό αντίδρασης σε κάθε σημείο της ακτίνας, όπως φαίνεται από την Εικόνα 8. Μία μείωση του συντελεστή διάχυσης  $D$ , επηρεάζει έμμεσα την ενεργότητα της ΑΤΡασης μέσα από τη συγκέντρωση του ATP, με αποτέλεσμα μία προφανή μετατόπιση της καμπύλης κατανομής της ενεργότητας της ΑΤΡασης προς τα δεξιά.

Η τιμές που αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα είναι οι μέσες ενεργότητες της ΑΤΡασης υπολογισμένες με τη μέθοδο NMR [18]. Οι υπολογιστικές μέσες ενεργότητες της ΑΤΡασης υπολογίζονται από το  $J_{ATP}(r)$  χρησιμοποιώντας τον τύπο (3.16). Για να γίνουν αυτοί οι υπολογισμοί, έγινε παραμετρική ανάλυση ως προς το εξωτερικό ATP. Οι τιμές που χρησιμοποιήθηκαν είναι από 0.01mM έως 0.4mM με βήμα 0.01mM. Οι πειραματικές τιμές ελήφθησαν από τους Selivanov et. al. [33]. Μία μόνο παράμετρος ήταν άγνωστη στο μοντέλο, ο συντελεστής διάχυσης  $D$ . Ο κατάλληλος συντελεστής βρέθηκε συγκρίνοντας τα πειραματικά αποτελέσματα με τα υπολογιστικά με τη μέθοδο δοκιμής και σφάλματος. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 9. Ο συντελεστής που ταίριαζε καλύτερα στα πειραματικά αποτελέσματα ήταν  $D=0.1\mu\text{m}^2/\text{s}$ . Οι πειραματικές τιμές των συντελεστών παρουσιάζονται στην Εικόνα 10.



Εικόνα 9: Σύγκριση πειραματικών δεδομένων με τα υπολογιστικά αποτελέσματα. Το case1 αντιστοιχεί στο μοντέλο με απουσία της PCr, ενώ το case2 στο μοντέλο με παρουσία PCr. Το exp είναι για τα πειραματικά δεδομένα και το model για τα υπολογιστικά. Η καμπύλη model\_case1 δείχνει την εξάρτηση της ATPασης από το ATP με απουσία της φωσφοκρεατίνης, ενώ η καμπύλη model\_case2 δείχνει την εξάρτηση της ATPασης από το ATP με παρουσία φωσφοκρεατίνης.

**Table 2. Diffusion coefficients of ATP and PCr in solution**

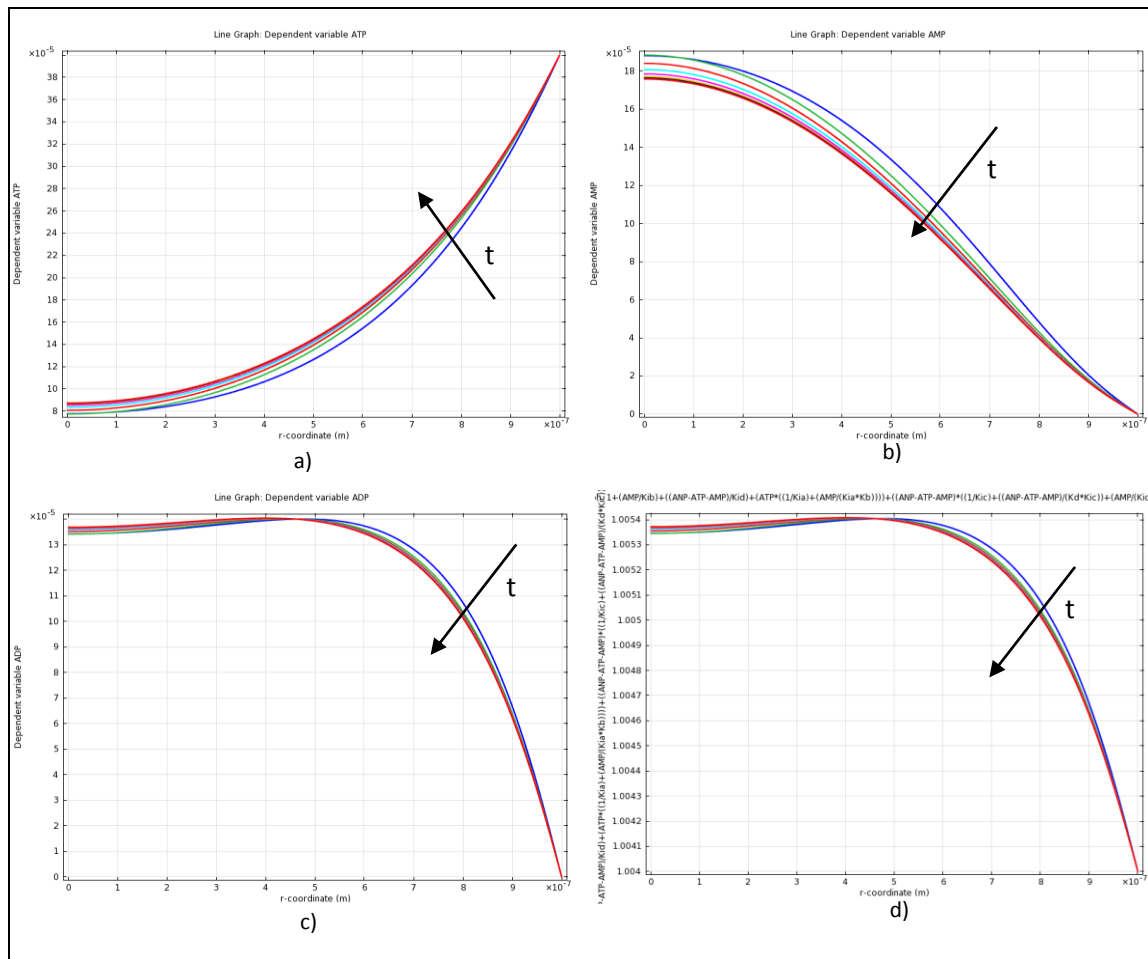
$D_{ATP}$ ( $\times 10^{-6}$ cm <sup>2</sup> /s)	$D_{PCr}$ ( $\times 10^{-6}$ cm <sup>2</sup> /s)	T (°C)	Method	Ref.
3.54 ± 0.11 (24) <sup>a</sup>	5.28 ± 0.08 (24)	25	PFG NMR	This paper
3.7 ± 0.4 (4)	5.2 ± 0.3 (4)	24	PFG NMR	19
3.8	5.4	23	PFG NMR	5
~3.8	NA	25.5	Porous diaphragm	20

Diffusion coefficients are means ± SEM (n).

<sup>a</sup> The values determined from the  $\gamma$ -,  $\alpha$ - and  $\beta$ -ATP peaks did not differ significantly (one-way repeated measures ANOVA,  $p = 0.26$ ) and  $D_{ATP}$  represents the average of these values.

Εικόνα 10: Ρυθμοί διάχυσης του ATP υπολογισμένοι πειραματικά με τη μέθοδο NMR [18].

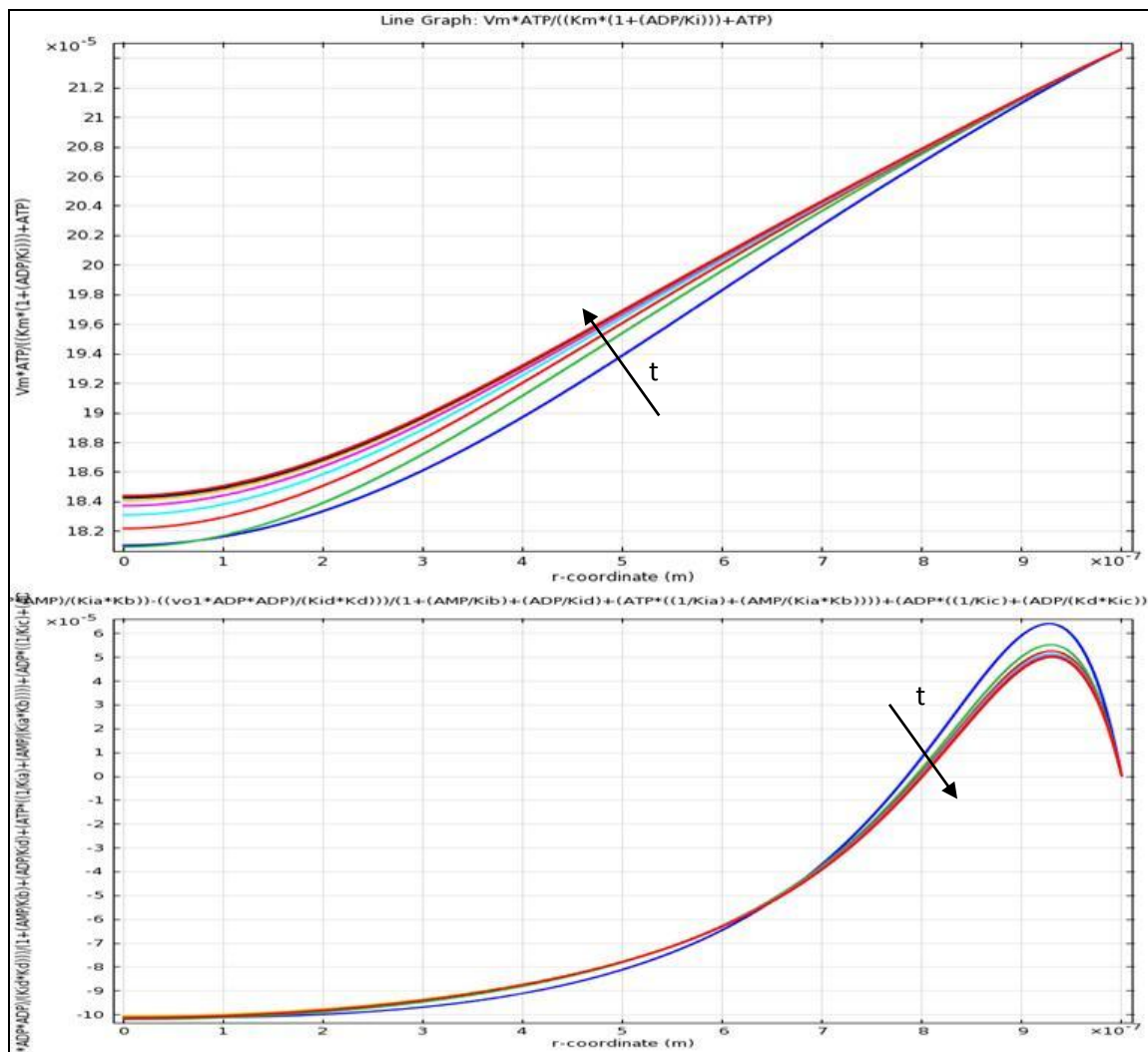
Αφού καθορίστηκε ο κατάλληλος συντελεστής για το μοντέλο, έγινε ο υπολογισμός των κατανομών των νουκλεοτιδίων στο εσωτερικό των σαρκομερίων.



Εικόνα 11: Κατανομές των α) ATP, β) AMP, γ) ADP και δ) den κατά μήκος της ακτίνας σε διάφορες χρονικές στιγμές.

Παραπάνω (Εικόνα 11) παρουσιάζονται οι κατανομές των νουκλεοτιδίων για απουσία της PCr. Η εξωτερική συγκέντρωση ATP που χρησιμοποιήθηκε είναι 0.4mM. Το ATP από την τιμή 0.4 mM που έχει στο κυτταρόπλασμα ( $R=1\mu\text{m}$ ) πέφτει περίπου στα 0.08 mM, ενώ ταυτόχρονα παράγεται AMP και ADP σύμφωνα με τις εξισώσεις (2.1) και (2.2). Στην Εικόνα 11 παρουσιάζονται οι ενεργότητες της ΑΤΡασης και της Αδενυλικής Κινάσης κατά μήκος της ακτίνας. Στην καμπύλη του  $J_{AK}$  φαίνεται καθαρά ότι για το διάστημα  $0.8 < r < 1 \mu\text{m}$  η τιμή της ενεργότητας είναι θετική, δηλαδή φορά της αντίδρασης (2.2) είναι από δεξιά προς τα αριστερά παράγοντας ADP. Για το υπόλοιπο διάστημα η δράση της αντιστρέφεται

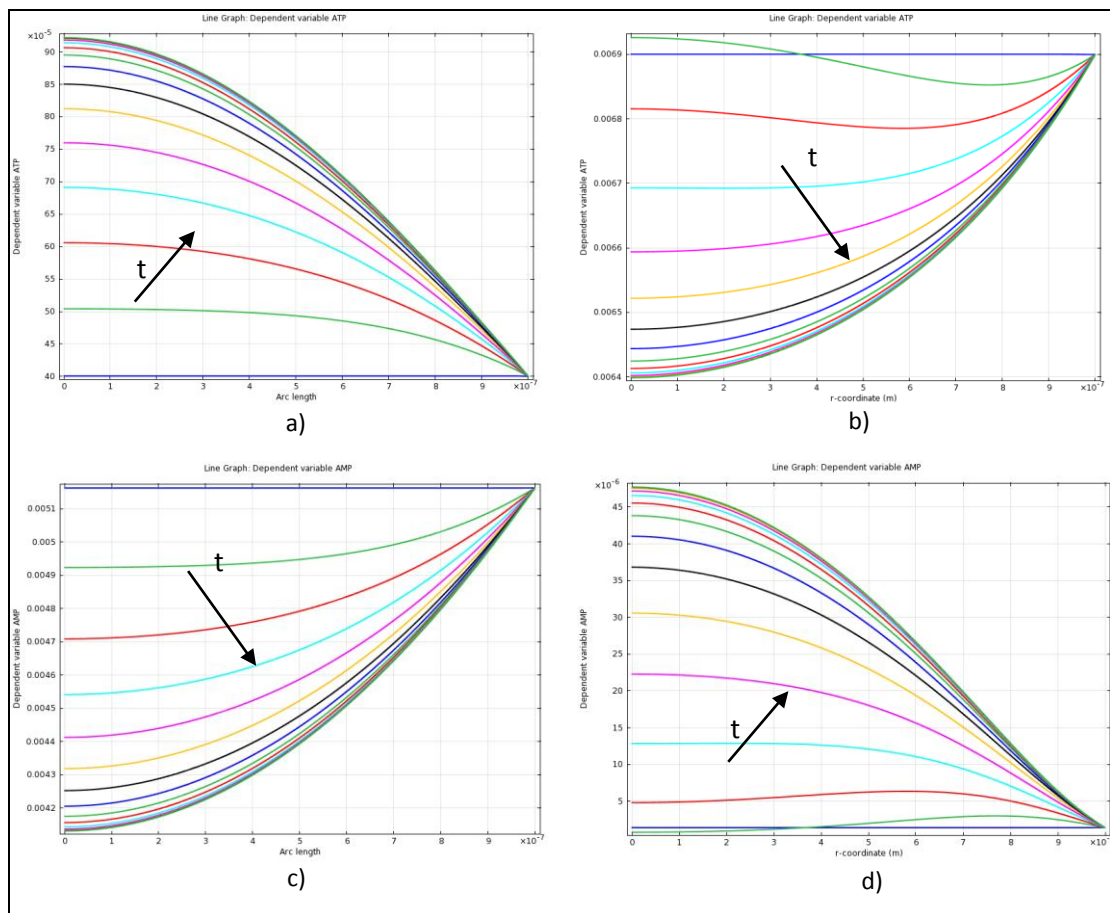
παράγοντας ATP και AMP. Αυτό μπορεί να φανεί και από την Εικόνα 10 (κατανομές του AMP και του ADP).



Εικόνα 12: Κατανομή ενεργοτήτων των ATPραση και AK κατά μήκος της ακτίνας.

Το μοντέλο με παρουσία φωσφοκρεατίνης (PCr) επιλύθηκε για εξωτερικό ATP ( $t_0$ ) 0.4 mM και 6.9 mM. Η συνολική ποσότητα των νουκλεοτιδίων αδενοσύνης είναι 7 mM, η συγκέντρωση του ADP στο κυτταρόπλασμα υπολογίζεται από την εξίσωση (3.14), ενώ η συγκέντρωση του AMP υπολογίζεται από το συνολικό ισοζύγιο μάζας (3.13). Η συνολική κρεατίνη θεωρήθηκε ίση με 40 mM. Η συγκέντρωση του CrP στο κυτταρόπλασμα υπολογίζεται από την εξίσωση (3.15) και το Cr υπολογίζεται από το

ισοζύγια μάζας της κρεατίνης. Στην Εικόνα 12 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του μοντέλου για  $c_0$  ίσο με 0.4 mM και 6.9 mM με σκοπό την σύγκρισή τους.

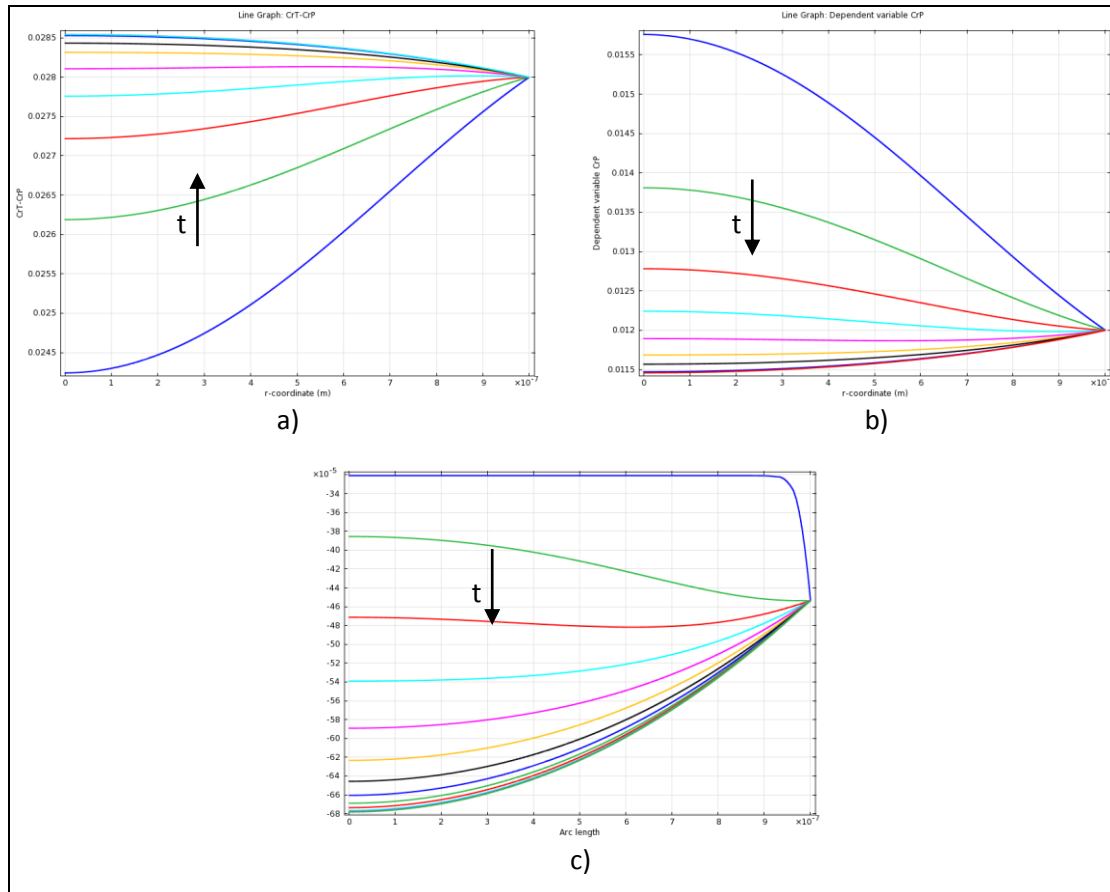


Εικόνα 13: Κατανομή συγκεντρώσεων για το ATP και AMP για αρχική εξωτερική συγκέντρωση 0.4 mM (a και c) και 6.9 mM (b και d) αντίστοιχα.

Στην Εικόνα 13.a φαίνεται η κατανομή του ATP κατά μήκος της ακτίνας με εξωτερική συγκέντρωση του ATP 0.4 mM. Παρατηρείται ότι το ATP καθώς διαχέεται στο εσωτερικό του σαρκομερίου αντί να καταναλώνεται, παράγεται. Αυτό οφείλεται στις συγκεντρώσεις των άλλων νουκλεοτιδίων, καθώς είναι πολύ υψηλές και αλλάζουν την κατεύθυνση των αντιδράσεων. Αντίθετα, στη 13.b η εξωτερική συγκέντρωση του ATP είναι 6.9 mM, με αποτέλεσμα την κατανάλωση του στο εσωτερικό του μυοϊνιδίου. Ακόμη φαίνεται και η χρονική εξέλιξη της κατανομής των συγκεντρώσεων κατά μήκος της ακτίνας, καθώς και η μόνιμη κατάστασή τους. Στην

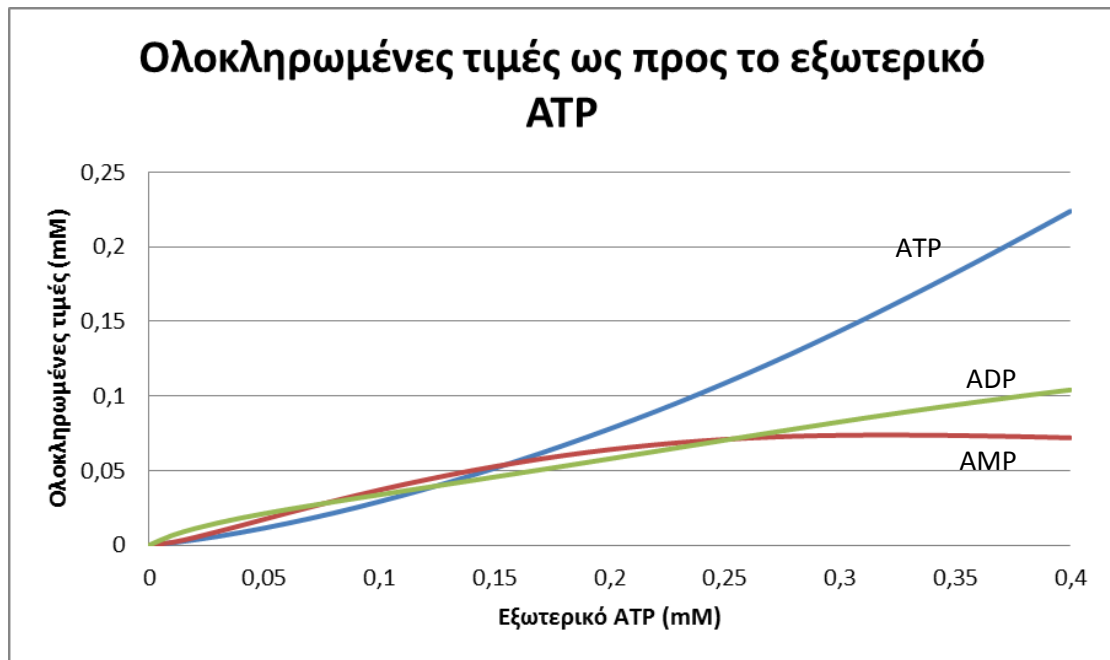


Εικόνα 14 παρουσιάζονται οι κατανομές της κρεατίνης, φωσφοκρεατίνης και της Κινάσης της Κρεατίνης.

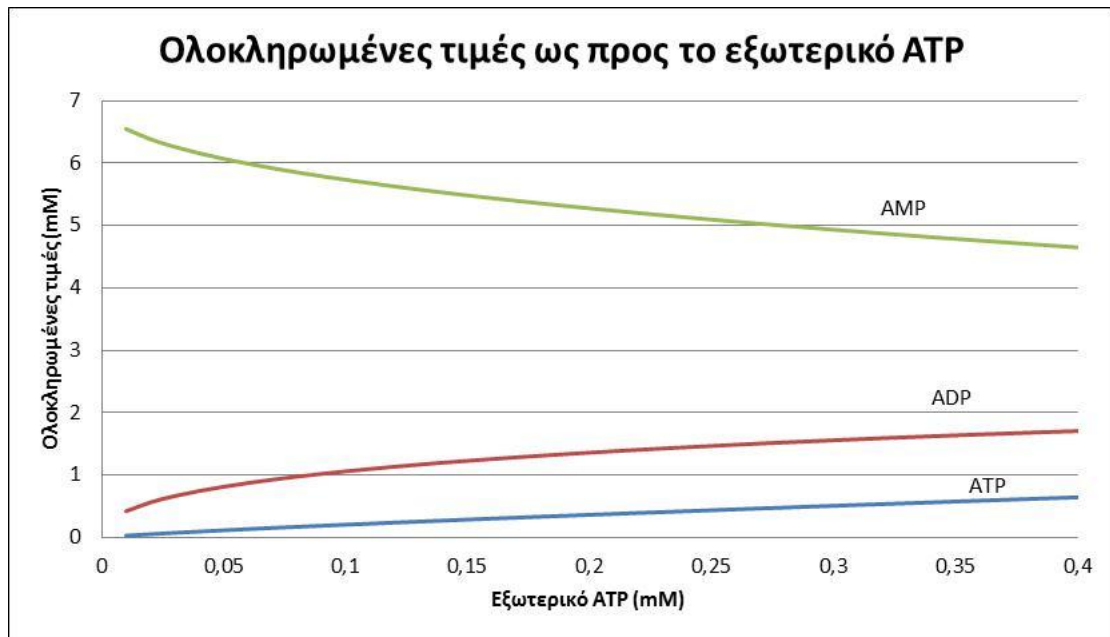


Εικόνα 14: Κατανομές συγκεντρώσεων για τα CrP, Cr και JCK.

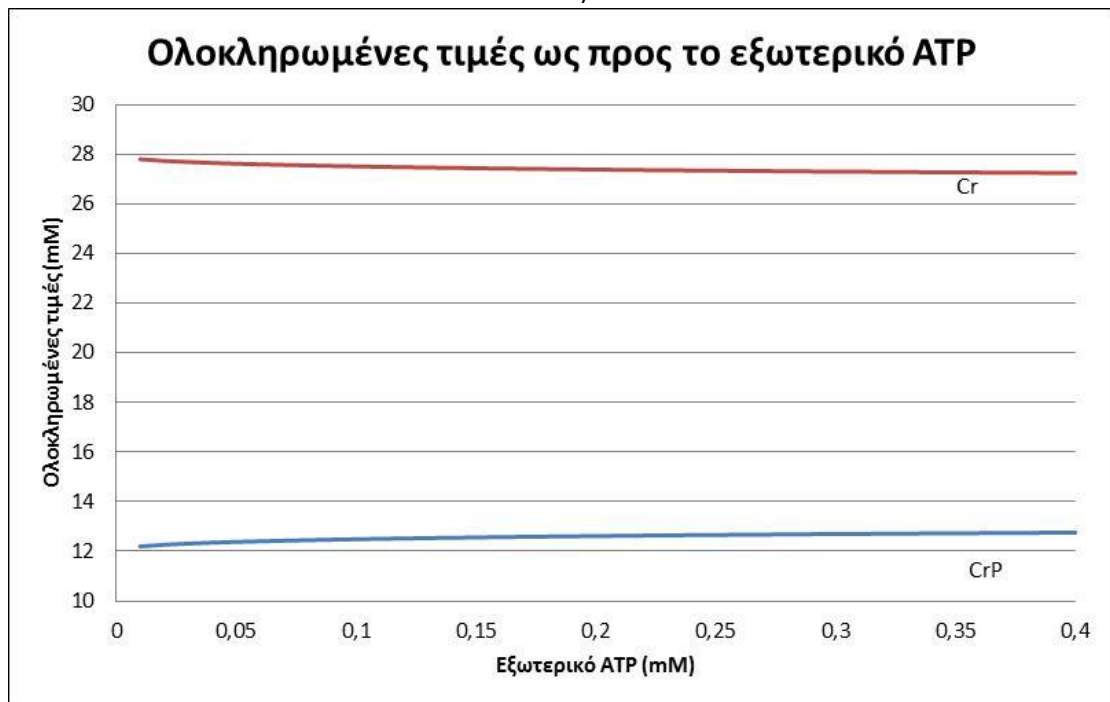
Στη συνέχεια, παρουσιάζονται διαγράμματα με ολοκληρωμένες τιμές των μεταβλητών ATP, ADP, AMP, CrP και Cr κατά μήκος της ακτίνας ως προς το εξωτερικό ATP. Στο μοντέλο χωρίς την παρουσία της PCr, η μέση συγκέντρωση του ATP είναι πάντα μικρότερη από την εξωτερική του συγκέντρωση (Εικόνα 15). Αυτό όμως δεν συμβαίνει για το μοντέλο με τη παρουσία της PCr. Η μέση συγκέντρωση του ATP είναι πάντα μεγαλύτερη από την εξωτερική του συγκέντρωση (Εικόνα 16). Για αυτό το φαινόμενο έχει δοθεί ήδη μία πιθανή απάντηση παραπάνω.



Εικόνα 15: Ολοκληρωμένες τιμές κατά μήκος της ακτίνας ως προς το εξωτερικό ATP για το μοντέλο χωρίς PCr.



a)



b)

Εικόνα 16: Ολοκληρωμένες τιμές κατά μήκος της ακτίνας ως προς το εξωτερικό ATP για το μοντέλο με PCr.

## Κεφάλαιο 4 – Νέα προσέγγιση

### 4.1 Ρεαλιστική γεωμετρία

Οι Selivanov et al [33], αναφέρουν ότι γενικά οι πειραματικές μετρήσεις [18] δείχνουν ότι η διάχυση είναι γρήγορη, ενώ έμμεσα δεδομένα από τη φυσιολογία των κυττάρων δείχνουν ότι η διάχυση είναι αργή [33]. Υποστηρίζουν ότι πιθανότατα η ύπαρξη φυσικών εμποδίων που αποτελούνται από μακρομόρια που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, μπορούν να εμποδίζουν τη διάχυση. Έτσι, οι μεταβολίτες διαχέονται πιο γρήγορα σε απουσία τέτοιων εμποδίων, και πιο αργά με την παρουσία τους. Για αυτό το λόγο, η χρήση ενός άμεσα ορισμένου συντελεστή διάχυσης, χωρίς να ληφθούν υπόψη αυτά τα εμπόδια μπορεί να οδηγήσει σε πολύ λανθασμένα δεδομένα.

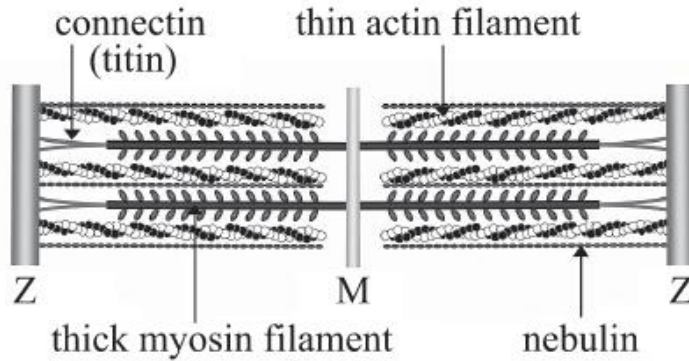
Σε αυτό το μοντέλο εισάγουμε αδρανείς ίνες στο εσωτερικό του σαρκομερίου σε 2 διαστάσεις, με σκοπό να κατασκευάσουμε μια ρεαλιστική γεωμετρία του εσωτερικού των μυϊκών ινιδίων, ώστε να προσομοιώσουμε όσο το δυνατόν καλύτερα το φυσικό πρόβλημα της Διάχυσης – Αντίδρασης στο εσωτερικό των ενεργών μυών.

Τα ινίδια που βρίσκονται μέσα στο σαρκομέριο, είναι διατεταγμένα με τρόπο που τα παχιά ινίδια μουσίνης να περιβάλλονται και να αλληλοσυνδέονται από λεπτά ινίδια ακτίνης. Το πάχος και σχήμα των σαρκομερίων και των ινιδίων θεωρούνται ότι παραμένουν σταθερά κατά τη διάρκεια της σύσπασης και της χαλάρωσης των μυών.

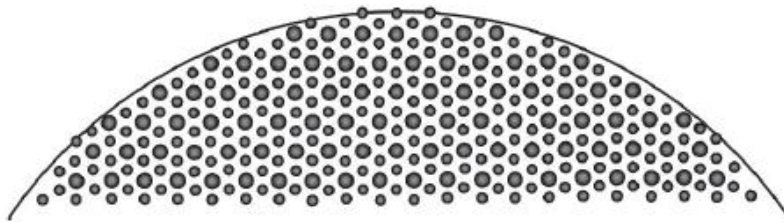
Η περιοχή του σαρκομερίου που επιλέχθηκε για τη μοντελοποίηση είναι ανάμεσα από τη Z- και M- γραμμή, εκεί δηλαδή που τα ινίδια της ακτίνης και της μουσίνης αλληλεπικαλύπτονται. Η γεωμετρία στη COMSOL κατασκευάστηκε ως εγκάρσια τομή αυτής της περιοχής. Στην εικόνα 16.A παρουσιάζεται ένα σαρκομέριο, στο οποίο φαίνονται τα λεπτά ινίδια (ακτίνη), τα παχιά ινίδια

(μυοσίνη) και οι κεφαλές. Ακόμη διακρίνονται και οι ζώνες του σαρκομέριου. Στο 16.B παρουσιάζεται μία τομή της περιοχής με αλληλοεπικάλυψη των ινιδίων.

(A)



(B)

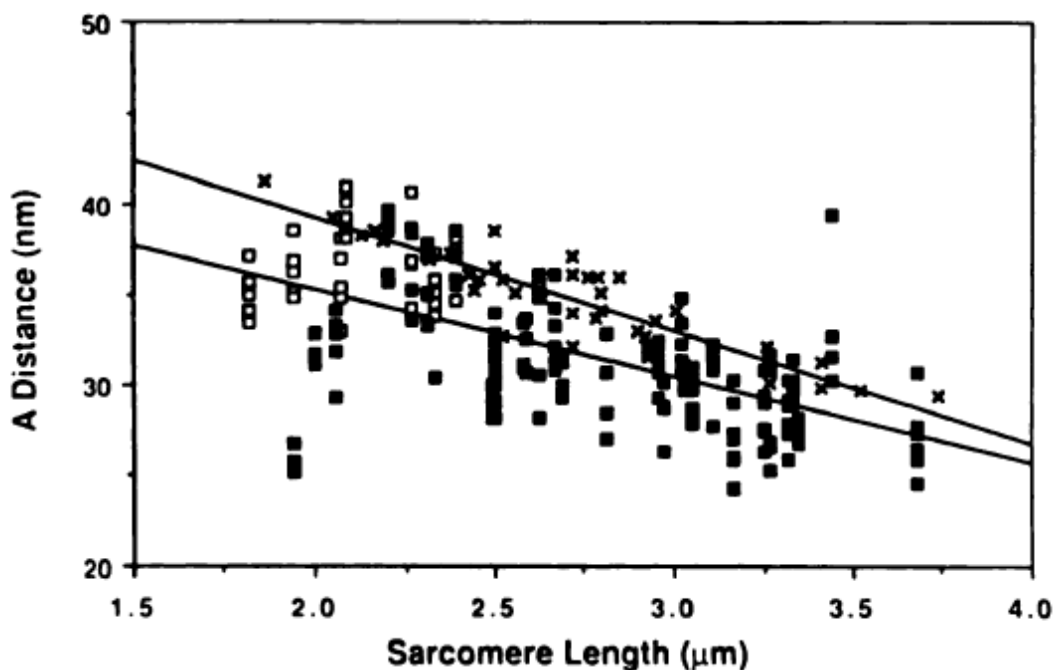


Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση δομής σαρκομέριου σκελετικού μυός. (A) Κατά μήκος τομή. Z και M αντιπροσωπεύουν τις Z- και τις M- γραμμές, αντίστοιχα. (B) Εγκάρσια τομή στην περιοχή αλληλοεπικάλυψης των ινιδίων. Τα μεγάλα και τα μικρά κυκλάκια αντιστοιχούν στα ινίδια μυοσίνης και στα ινίδια ακτίνης, αντίστοιχα [Kayaogori].

Όπως φαίνεται στην 16.B, τα ινίδια ακολουθούν κανονική εξαγωνική δομή. Κάθε ινίδιο μυοσίνης περιβάλλεται από έξι ινίδια μυοσίνης καθώς και έξι ινίδια ακτίνης σε εξαγωνική δομή. Αυτή η δομή επαναλαμβάνεται και στη κατανομή των κεφαλών S1 των μυοσινών που προεξέχουν από το ινίδιο και βρίσκονται ανά διαστήματα 14.5 nm, με κλίση 60 μοίρες. Το ινίδιο μυοσίνης αποτελείται από

περίπου 300 ενεργά κέντρα που το καθένα αποτελείται από δύο S1 κεφαλές και μία S2 ουρά. Καθώς οι μύες συσπώνται, το σαρκομέριο διατηρεί σταθερό τον συνολικό του όγκο. Η σχέση μεταξύ της απόστασης πλέγματος και το μήκος του κυττάρου έχει ερευνηθεί για ακέραιες αλλά και για απογυμνωμένες ίνες, χρησιμοποιώντας μικρογραφία ηλεκτρονίων και με περίθλαση ακτίνων Χ. Με βάση τα δεδομένα από την περίθλαση των ακτίνων Χ, υπολογίστηκαν οι αποστάσεις μεταξύ των ινιδίων ακτίνης – ακτίνης και ακτίνης – μυοσίνης σε ένα εύρος από μήκη σαρκομερίων.

Η Goldstein et al. (1987) παραθέτουν τα παρακάτω διαγράμματα στα οποία διακρίνεται μία γραμμική σχέση ανάμεσα στο μήκος των σαρκομερίων και στις αποστάσεις μεταξύ των ινιδίων.



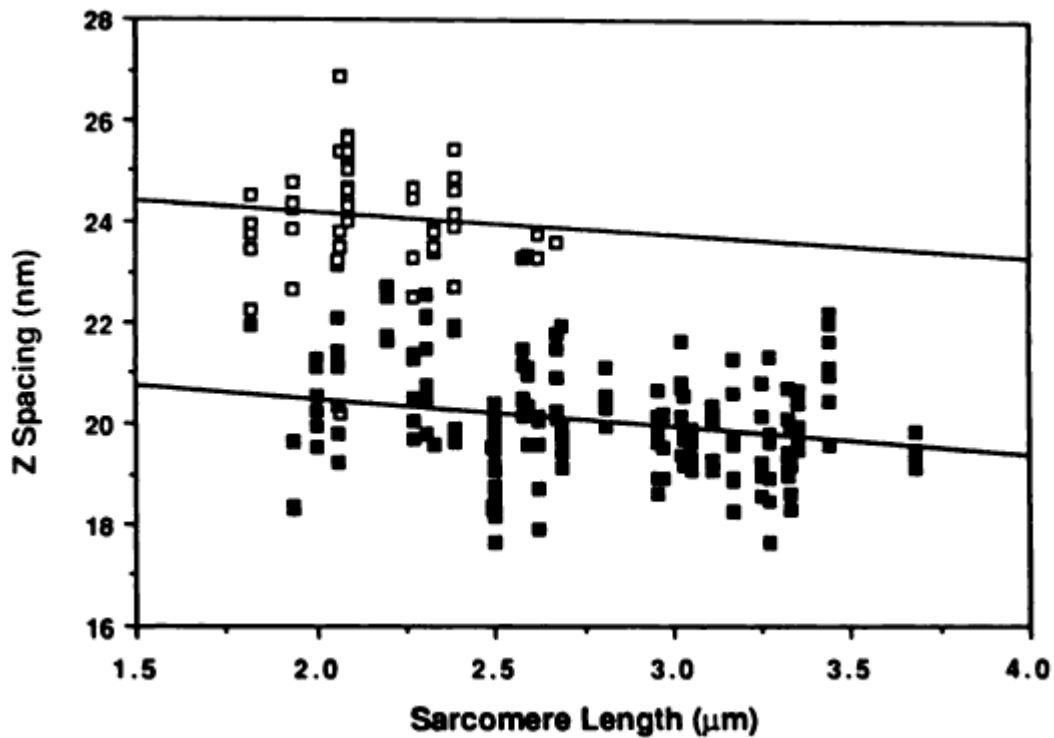
Εικόνα 18: Γράφημα της απόστασης ανάμεσα σε δύο ινίδια μυοσίνης ( $d_{10}$ ) σε συνάρτηση με το μήκος του σαρκομερίου [4].

Η πάνω γραμμή είναι η γραμμή ελαχίστων τετραγώνων για τα πειραματικά δεδομένα από τους Elliott et al. [8]. Η εξίσωση της γραμμής είναι:

$$d_{10} = -6.24 \left[ \frac{nm}{\mu m} \right] x [\mu m] + 51.7 [nm] \quad (4.1)$$

Η κάτω γραμμή είναι η γραμμή ελαχίστων τετραγώνων για τα πειραματικά δεδομένα από τους Goldstein et al. [4]. Η εξίσωση της γραμμής είναι:

$$d_{10} = -4.83 \left[ \frac{nm}{\mu m} \right] x [\mu m] + 45.0 [nm] \quad (4.2)$$

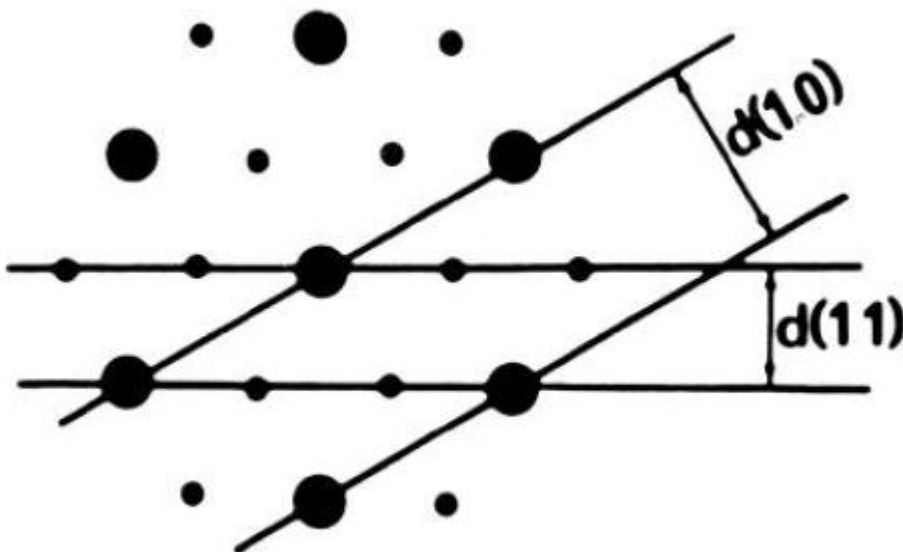


Εικόνα 19: Γράφημα της απόστασης ανάμεσα σε δύο ινίδια μυοσίνης ( $d_{11}$ ) σε συνάρτηση με το μήκος του σαρκομερίου [4].

Η πάνω γραμμή είναι η γραμμή ελαχίστων τετραγώνων για τα πειραματικά δεδομένα από τους Elliott et al. [8]. Η εξίσωση της γραμμής είναι:

$$d_{11} = -2.23 \left[ \frac{nm}{\mu m} \right] \times x [\mu m] + 26.86 [nm] \quad (4.3)$$

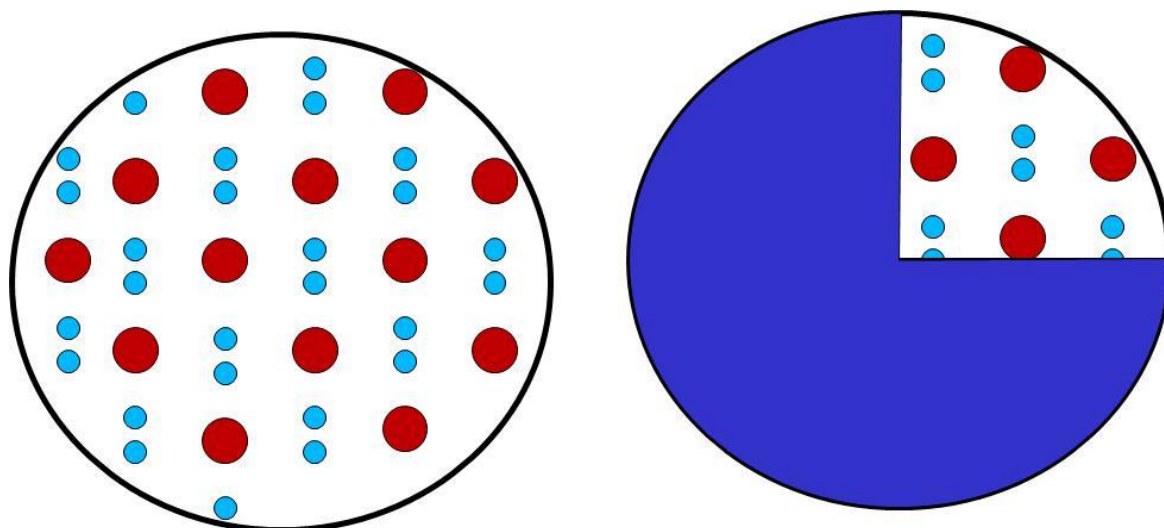
Τα μεγέθη  $d_{10}$  και  $d_{11}$  αντιστοιχούν στις αποστάσεις μεταξύ των ινιδίων μυοσίνης – μυοσίνης και μυοσίνης – ακτίνης αντίστοιχα. Τα μεγέθη αυτά παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 20: Σχηματικά οι αποστάσεις ανάμεσα στα ινίδια μυοσίνης και ακτίνης



Λόγο αζιμουθιακής συμμετρίας του σαρκομερίου, η μοντελοποίηση έγινε στο ένα τεταρτημόριο της εγκάρσιας τομής του (Εικόνα 20.B ). Αυτό μείωσε τον απαιτούμενο χρόνο για την επίλυση του προβλήματος.



**Εικόνα 21: (A) Τα εσωτερικά ινίδια σε κανονική κατανομή (B) Το τμήμα που επιλέχθηκε για μοντελοποίηση.**

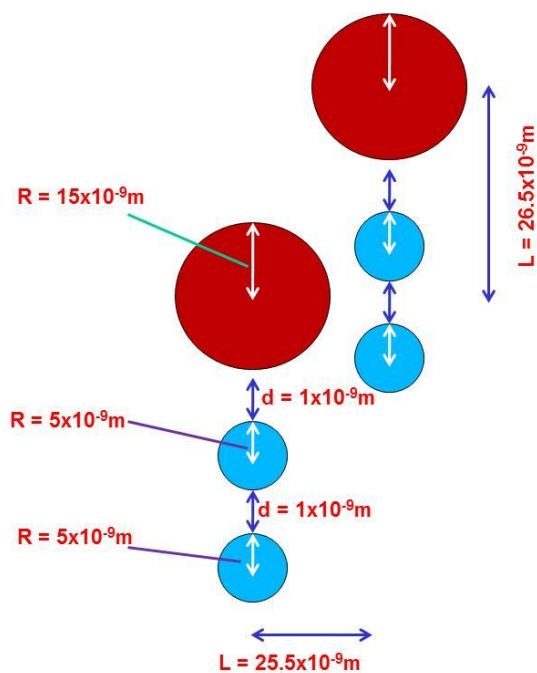
Πραγματοποιήθηκε επίσης, ανάλυση ευαισθησίας ως προς τη πυκνότητα του πλέγματος ινιδίων. Κατασκευάστηκαν δύο πλέγματα με διαφορετικές πυκνότητες, ώστε να διευκρινιστεί η επίδραση τους στο συντελεστή διάχυσης καθώς και στις κατανομές των στοιχείων. Η βασική ιδέα είναι ότι όσο πιο πυκνό είναι το πλέγμα τόσο πιο υψηλός θα είναι ο συντελεστής διάχυσης των μεταβολιτών.

Οι ακτίνες των ινιδίων μουσίνης, σύμφωνα με πολλές δημοσιεύσεις, είναι περίπου 13 με 16 nm και των ινιδίων ακτίνης είναι περίπου 4 με 6 nm. Σε αυτήν την εργασία, θεωρούμε ότι τα ινίδια είναι κυλινδρικού σχήματος χωρίς προεξοχές. Η ακτίνα για τα ινίδια μουσίνης θεωρήθηκε ότι είναι σταθερή και ίση με 15 nm. Η ακτίνα για τα ινίδια ακτίνης θεωρήθηκε ότι είναι σταθερή και ίση με 5 nm. Οι αποστάσεις μεταξύ τους δίνονται από τις εξισώσεις (4.1) και (4.3).

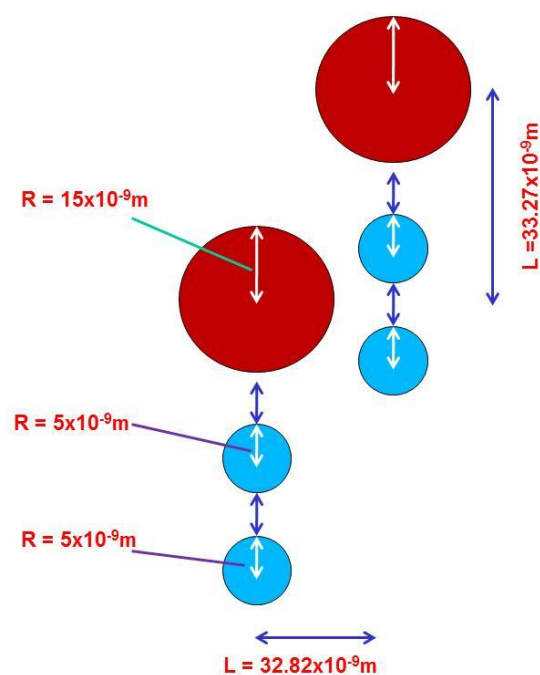
Οι ακτίνες των ινιδίων παραμένουν σταθερές και στις δύο γεωμετρίες. Στην γεωμετρία με τα πυκνά ινίδια, η απόσταση ανάμεσα σε δύο ινίδια μωσίνης στον άξονα x ορίστηκε ως 25.5 nm και η απόσταση ανάμεσα σε δύο ινίδια μωσίνης στον άξονα y ορίστηκε ως 26.5 nm. Η απόσταση των ινιδίων μωσίνης και ακτίνης κατά μήκος του y είναι 1 nm. Στην γεωμετρία με τα αραιά ινίδια, η απόσταση ανάμεσα σε δύο ινίδια μωσίνης στον άξονα x ορίστηκε ως 32,82 nm και η απόσταση ανάμεσα σε δύο ινίδια μωσίνης στον άξονα y ορίστηκε ως 33,27 nm.

### Arrangement of filaments

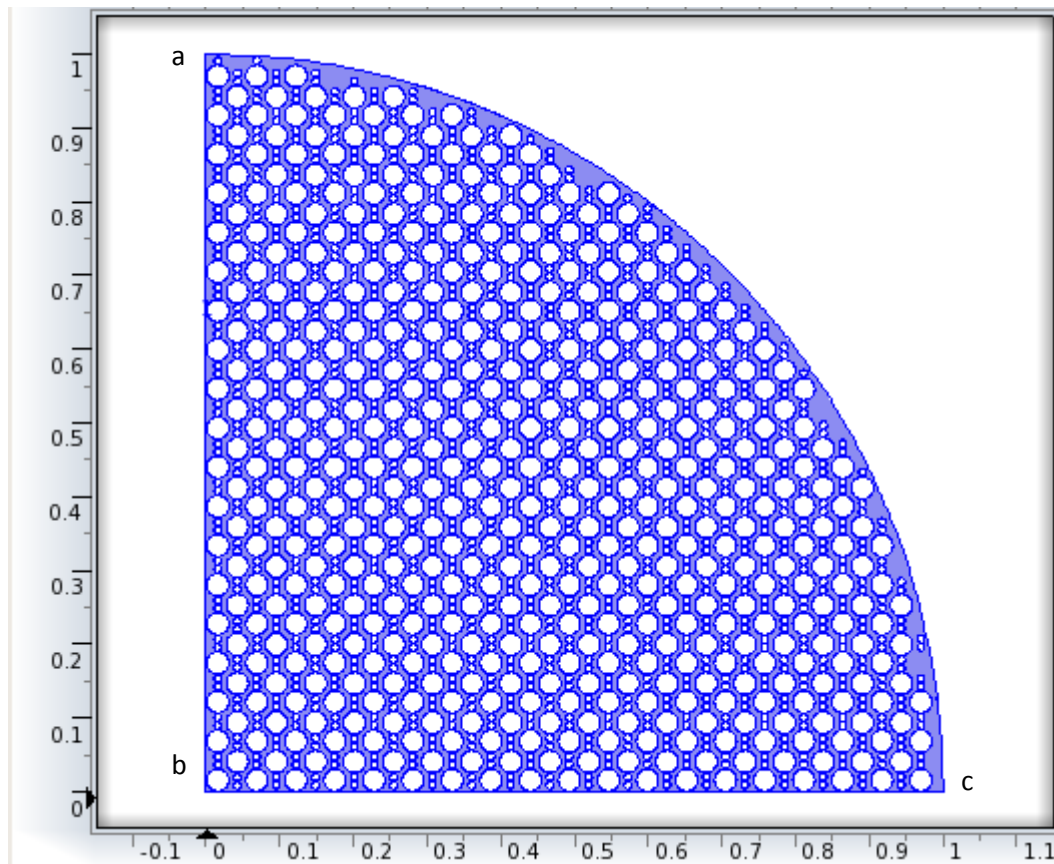
#### High density of filaments



#### Low density of filaments



Εικόνα 22: Οι διαστάσεις της γεωμετρίας με υψηλή και με χαμηλή πυκνότητα ινιδίων.



Εικόνα 23: Η πυκνή γεωμετρία όπως φαίνεται κατασκευασμένη στο COMSOL.

### Παραδοχές

Με βάση τη βιβλιογραφία στα μοντέλα που περιγράφονται παρακάτω γίνονται κάποιες παραδοχές.

1. Μέσο συντελεστή διάχυσης.
2. Τα νουκλεοτίδια και οι κρεατίνες έχουν τον ίδιο συντελεστή διάχυσης.
3. Η διάχυση στο εσωτερικό των σαρκομερίων είναι ιστροπική, ενώ στην πραγματικότητα είναι ανιστροπική.
4. Στο μοντέλο χωρίς τη PCr, η συνολική ποσότητα των νουκλεοτιδίων είναι ίση με το εξωτερικό ATP.
5. Τα ινίδια μυοσίνης και ακτίνης θεωρούνται κύλινδροι με σταθερή ακτίνα.
6. Τα ινίδια δεν μπορούν να αλληλεπικαλύπτονται με το εξωτερικό όριο του σαρκομερίου.

## 4.2 2-D Γεωμετρία

Η γεωμετρία που επιλέχθηκε για την επίλυση του μοντέλου είναι σε δύο διαστάσεις. Σε αυτή την καινούρια προσέγγιση, τα μοντέλα παραμένουν τα ίδια. Αλλάζει η έκφραση των διαφορικών εξισώσεων, που γίνεται πλέον σε καρτεσιανή γεωμετρία.

Για την επίλυση του συστήματος Διάχυσης-Αντίδρασης σε γεωμετρία 2-D, θέτουμε τις παραμέτρους  $e_\alpha$  (Συντελεστής Μάζας),  $a$  (Συντελεστής Απορρόφησης),  $\beta$  (Συντελεστής Συναγωγής),  $\alpha$  (συντηρητικός συντελεστής συναγωγής) and  $\gamma$  (συντηρητικός συντελεστής πηγής) μηδέν. Ο  $d_\alpha$  (συντελεστής μάζας) θεωρείται μηδέν ή ένα ανάλογα με το μοντέλο (Μόνιμες Συνθήκες Κι Δυναμικό αντίστοιχα). Ο  $c$  (Συντελεστής Διάχυσης) αντικαθίσταται με τον όρο  $D$  (μία παράμετρος που εμείς ελέγχουμε). Στο  $f$  (Συντελεστής Πηγής) τοποθετείται ο όρος  $-J_{ATP} - J_{AK}$  για το μοντέλο που απουσιάζει η φωσφοκρεατίνη και  $-J_{ATP} - J_{AK} - J_{CK}$  για το μοντέλο με την φωσφοκρεατίνη παρούσα. Για αυτό το μοντέλο (2-D) ο τελεστής είναι

$$\nabla = \left[ \frac{\partial}{\partial x} + \frac{\partial}{\partial y} \right].$$

Οι μεταβλητές  $x$  και  $y$  δηλώνουν τις καρτεσιανές συντεταγμένες και παίρνουν τιμές μέσα στο διάστημα  $[0, 1e-6]$ .

### 4.2.1 Μοντέλο με απουσία φωσφοκρεατίνης

Οι Μερικές Διαφορικές Εξισώσεις που περιγράφουν την κατανομή των συγκεντρώσεων των ATP, ADP και AMP στην επιφάνεια της τομής ενός κυλινδρικού μυϊκού ινιδίου για κάθε χρονική στιγμή, είναι οι ακόλουθες:

Για την κατανομή του ATP:

$$\frac{\partial ATP[x, y, t]}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 ATP[x, y, t]}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 ATP[x, y, t]}{\partial y^2} \right) - J_{ATP} - J_{AK} \quad (4.4)$$

Για την κατανομή του AMP:

$$\frac{\partial AMP[x, y, t]}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 AMP[x, y, t]}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 AMP[x, y, t]}{\partial y^2} \right) - J_{AK} \quad (4.5)$$

Για το ADP ισχύει το ισοζύγιο μάζας:

$$ADP[x, y, t] = ANT - ATP[x, y, t] - AMP[x, y, t] \quad (4.6)$$

Όπου ANT είναι η συνολική συγκέντρωση των νουκλεοτιδίων, που θεωρείται ίση με το εξωτερικό ATP.

### Συνοριακές Συνθήκες

Η συνοριακή συνθήκη για την εξίσωση (4.4), στη καμπύλη ac (βλ. Εικόνα 23) ορίστηκε ως συνθήκη Dirichlet. Η συνθήκη παρουσιάζεται παρακάτω:

$$ATP[x^2 + y^2 = 1e-12, t] = ANT \quad (4.7)$$

Όπου ANT είναι η συνολική εξωτερική συγκέντρωση των νουκλεοτιδίων αδερίνης.

Για την εξίσωση (4.5) ισχύει η Συνθήκη Dirichlet στο σύνορο ac (βλ. Εικόνα 23):

$$AMP[x^2 + y^2 = 1e-12, t] = 0 \quad (4.8)$$

Στα δύο εσωτερικά όρια που βρίσκονται στις ευθείες  $x=0$  και  $y=0$  τοποθετήθηκαν συνθήκες μη ροής (Zero Flux) λόγω συμμετρίας.

## 4.2.2 Μοντέλο με παρουσία φωσφοκρεατίνης

Το μοντέλο Διάχυσης – Αντίδρασης με την παρουσία της φωσφοκρεατίνης είναι αντίστοιχο με αυτό του κεφαλαίου (3.3.2) σε καρτεσιανές συντεταγμένες.

Για την κατανομή του ATP:

$$\frac{\partial ATP[x, y, t]}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 ATP[x, y, t]}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 ATP[x, y, t]}{\partial y^2} \right) - J_{ATP} - J_{AK} - J_{CK} \quad (4.9)$$

Για την κατανομή του AMP:

$$\frac{\partial AMP[x, y, t]}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 AMP[x, y, t]}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 AMP[x, y, t]}{\partial y^2} \right) - J_{AK} \quad (4.10)$$

Για την κατανομή του CrP:

$$\frac{\partial CrP[x, y, t]}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 CrP[x, y, t]}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 CrP[x, y, t]}{\partial y^2} \right) - J_{CK} \quad (4.11)$$

Για το ADP ισχύει το ισοζύγιο μάζας:

$$ADP[x, y, t] = ANT - ATP[x, y, t] - AMP[x, y, t] \quad (4.12)$$

Η κατανομή του CrP δίνεται από το παρακάτω ισοζύγιο μάζας:

$$Cr[x, y, t] = CrT - CrP[x, y, t] \quad (4.13)$$

## Συνοριακές Συνθήκες

Οι ενεργότητες των Αδενυλική Κινάση (AK) και Κινάση Κρεατίνης (CK) που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, θεωρούμε ότι βρίσκονται σε κατάσταση ισορροπίας. Η συνολική συγκέντρωση των νουκλεοτιδίων (ANP), θεωρείται ίση με 7 mM ( $[ANP]= 7 \text{ mM}$ ) και η συνολική συγκέντρωση της κρεατίνης (CrT) θεωρείται ίση με 40 mM ( $[CrT] = 40 \text{ mM}$ ).

Οι συνοριακές συνθήκες της εξίσωση (3.7) είναι τύπου Dirichlet:

$$ATP[x^2 + y^2 = 1e - 12, t] = c_0 \quad (4.14)$$

Στα εσωτερικά όρια (ευθείες  $x = 0$  και  $y = 0$ ) τοποθετήθηκε συνθήκη μη ροής (Zero Flux) λόγω συμμετρίας.

Συνοριακή συνθήκη Dirichlet χρησιμοποιήθηκε επίσης στο σύνορο ac (βλ. Εικόνα 23) της εξίσωσης (3.8):

$$AMP[x^2 + y^2 = 1e - 12, t] = [ANP] - c_0 - d_0 \quad (4.15)$$

Όπου  $d_0$  είναι η συγκέντρωση του ADP στο κυτταρόπλασμα και υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση, που προέκυψε από τη σταθερά ισορροπίας της αντίδρασης (2.2) (33).

$$d_0 = \frac{-c_0 + \sqrt{c_0^2 + 4[ANP]c_0K_{AK} - 4c_0^2K_{AK}}}{2K_{AK}} \quad (4.16)$$

Όπου  $c_0$  η συγκέντρωση του ATP στο κυτταρόπλασμα και το  $K_{AK}$  η σταθερά ισορροπίας της αντίδρασης (2.2). Η  $K_{AK}$  στο κυτταρόπλασμα έχει τιμή περίπου ίση με 1.

Στα εσωτερικά όρια (ευθείες  $x = 0$  και  $y = 0$ ) τοποθετήθηκε Συνθήκη Μη Ροής (Zero Flux) λόγω συμμετρίας.



Για την εξίσωση (3.9) στο σύνορο ac (βλ. Εικόνα 23) ορίστηκε συνοριακή συνθήκη Dirichlet:

$$\text{CrP}[x^2 + y^2 = 1e-12, t] = \frac{[CrT]c_0}{d_0K_{CK} + c_0} \quad (4.17)$$

Η παραπάνω εξίσωση προκύπτει από την εξίσωση ισορροπίας της CK. Η τιμή της  $K_{CK}$  στο κυτταρόπλασμα είναι 160 (27).

Στα εσωτερικά όρια ab και bc (βλ. Εικόνα 23) δηλαδή στις ευθείες  $x=0$  και  $y=0$  τοποθετήθηκε Συνθήκη Μη Ροής (Zero Flux) λόγω συμμετρίας.

Οι αρχικές τιμές όλων των μεταβλητών ορίστηκαν ίσες με τις τιμές τους στις Συνοριακές Συνθήκες.

### **Μέση ενεργότητα της ATPασης**

Η Μέση Ενεργότητα της ATPασης υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

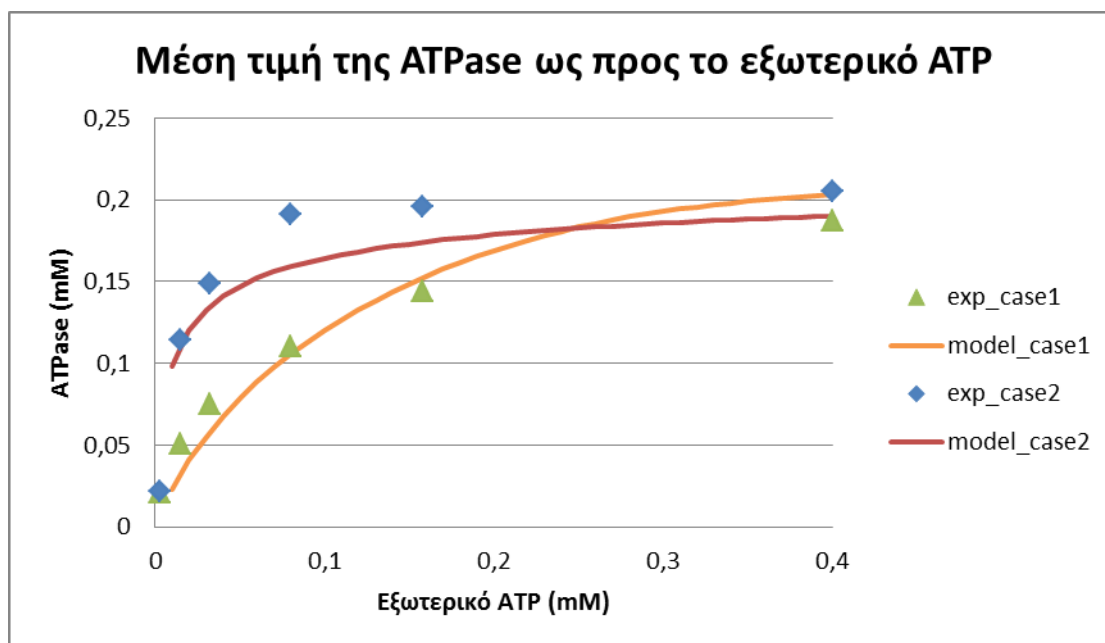
$$V_{ATP} = \frac{\int J_{ATP} d\Omega}{A} \quad (4.18)$$

Όπου A το εμβαδό του χωρίου επίλυσης των εξισώσεων. Για την πυκνή γεωμετρία το συνολικό εμβαδό είναι  $0.3185 \text{ m}\mu^2$ , και το εμβαδό της αραιής είναι  $0.475 \text{ m}\mu^2$ .

### 4.2.3 Αποτελέσματα μοντέλου 2-D

Τα 2-διάστατα μοντέλα απαιτούν αυξημένη υπολογιστική ισχύ. Γύρω από κάθε ινίδιο το Comsol πυκνώνει το πλέγμα αυτόματα και λόγω της υψηλής πυκνότητας ινιδίων, οι βαθμοί ελευθερίας έφτασαν περίπου στους 1.200.000. Για τον ίδιο λόγο έγινε προσπάθεια να δημιουργηθεί όσο το δυνατόν αραιότερο πλέγμα χωρίς να επηρεάζεται η ποιότητα της λύσης. Για να μειώσουμε περαιτέρω τις υπολογιστικές απαιτήσεις, τα μοντέλα επιλύθηκαν σε μόνιμη κατάσταση.

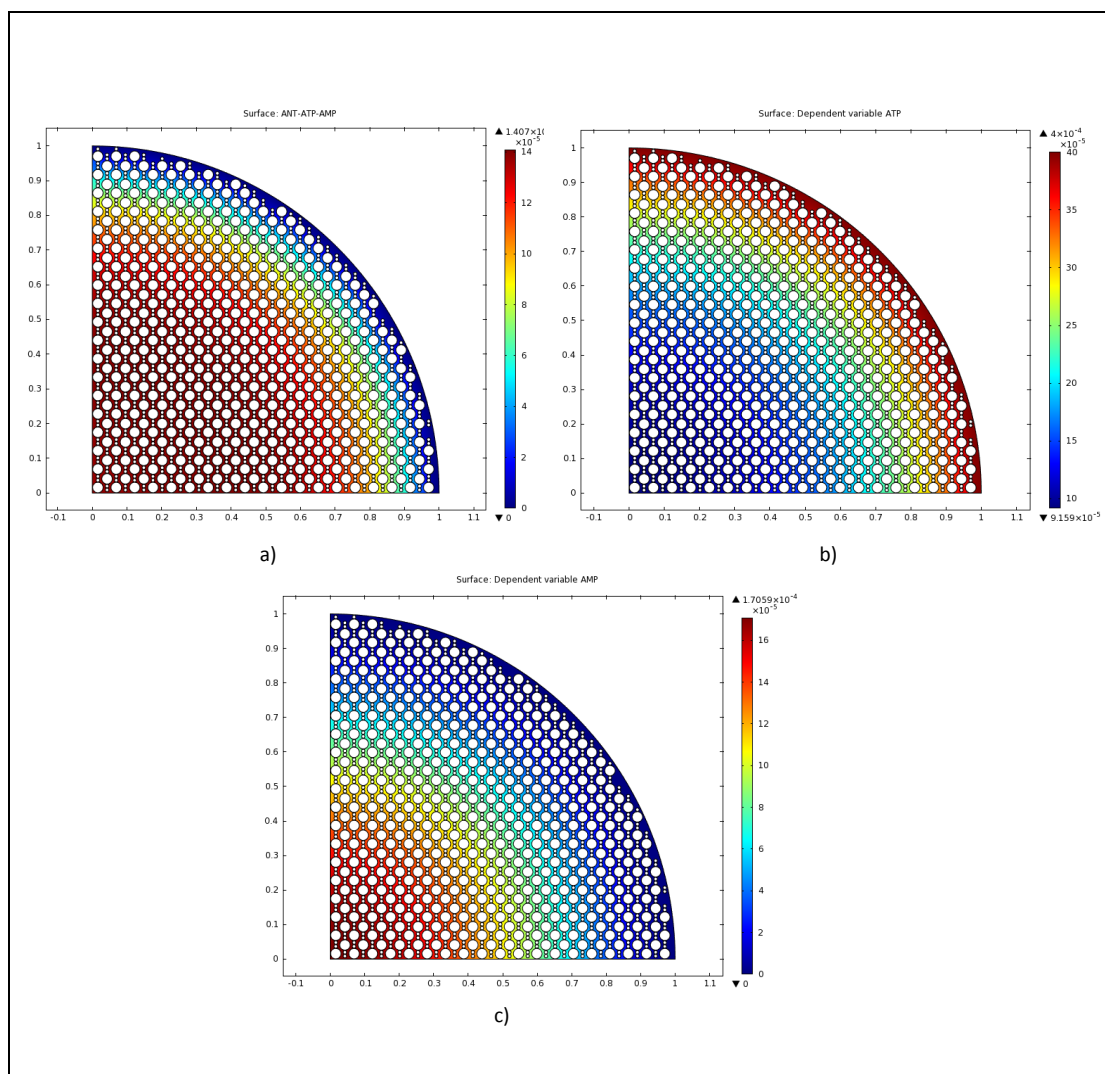
Στο μοντέλο αυτό έγινε παραμετρική ανάλυση του εξωτερικού ATP ( $c_0$ ) οπύ με δοκιμή και σφάλμα βρέθηκε ο συντελεστής διάχυσης που προσαρμόζει τα υπολογιστικά αποτελέσματα στα πειραματικά δεδομένα (Εικόνα 24). (3.16). Για να γίνουν αυτοί οι υπολογισμοί, έγινε παραμετρική ανάλυση ως προς το εξωτερικό ATP. Οι τιμές που χρησιμοποιήθηκαν είναι από 0.01mM έως 0.4mM με βήμα 0.01mM. Ο συντελεστής που προέκυψε είναι για τα δύο μοντέλα ο ίδιος, (case1 και case2)  $D=0.18 \mu\text{m}^2/\text{s}$ .



Εικόνα 24: Σύγκριση πειραματικών δεδομένων με τα υπολογιστικά αποτελέσματα. Το case1 αντιστοιχεί στο μοντέλο με απουσία της PCr, ενώ το case2 στο μοντέλο με

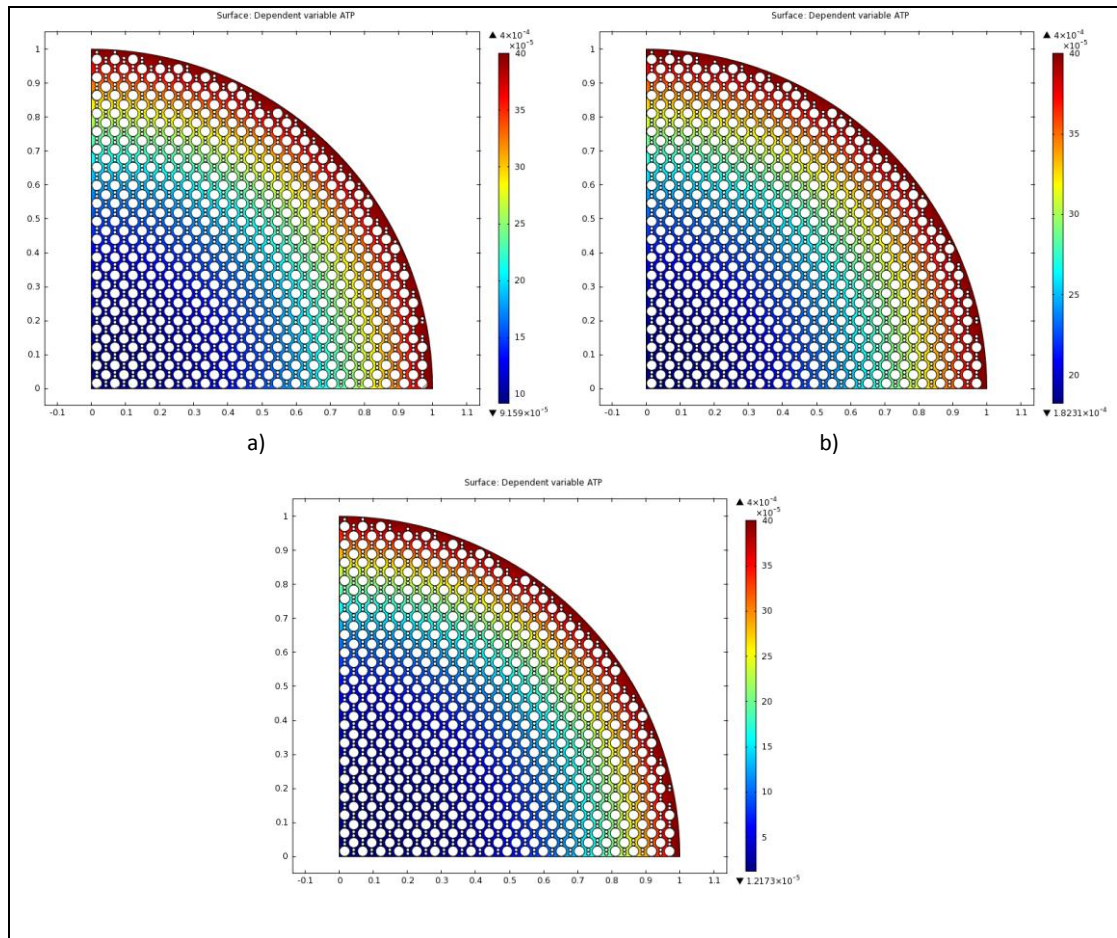
παρουσία PCr. Το exp είναι για τα πειραματικά δεδομένα και το model για τα υπολογιστικά.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι κατανομές των νουκλεοτιδίων στο ένα τεταρτημόριο του σαρκομερίου. Αυτό το μοντέλο δεν περιέχει PCr.



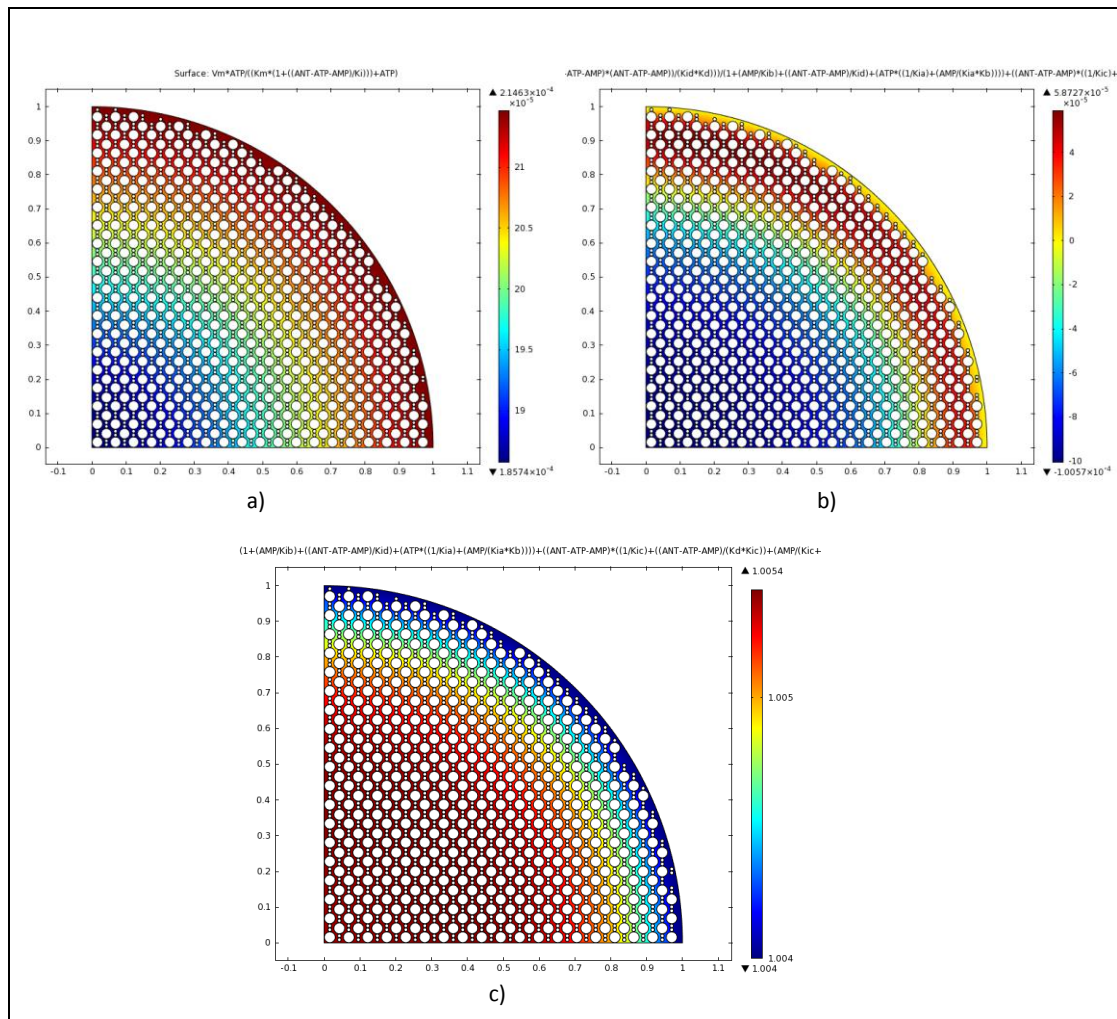
Εικόνα 25: Κατανομές των a) ADP (ANT-ATP-AMP), b) ATP και c) AMP στην πυκνή γεωμετρία. Μοντέλο χωρίς PCr.

Στην Εικόνα 25 παρατηρείται το ίδιο μοτίβο με το αντίστοιχο μοντέλο μίας διάστασης. Το ATP, με συγκέντρωση στο κυτταρόπλασμα 0.4 mM, εισέρχεται μέσα στο σαρκομέριο από την καμπύλη περιοχή (24.b έντονο κόκκινο χρώμα) και στη συνέχεια διαχέεται και καταναλώνεται.



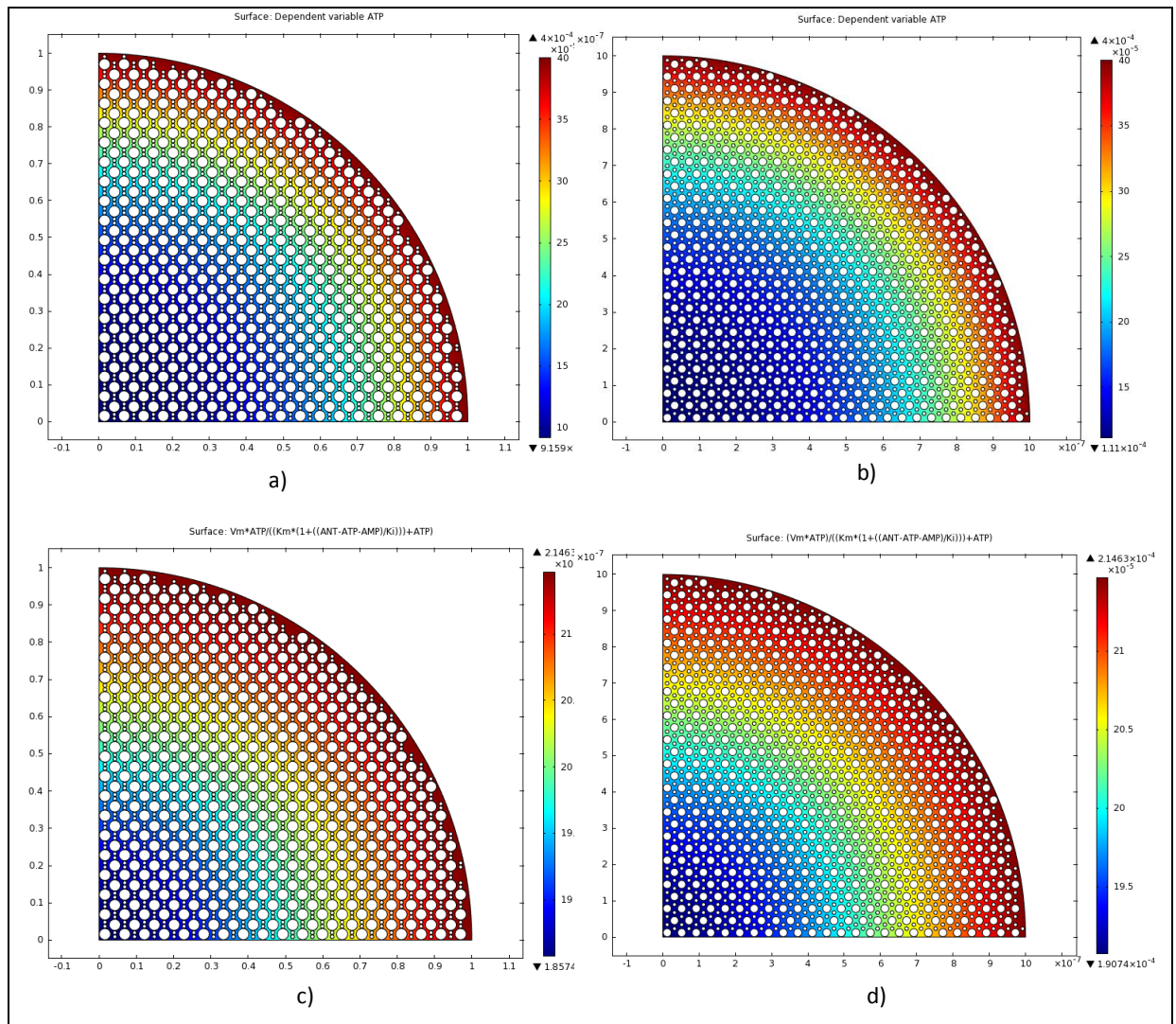
Εικόνα 26: Κατανομές ATP για διαφορετικούς συντελεστές διάχυσης. Μοντέλο χωρίς PCr.

Στην Εικόνα 26 παρουσιάζονται οι κατανομές του ATP για τρεις διαφορετικούς συντελεστές διάχυσης. Στην 26.a είναι με συντελεστή ίσο με  $0.18 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Στη 26.b είναι με συντελεστή ίσο με  $0.3 \mu\text{m}^2/\text{s}$  και τέλος στη 26.c η κατανομή υπολογίστηκε με συντελεστή  $0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Παρατηρούμε ότι όσο μειώνεται ο συντελεστής διάχυσης τόσο μειώνεται και το ATP στο εσωτερικό του σαρκομερίου.



Εικόνα 27: Κατανομή του a)  $J_{ATP}$ , b)  $J_{AK}$  και c) den για  $D=0.18\mu\text{m}^2/\text{s}$ . Μοντέλο χωρίς PCr.

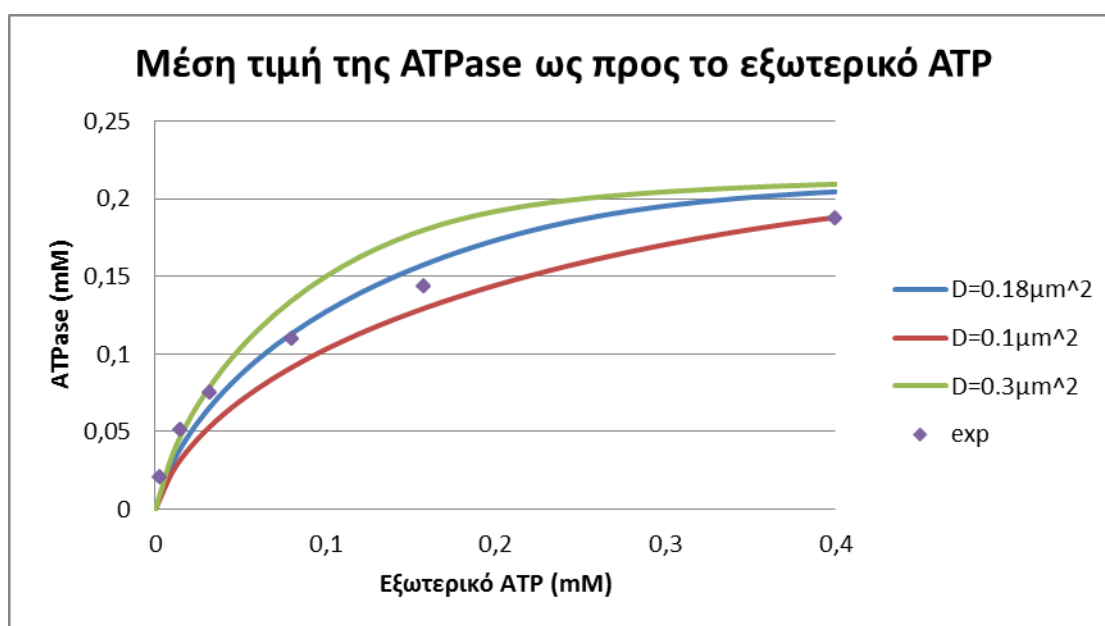




Εικόνα 28: Κατανομές συγκέντρωσης ATP και ενεργότητας  $J_{\text{ATP}}$ . Μοντέλο χωρίς PCr.

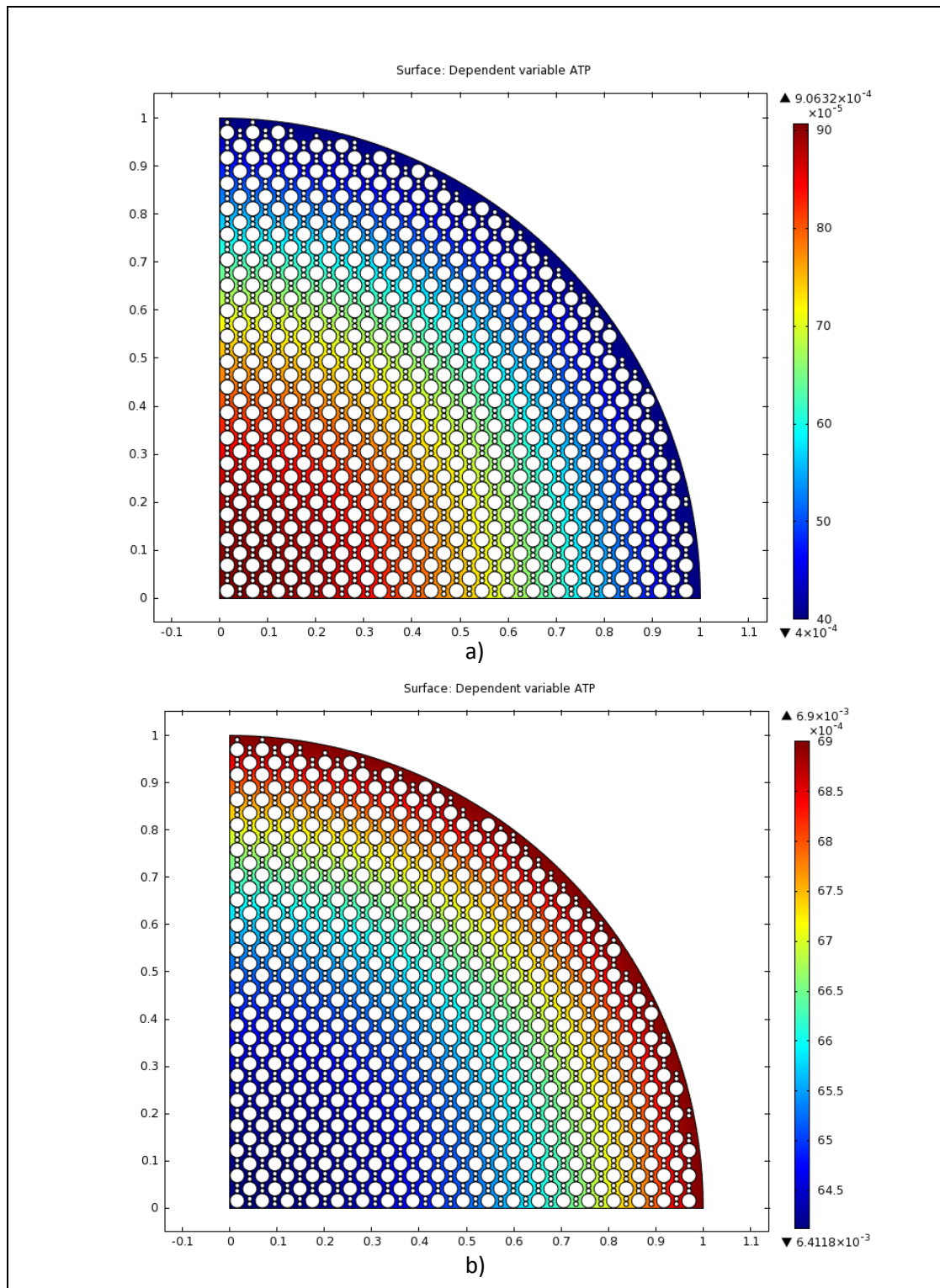
Όπως αναφέρθηκε στη θεωρία, κατασκευάστηκαν γεωμετρίες δύο διαφορετικής πυκνότητας ινιδίων. Στην Εικόνα 28 παρουσιάζονται και συγκρίνονται οι κατανομές της συγκέντρωσης του ATP και της ενεργότητας της ATPασης. Στα a) και c), που αποτελούν την πυκνή γεωμετρία, χρησιμοποιήθηκε  $D=0.18 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , ενώ στα b) και d), που αποτελούν την αραιή γεωμετρία  $D=0.16 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Όπως φαίνεται από την εικόνα 28, όσο πιο πυκνά είναι τα ινίδια τόσο μεγαλύτερος συντελεστής διάχυσης χρειάζεται ώστε και οι δύο γεωμετρίες να έχουν στο σημείο b (βλ. Εικόνα 23) την ίδια τιμή συγκέντρωσης ATP.

Ακόμη υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές της ενεργότητας της ΑΤΡασης για τρία διαφορετικά  $D$  και συγκρίθηκαν με τα πειραματικά αποτελέσματα. Από την Εικόνα 28 φαίνεται η επίδραση του συντελεστή διάχυσης στην μέση ενεργότητα της ΑΤΡασης.



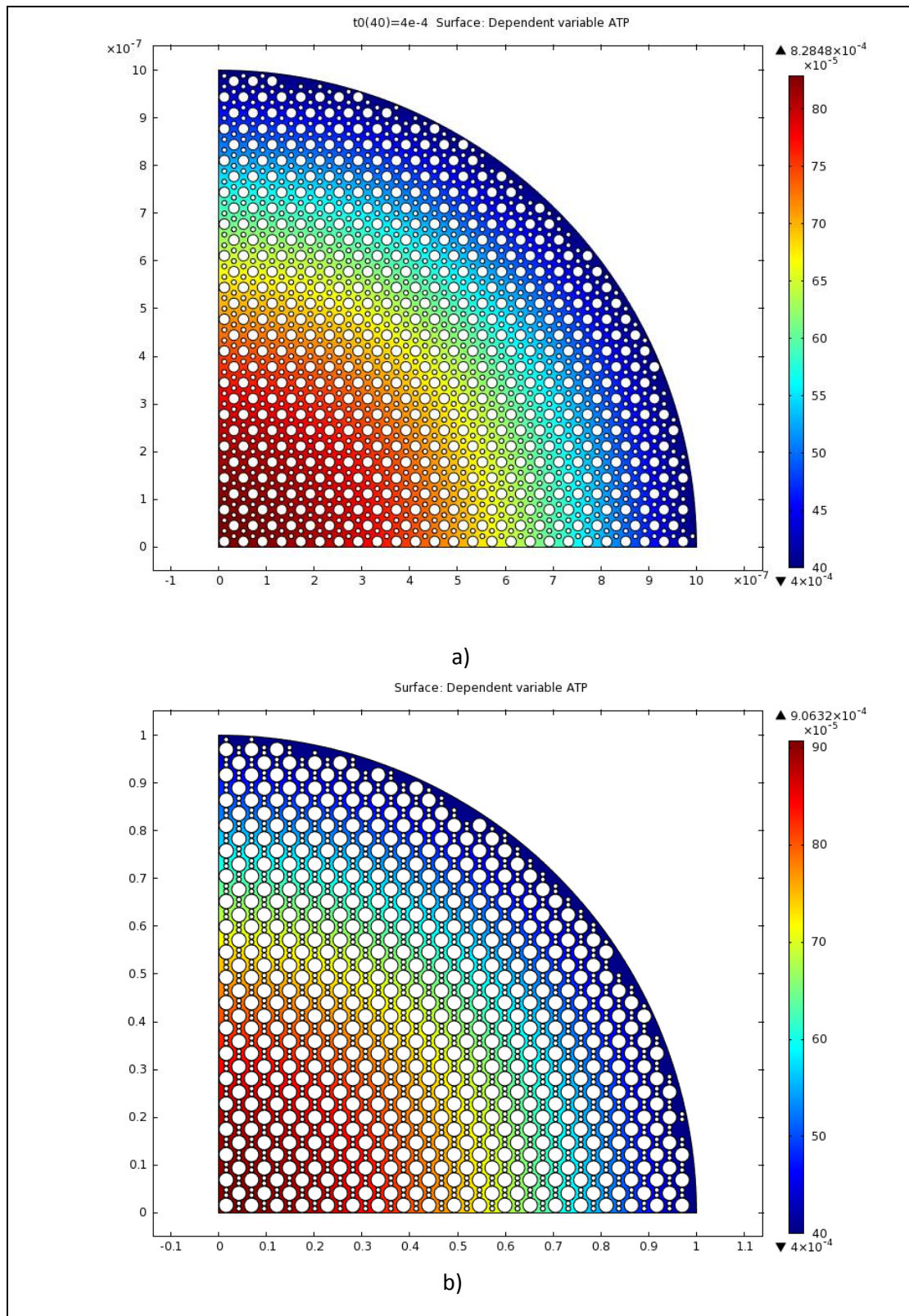
Εικόνα 29: Μέση τιμή της ΑΤΡασης ως προς το εξωτερικό ΑΤΡ για διαφορετικά  $D$ . Μοντέλο χωρίς PCr.

Όπως συνέβαινε με το μοντέλο με PCr σε μία διάσταση, έτσι και στο μοντέλο δύο διαστάσεων, όταν το ΑΤΡ εισέρχεται στο σαρκόμεριο με αρχική εξωτερική συγκέντρωση 0.4 mM ή μικρότερη, υπάρχει παραγωγή του στο εσωτερικό αντί για κατανάλωση. Αυτό δε συμβαίνει με εξωτερικό ΑΤΡ 6.9 mM. Αυτό φαίνεται στην Εικόνα 29 a) και b).

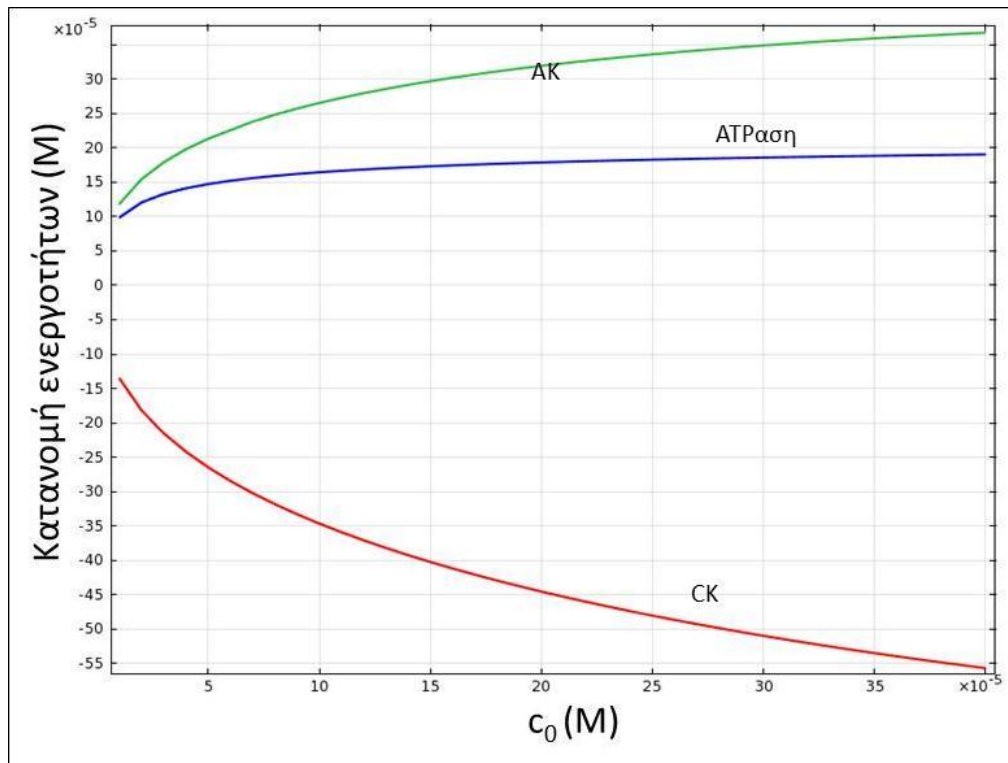


Εικόνα 30: Κατανομή συγκέντρωσης του ATP για  $D=0.18\mu\text{m}^2/\text{s}$ , a)εξωτερικό ATP 0.4 mM b) εξωτερικό ATP 6.9 mM. Μοντέλο με PCr.





Εικόνα 31: Κατανομή συγκέντρωσης του ATP a) στην αραιή γεωμετρία με  $D=0.16\mu\text{m}^2/\text{s}$ , b) στην πυκνή γεωμετρία με  $D=0.18\mu\text{m}^2/\text{s}$ . Μοντέλο με PCr.



Εικόνα 32: Οι κατανομές των μέσων ενεργοτήτων των ATPase (μπλε), AK (πράσινο) και CK (κόκκινο) ως προς το εξωτερικό ATP. Μοντέλο με PCr.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 31, όσο μειώνεται η συγκέντρωση του εξωτερικού ATP οι μέσες ενεργότητες της ATPase και της Αδενυλικής Κινάσης μειώνονται, ενώ αντίθετα η μέση ενεργότητα της Κινάσης της Κρεατίνης αυξάνεται. Δεδομένου ότι οι μέσες συγκεντρώσεις των νουκλεοτιδίων και των κρεατινών ακολουθούν την κατανομή της Εικόνας 15, η εξίσωση (2.8) μετατοπίζεται προς την παραγωγή Cr που με τη σειρά του αυξάνει την ενεργότητα της CK.

## Κεφάλαιο 5 – Συμπεράσματα και μελλοντική δουλειά

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να κατασκευαστεί ένα μοντέλο που να προσομοιώνει τους μηχανισμούς διάχυσης – αντίδρασης των νουκλεοτιδίων στους μυϊκούς ιστούς. Τα περισσότερα μοντέλα θεωρούν ομοιόμορφη κατανομή των νουκλεοτιδίων στο εσωτερικό των σαρκομερίων. Το μοντέλο σε γεωμετρία μίας διάστασης που χρησιμοποιείται σε αυτή την εργασία δίνει την δυνατότητα να μελετηθούν οι συγκεντρώσεις των νουκλεοτιδίων κατά μήκος της ακτίνας των σαρκομερίων.

Η ανάλυση του μονοδιάστατου μοντέλου παρείχε συντελεστή διάχυσης τρεις τάξεις μεγέθους μικρότερου από τον πειραματικά μετρούμενο με NMR. Με τη μοντελοποίηση δύο διαστάσεων και την εισαγωγή εσωτερικών ινιδίων σε αυτήν ως εμπόδια στη διάχυση, επιτεύχθηκε βελτιωμένη εκτίμηση του συντελεστή διάχυσης των νουκλεοτιδίων. Αυτό δείχνει ότι οι υποθέσεις που έχουν γίνει από πολλούς ότι τα εσωτερικά ινίδια προκαλούν επιβράδυνση της διάχυσης του ATP ίσως είναι προς τη σωστή κατεύθυνση.

Καθώς το σαρκομέριο αποτελείται από τρεις περιοχές, αλλά μόνο στη μία λαμβάνουν χώρα οι αντιδράσεις (Α-ζώνη), κρίνεται σκόπιμο να κατασκευαστεί τρισδιάστατο μοντέλο που να προσομοιώνει τους φυσικούς (π.χ. διάχυση) και χημικούς (αντιδράσεις) μηχανισμούς της κίνησης των μυών. Αυτό το μοντέλο μπορεί να είναι κατάλληλα διατυπωμένο, σε σχέση με χρονική και χωρική εξάρτηση των μεταβλητών, ώστε να προσομοιώνει όσο καλύτερα γίνεται τη φυσική κίνηση ενός μυός, τις εκάστοτε απαιτήσεις καθώς και τις τοπικές ελλείψεις του ATP. Παράλληλα με το τρισδιάστατο μοντέλο, επιθυμητή θα ήταν και η κατασκευή μικροσκοπικού μοντέλου τύπου Monte Carlo, για σύγκριση συντελεστών διάχυσης με το μακροσκοπικό μοντέλο.

## Βιβλιογραφία

1. Bagshaw, C.R., Eccleston, J.F., Eckstein, F., Goody, R.S., Gutfreund, H., and Trentham, D.R., 1974. The magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase of myosin. Two-step processes of adenosine triphosphate association and adenosine diphosphate dissociation. *Biochem J* 141: 351-64.
2. Bricknell, O. L., and L. H. Opie. 1981. A relationship between adenosine triphosphate, glycolysis and ischemic contracture in the isolated rat heart. *J. Mol. Cell. Card.* 13:941–945.
3. Bullard, B., Linke, W.A., and Leonard, K., 2002. Varieties of elastic protein in invertebrate muscles. *J Muscle Res Cell Motil* 23: 435-47.
4. Cabrera, M. E., L. Zhou, W. C. Stanley, and G. M. Saidel. 2005. Regulation of cardiac energetics: role of redox state and cellular compartmentation during ischemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1047:259–270.
5. Caus, T., F. Kober, P. Marin, A. Mouly-Bandini, J. Quilici, D. Metras, P. J. Cozzone, and M. Bernard. 2006. Non-invasive diagnostic of cardiac allograft vasculopathy by 31P magnetic resonance chemical shift imaging. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 29:45–49.
6. Conibear, P.B., Bagshaw, C.R., Fajer, P.G., Kovacs, M., and Malnasi-Csizmadia, A., 2003. Myosin cleft movement and its coupling to actomyosin dissociation. *Nat Struct Biol* 10: 831-5.
7. Eisenberg, E., and Moos, C., 1970. Actin activation of heavy meromyosin adenosine triphosphatase. Dependence on adenosine triphosphate and actin concentrations. *J Biol Chem* 245: 2451-6.
8. Elliott, G. F., Lowy, J., Millman, B. M. 1967 "Low angle x-ray diffraction studies of living striated muscle during contraction." *J. Mol. Biol.* 25: 31-45
9. Gautel, M., and Goulding, D., 1996. A molecular map of titin/connectin elasticity reveals two different mechanisms acting in series. *FEBS Lett* 385: 11-4.
10. Geeves, M.A., Goody, R.S., and Gutfreund, H., 1984. Kinetics of acto-S1 interaction as a guide to a model for the crossbridge cycle. *J Muscle Res Cell Motil* 5: 351-61.
11. Goldstein, M. A., L. H. Michael, et al. 1987. "Z-band dynamics as a function of sarcomere length and the contractile state of muscle." *FASEB J.* 1: 133-142
12. Goldstein, M. A., L. H. Michael, et al. 1989. "Two structural states of Z-bands in cardiac muscle." *Am. J. Physiol.* 256: H552-H559

13. Goody, R.S., and Holmes, K.C., 1983. Cross-bridges and the mechanism of muscle contraction. *Biochim Biophys Acta* 726: 13-39.
14. Goss, C.M., 1963. On the anatomy of muscles for beginners by Galen of Pergamon. *Anat Rec* 145: 477-501.
15. Hanson, J., and Huxley, H.E., 1953. Structural basis of the cross-striations in muscle. *Nature* 172: 530-532.
16. Herrmann, C., M. Houadjeto, F. Travers, and T. Barman. 1992. "Early step in the Mg<sup>2+</sup>-ATPase of relaxed myofibrils." *Biochemistry*. 31:8036-8042.
17. Horn, M., H. Remkes, H. Stromer, C. Dienesch, and S. Neubauer. 2001. Chronic phosphocreatine depletion by the creatine analogue b-guanidinopropionate is associated with increased mortality and loss of ATP in rats after myocardial infarction. *Circulation*. 104:1844–1849.
18. Hubble, M. J., R. C. Rosanske, and T. S. Moerland. 1995. Diffusion coefficients of ATP and phosphocreatine in isolated muscle: pulsed gradient 31P NMR of small biological samples. *NMR Biomed*. 8: 72–78.
19. Huxley, A.F., and Niedergerke, R., 1954. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* 173: 971-3.
20. Huxley, H.E., and Hanson, J., 1954. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 173: 973-6.
21. Kayamori, T., N. Miyake, et al. 2006. "Mechanical strength of sarcomere structures of skeletal myofibrils studied by sub micromanipulation." *Cell structure and function* 31: 135-143
22. Lederer, W. J., E. Niggli, and R. W. Hadley. 1990. Sodium-calcium exchange in excitable cells: fuzzy space. *Science*. 248:283.
23. Liao, R., L. Nascimben, J. Friedrich, J. K. Gwathmey, and J. S. Ingwall. 1996. Decreased energy reserve in an animal model of dilated cardiomyopathy. Relationship to contractile performance. *Circ. Res.* 78:893–902.
24. Ma, Yong-Ze, E. W. Taylor, 1994. "Kinetic Mechanism of Myofibril ATPase." *Biophys. J.* 66: 1542-1553
25. McLellan, G., A. Weisberg, and S. Winegrad. 1983. Energy transport from mitochondria to myofibril by a creatine phosphate shuttle in cardiac cells. *Am. J. Physiol.* 254:C423–C427.
26. Millar, N.C., and Homsher, E., 1992. Kinetics of force generation and phosphate release in skinned rabbit soleus muscle fibers. *Am J Physiol* 262, C1239-45.

27. Miranda, C.M., 2009. [Johannes Vermeer and Anthon van Leeuwenhoek: Delft Art and Science together during the golden Dutch century]. *Rev Med Chil* 137: 567-74.
28. Neely, J. R., and L. W. Grotyohann. 1984. Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium. Dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts. *Circ. Res.* 55:816–824.
29. Ramsey, R.W., and Street, S.F., 1940. The isometric length-tension diagram of isolated skeletal muscle fibers of the frog. *J Cell Comp Physiol* 15:11-34.
30. Schaub, M.C., Hefti, M.A., Zuellig, R.A., and Morano, I., 1998. Modulation of contractility in human cardiac hypertrophy by myosin essential light chain isoforms. *Cardiovasc Res* 37: 381-404.
31. Selivanov, V. A., J. Puigjaner, A. Sillero, J. J. Centelles, A. Ramos, P. W. N. Lee, and M. Cascante. 2004. An optimized algorithm for flux estimation from isotopomer distribution in glucose metabolites. *Bioinformatics.* 20:3387–3397.
32. Selivanov, V. A., L. E. Meshalkina, O. N. Solovjeva, P. W. Kuchel, A. Ramos-Montoya, G. A. Kochetov, P. W. N. Lee, and M. Cascante. 2005. Rapid simulation and analysis of isotopomer distributions using constraints based on enzyme mechanisms: an example from HT29 cancer cells. *Bioinformatics.* 21:3558–3564.
33. Selivanov, V. A., S. Krause, et al. 2007. "Modeling of spatial metabolite distributions in the cardiac sarcomere." *Biophys J.* 92(10): 3492-3500.
34. Selivanov, V. A., S. Marin, P. W. N. Lee, and M. Cascante. 2006. Software for dynamic analysis of tracer-based metabolomic data: estimation of metabolic fluxes and their statistical analysis. *Bioinformatics.* 22:2806–2812.
35. Squire, J.M., and Morris, E.P., 1998. A new look at thin filament regulation in vertebrate skeletal muscle. *Faseb J.* 12: 761-71.
36. Telley, I.A., Denoth, J., Stussi, E., Pfitzer, G., and Stehle, R., 2006a. Half-sarcomere dynamics in myofibrils during activation and relaxation studied by tracking fluorescent markers. *Biophys J.* 90: 514-30.
37. Trentham, D. R., J. F. Eccleston, et al. 1976. "Kinetic Analysis of ATPase Mechanisms." *Quarterly Reviews of Biophysics* 9 2: 217-281
38. Trinick, J., 1994. Titin and nebulin: protein rulers in muscle? *Trends Biochem Sci* 19: 405-9.
39. Voorhoeve, R., and Bremer, J.M., 1985. Instead of "plethysmography": "kenoseography" and "plesmonegraphy". *Angiology* 36: 541-2.

40. Wegmann, G., E. Zanolta, H. M. Eppenberger, and T. Wallimann. 1992. In situ compartmentation of creatine kinase in intact sarcomeric muscle: the acto-myosin overlap zone as a molecular sieve. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 4:420–435.
41. White, H. D. 1985. "Kinetics of tryptophan fluorescence enhancement of myofibrils." *J. Biol. Chem.* 260:982-986.
42. Wiechert, W., M. Mollney, N. Isermann, M. Wurzel, and A. A. de Graaf. 1999. "Bidirectional reaction steps in metabolic networks: III. Explicit solution and analysis of isotopomer labeling systems." *Biotechnol. Bioeng.* 66:69–85.
43. Wills, A., 1999. Herophilus, Erasistratus, and the birth of neuroscience. *Lancet* 354:1719-20.
44. Comsol Guide: <http://math.nju.edu.cn/help/mathhpc/doc/comsol/modeling.pdf>
45. Μπουντουβής Α., “Υπολογιστική ανάλυση με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων” ,Ε.Μ.Π., Αθήνα 1992