

# Kofeiini protokollide matemaatiline modelleerimine südamelihaskus

Magistritöö

Üliõpilane: Ralf M. Palmiste

Üliõpilaskood: 242215LAFM

Juhendaja: Martin Laasmaa, nooremprofessor, Tallinna Tehnikaülikool

Õppekava: Rakendusfüüsika ja andmeteadus

## **Autorideklaratsioon**

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Ralf Magnus Palmiste  
18.05.2026

Töö vastab esitatavatele nõuetele.  
Juhendaja: Martin Laasmaa  
18.05.2026

## **Tehisintellekti kasutamise deklaratsioon**

Antud magistritöös on kasutatud tehisintellekti abi koodi kirjutamise protsessis, allikate leidmiseks ning teksti toimetamiseks.

Näiteks lausete paremaks sõnastamiseks ja õigekirja parandamiseks ning koodivigade otsimiseks. Töö kirjutamisel kasutati järgmisi lahendusi: ChatGPT, Kilo code, Copilot, Claude ja elle.tlu.ee.

Autor: Ralf Magnus Palmiste

18.05.2026

# Sisukord

<b>Lühendite loend</b>	<b>6</b>
<b>1 Sissejuhatus</b>	<b>8</b>
<b>2 Kirjanduse ülevaade</b>	<b>9</b>
2.1 Süda . . . . .	9
2.1.1 Makroskoopiline anatoomia . . . . .	9
2.1.2 Südamelihase eripära . . . . .	11
2.1.3 Südame spetsialiseerunud rakutüübid ja nende paiknemine . . . . .	11
2.1.4 Erinevused roti ja inimese südame vahel . . . . .	14
2.1.5 Aktsioonipotentsiaal . . . . .	15
2.1.6 Elektro-mehaaniline sidestus . . . . .	16
2.1.7 Kofeiin ja süda . . . . .	19
2.1.8 Südame elektrofüsioloogia uurimismeetodid . . . . .	20
2.2 Elektrofüsioloogia modelleerimine . . . . .	22
2.2.1 Matemaatiliste mudelite vajadus . . . . .	22
2.2.2 Ioonvoolude matemaatiline kirjeldus . . . . .	22
2.2.3 Raku membraan kui elektriabel: Hodgkin-Huxley raamistik . . . . .	22
2.2.4 Südame elektrofüsioloogia mudelite areng . . . . .	23
2.2.5 Roti kardiomyotsüüdi mudelid: Pandit ja Terkildsen . . . . .	23
<b>3 Metoodika</b>	<b>25</b>
3.1 Mudelivalik . . . . .	25
3.2 Eksperimentaalne andmeallikas . . . . .	25
3.3 Stimulatsioonisageduse valik . . . . .	26
3.4 Mudeli implementatsioon . . . . .	26
3.5 Numbriline integreerimine . . . . .	26
3.5.1 Võrdluse tulemused . . . . .	27
3.5.2 Efektiivsuse võrdlus . . . . .	28
3.6 Mudeli täiendused . . . . .	28
3.6.1 Fluorestseeruva kaltsiumiindikaatori modelleerimine . . . . .	28
3.6.2 RyR2 kofeiini mudeli termodünaamiline tuletuskäik . . . . .	29

3.6.3	Kofeiini mõju modelleerimine RyR2 kineetikas . . . . .	30
3.7	Füsioloogiliste algväärtuste ja stabiilse seisundi määramine . . . . .	31
3.8	Atraktoranalüüs ja piirtsükli stabiilsuse hindamine . . . . .	32
3.8.1	Atraktoranalüüsi motivatsioon . . . . .	32
3.8.2	Kolm algväärtuste komplekti . . . . .	32
3.8.3	Löögist-lööki koondumisanalüüs . . . . .	32
3.8.4	Floquet' kordajate geomeetiline lähendus . . . . .	33
3.8.5	Aktsioonipotentsiaalid ja $Ca^{2+}$ transiendid . . . . .	34
3.8.6	Bifurkatsioonilävi . . . . .	34
3.9	Mudeli parameetrite sobitamine . . . . .	37
<b>4</b>	<b>Tulemused</b>	<b>39</b>
4.1	Eksperimentaalsete kofeiini transientide varieeruvus . . . . .	39
4.2	Mudeli sobitamine eksperimentaalsetele andmetele . . . . .	40
4.2.1	Esinduslik näide: katse c2 . . . . .	40
4.2.2	Kõigi katsete sobitamine . . . . .	41
4.3	Sobitatud parameetrid . . . . .	41
4.3.1	Kofeiini parameetrite varieeruvus . . . . .	41
4.3.2	loonkanali parameetrite identifitseeritavus ja anomaaliad . . . . .	41
4.4	Parameetrite skaneerimine . . . . .	44
4.4.1	Skännimise ülesehitus . . . . .	44
4.4.2	Kulufunktsiooni maastiku analüüs . . . . .	44
4.4.3	Võrdlus TRF-tulemusega . . . . .	46
4.5	Kokkuvõte . . . . .	46
<b>5</b>	<b>Arutelu</b>	<b>47</b>
5.1	Mudeli võimekus kofeiini transiendi kirjeldamisel . . . . .	47
5.2	SR-i kaltsiumi täituvustase ja selle varieeruvus . . . . .	47
5.3	NCX ja SERCA parameetrite identifitseeritavus . . . . .	47
5.4	Töö piirangud . . . . .	48
5.5	Järeldused ja edasised suunad . . . . .	48
<b>6</b>	<b>Viited</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Tänuavaldus</b>	<b>56</b>

<b>8</b>	<b>Annotatsioon</b>	<b>58</b>
<b>9</b>	<b>Abstract</b>	<b>59</b>
<b>10</b>	<b>Lisad</b>	<b>60</b>

## Lühendite loend

<b>AK</b>	Algväärtuste komplekt (simulatsiooni lähteolek)
<b>AP</b>	Aksioonipotentsiaal ( <i>action potential</i> )
<b>ATP</b>	Adenosiintrifosfaat
<b>AV</b>	Atrioventrikulaarne (sõlm või juhtivus)
<b>BDF</b>	Tagurpidi diferentsiatsiooni valem ( <i>Backward Differentiation Formula</i> ); jäik hariliku diferentsiaalvõrrandi integraator
<b>cAMP</b>	Tsükliline adenosiinmonofosfaat
<b>CaMKII</b>	Ca <sup>2+</sup> /kalmoduliinisõltuv proteiinkinaas II
<b>CaRU</b>	Kaltsiumi vabanemisüksus ( <i>calcium release unit</i> ); LCC ja RyR2 funktsionaalne paar düaadis
<b>CDI</b>	Kaltsiumist sõltuv inaktivatsioon ( <i>calcium-dependent inactivation</i> )
<b>CellML</b>	Rakumodelite kirjeldamise XML-põhine standard
<b>CICR</b>	Kaltsiumist indutseeritud kaltsiumi vabanemine ( <i>calcium-induced calcium release</i> )
<b>CMDN</b>	Kalmoduliin ( <i>calmodulin</i> ); tsütosoolne kaltsiumipuhver
<b>CPVT</b>	Katehoolamiinergiline polümorfne ventrikulaarne tahhükardia
<b>DAD</b>	Hilinenud järeldepolarisatsioon ( <i>delayed afterdepolarization</i> )
<b>ECC</b>	Elektro-mehaaniline sidestus ( <i>excitation-contraction coupling</i> )
<b>EKG</b>	Elektrokardiogramm
<b>FCa</b>	Seotud Fluo-4 kontsentratsioon (fluorestseeruva indikaatori olekumuu- tuja)
<b>GHK</b>	Goldman-Hodgkin-Katz võrrand (ioonvoolude kirjeldamiseks)
<b>HCN</b>	Hüperpolarisatsiooniaktiveeritud tsüklilise nukleotiidiga juhitud kanal ( <i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel</i> ); <i>funny current</i>
<b>HH</b>	Hodgkin-Huxley (ioonikanalite kineetika mudel)
<b>JSR</b>	Ühenduslik sakroplasmaatiline retiikuluum ( <i>junctional SR</i> ); SR-i osa RyR2 lähedal
<b>KVA</b>	Kodade virvendusarütmia

<b>LCC</b>	L-tüüpi kaltsiumikanal ( <i>L-type calcium channel</i> )
<b>LSODA</b>	Harilike diferentsiaalvõrrandite adaptatiivne integraator ( <i>Livermore Solver for Ordinary Differential Equations with Automatic switching</i> )
<b>LTCC</b>	L-tüüpi kaltsiumikanal (alternatiivne lühend; <i>L-type calcium channel</i> )
<b>MHC</b>	Müosiini raske ahel ( <i>myosin heavy chain</i> )
<b>NCX1</b>	Südame naatrium-kaltsiumivaheti isoform 1 (südamelihaskule omane isoform) ( <i>sodium-calcium exchanger</i> )
<b>NSR</b>	Võrgustikuline sakroplasmaatilise retiikuluumi osa (network SR); SR-i osa kaugel RyR2-st
<b>ODE</b>	Harilik diferentsiaalvõrrand ( <i>ordinary differential equation</i> )
<b>PHN</b>	Pandit-Hinch-Niederer (Terkildseni mudeli kolme alamudeli lühend)
<b>PKA</b>	Proteiinkinaas A (cAMP-sõltuv kinaas, mis fosforüleerib rüanodiinretseptoreid ja fosfolambaani)
<b>PLN</b>	Fosfolambaan ( <i>phospholamban</i> ); SERCA inhibitoorne regulaatorvalk
<b>PMCA</b>	Plasmamembraani Ca <sup>2+</sup> -ATPaas ( <i>plasma membrane calcium ATPase</i> )
<b>RK4</b>	Neljandat järku Runge-Kutta integreerimisskeem (fikseeritud sammuga)
<b>RMS</b>	Ruutkeskmine hälve ( <i>root mean square</i> )
<b>RyR / RyR2</b>	Rüanodiinireseptori südame isoform 2
<b>SA</b>	Sinoatriaalne (sõlm)
<b>SERCA</b>	Sakroplasmaatilise/endoplasmaatilise retiikuluumi Ca <sup>2+</sup> -ATPaas ( <i>SR/ER calcium ATPase</i> )
<b>SR</b>	Sakroplasmaatilise retiikuluumi ( <i>sarcoplasmic reticulum</i> )
<b>SSM</b>	Püsivseisundi mudel ( <i>steady-state model</i> )
<b>TRF</b>	Usalduspiirkonna meetod ( <i>Trust Region Reflective</i> ); mittelineaarne optimeerimisalgoritm
<b>TRPN</b>	Troponiin-C (kaltsiumi puhvrina mudelis)

# 1 Sissejuhatus

Südame uurimine on olnud meditsiini ja loodusteaduse keskmes juba aastatuhandeid. Moodne südame elektrofüsioloogia sai hoogu alles 20. sajandil, kui Hodgkin ja Huxley kirjeldasid aktsioonipotentsiaali ionikanalite mehhanismi, luues matemaatilise raamistiku, millel tänapäevane südamelihaskude elektrofüsioloogiline modelleerimine põhineb. Kuna südame elektriline aktiivsus, kaltsiumi dünaamika ja mehaaniline kontraktsioon on tihedalt põimunud, on arvutusliku mudeli roll nende seoste mõistmisel aina kasvamas.

Südamehaigused on endiselt ülemaailmselt juhtiv surmapõhjus: WHO 2020. aasta raporti kohaselt sureb kõige rohkem inimesi isheemiliste südamehaiguste tagajärjel ning sama trend kehtib ka Eestis [1, 2]. Paljudel juhtudel peituvad südamehäirete juured raku tasandil – eelkõige elektro-mehaanilises sidestuses (ECC), kus kaltsiumiioonid toimivad lülitina elektrilise erutuse ja mehhaanilise kontraktsiooni vahel [3]. Sarkoplasmaatilise retiikulumini (SR) kaltsiumivarud ja nende dünaamika määravad kontraktsiooni tugevuse ning häirunud SR-i  $Ca^{2+}$  tasakaal on seotud arütmiate ja südamepuudulikkusega [3, 4].

SR-i kaltsiumisisalduse hindamiseks kasutatakse laboratoorses praktikas kofeiini: kofeiin sensibiliseerib rüanodiinireseptoreid (RyR2) otseselt, vallandades SR-ist korraga kogu laadestatud kaltsiumi. Tekkiv naatrium-kaltsiumivaheti (NCX1) vahendatud vooluamplituud korreleerub SR-i eelneva täituvusastmega, muutes kofeiini transiendi usaldusväärseks SR-i kaltsiumivarude mõõdikuks [3, 5].

Kuna bioloogilised süsteemid on kurikuulsad oma keerukuse poolest, on hädavajalik kasutada matemaatilisi mudeleid, et eraldada üksikute mehhanismide panused eksperimentaalselt mõõdetud signaalist [6]. Terkildsen jt (2008) integreeritud mudel kirjeldab roti ventrikulaarse kardiomüotsüüdi elektrofüsioloogiat, CaRU-põhist (Kaltsiumi vabanemisüksus) CICR-i (Kaltsiumist indutseeritud kaltsiumi vabanemine) ja müofilamentide  $Ca^{2+}$  puhverdust ning on valideeritud roti eksperimentaalsete andmete põhjal [7].

Käesoleva magistritöö eesmärk on laiendada Terkildseni PHN-mudelit kofeiini otsese toimega RyR2-le, et modelleerida kofeiini mõju roti ventrikulaarse kardiomüotsüüdi rakusisesele kaltsiumi dünaamikale. Hüpotiseeritakse, et RyR2 sensibiliseerimise kirjeldamine kombineeritud kineetika- ja tasakaalumuutusena on piisav, et jäljendada eksperimentaalselt mõõdetud kofeiini transiente erinevate SR-i täituvustasemetega rakkudes. Selleks täiendati mudelit kolme lisaosaga: fluorestseeruva kaltsiumiindikaatori Fluo-4 seondumisdünaamika, kofeiini otsene toime RyR2 kineetikale ja tundlikkusele ning füsioloogiliste algväärtuste kohandamine. Mudel implementeeriti C keeles ning sobitati TRF meetodil seitsmele eraldatud roti ventrikulaarse kardiomüotsüüdi kofeiini transiendile [8].

Autor peab tööd uudseks, sest kofeiini otsesest toimet RyR2-le on senises kirjanduses kirjeldatud peamiselt kvalitatiivselt [3, 5]; käesolev töö esitab kvantitatiivse parameetristiku, mis kirjeldab samaaegselt kofeiini kineetilist ja tasakaalumõju RyR2-le ühises kalibreeritud mudelis ning demonstreerib selle identifitseeritavust eraldatud rakkude eksperimentaalsete andmete põhjal.

## 2 Kirjanduse ülevaade

### 2.1 Süda

Südame talitlus on vereringe toimimisel keskse tähtsusega kogu organismi ainevahetuse ja hapnikuga varustamise seisukohalt [9]. Vereringe kaudu transporditakse kudedesse hapnik ja toitained ning eemaldatakse ainevahetuse jääkained, mis liiguvad vereplasmas edasi neerudesse ja maksa edasiseks töötlemiseks ja väljutamiseks [10, 11]. Toitainete omastamine rakkude poolt toimub erinevate transpordimehhanismide kaudu, sealhulgas passiivse, fasiliteeritud ja aktiivse transpordi teel [12]. Kõigi nende protsesside efektiivne toimimine eeldab südame rütmilist ja koordineeritud tööd, et vereringe ei katkeks.

Südame funktsiooni häired, mis pärsvivad organismi tavapärast talitlust, võivad tuleneda nii struktuursetest kui ka funktsionaalsetest kõrvalekalletest ning nende mõju ulatub kergetest füsioloogilistest eripäradest kuni eluohtlike seisunditeni [1, 2]. Paljudel juhtudel on südame talitluse häirete aluseks muutused raku tasandil, mis mõjutavad südamelihase kontraktsiooni ja relaksatsiooni mehhanisme [3, 4].

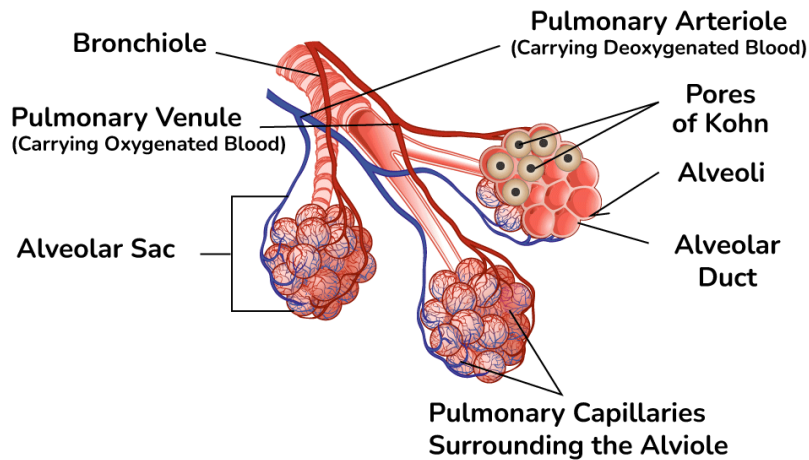
#### 2.1.1 Makroskoopiline anatoomia

Inimese süda on ligikaudu rusikasuurune lihaseline organ, mis paikneb rindkere keskel, nn mediastiinumis, väikese kaldega vasakule [9, 13]. Süda on ümbritsetud kahe kihilise kestaga ehk perikardiga, mille vahel olev vedelik vähendab hõõrdumist südame liikumisel [13]. Rinnakorv ja ribid kaitsevad südant mehaaniliste vigastuste eest. Harva esineb kaasasündinud seisund *situs inversus*, mille korral paikneb süda peegelpildis paremal pool [9].

Süda koosneb neljast õõnsusest: kahest kojast (*atrium*) ja kahest vatsakesest (*ventriculus*), mis on omavahel eraldatud klappide ja vaheseintega (joonis 2). Lihaseline vahesein, *septum*, jagab südame anatoomilistel kaalutlustel paremaks ja vasakuks pooleks, kusjuures kumbki pool täidab erinevat füsioloogilist rolli [13, 14].

**Parem pool ja kopsuverevool** Parem koda võtab vastu kogu keha kudedest tagasivooluva hapnikuvaese vere kahest suurest veenist: ülemisest õõnesveenist (*vena cava superior*), mis toob vere pea ja ülajäsemete piirkonnast, ning alumisest õõnesveenist (*vena cava inferior*), mis kogub vere kõhuõõnest ja alajäsemetest [13, 15]. Paremast kojast liigub veri läbi trikuspidaalklappe paremasse vatsakesse, mis pumpab selle kopsutüve kaudu kopsudesse. Kopsudes toimub gaasivahetus alveolaartasandil: alveoolid on õhukese seinaga õhukotikesed, mille pind on kaetud ühekihilise epiteeliga ning ümbritsetud tiheda kapillaarvõrgustikuga [13, 16]. Hapnik ( $O_2$ ) ja süsinikdioksiid ( $CO_2$ ) liiguvad läbi alveolaarmembraani passiivse difusiooni teel, järgides Ficki esimest seadust – gaasivoog on proportsionaalne rõhu gradiendi ning membraani pindala suhtes membraani paksusega:  $J = -D \frac{\Delta p}{\Delta x}$ , kus  $D$  on gaasi difusioonikoefitsient,  $\Delta p$  rõhkude vahe ja  $\Delta x$  difusioonitee pikkus [16]. Alveolaarne hapnikuosarõhk ( $p_{O_2} \approx 104$  mmHg) on oluliselt kõrgem kui venoosse vere oma ( $p_{O_2} \approx 40$  mmHg), mistõttu  $O_2$  difundeerub spontaanselt läbi alveolaar-epiteeli ja kapillaari endoteeli punastesse verelibledesse, kus see seondub hemoglobiiniga [13, 16]. Vastupidises suunas toimub  $CO_2$  difusioon: kudedes tekkinud  $CO_2$  omab veresoontes kõrgemat osarõhku ( $p_{CO_2} \approx 45$  mmHg)

## Diagram of Alveoli



**Joonis 1: Kopsualveooli anatoomia.** Kopsualveooli ehituse lihtsustatud skeem, kus on näidatud bronhiilid ja kapillaarid, mille läbi toimub gaaside vahetus [17].

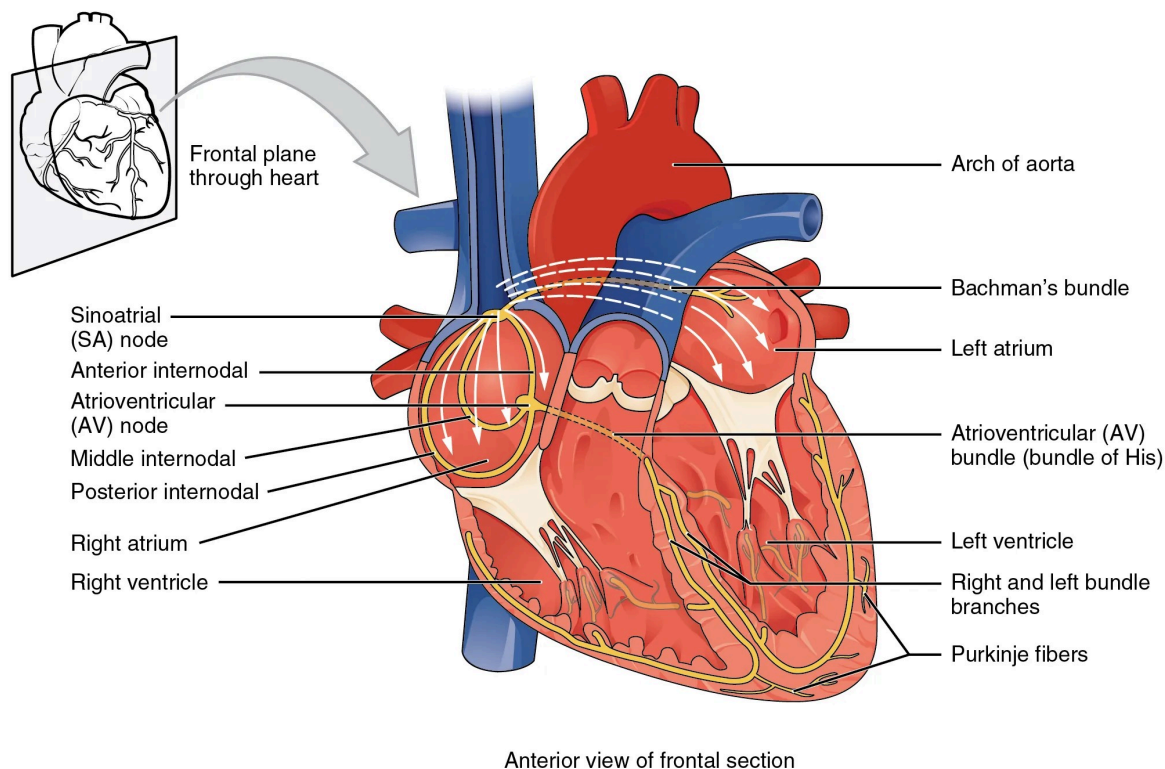
kui alveolaarne õhk ( $p_{\text{CO}_2} \approx 40$  mmHg), mistõttu  $\text{CO}_2$  difundeerub alveolaarsesse õhku ning väljutatakse väljahingamisel [16].

**Vasak pool ja süsteemne verevool** Hapnikuga rikastatud veri saabub kopsudest nelja kopsuveeni kaudu vasakusse kotta ning liigub sealt läbi mitraal- ehk bikuspidaalklappe vasakusse vatsakesse [13, 15]. Vasak vatsake on südame kõige lihaselisem osa – selle sein on kolm kuni neli korda paksem kui parema vatsakese sein, kuna see peab pumpama verd läbi kogu keha [4, 13]. Vasak vatsake väljutab vere aordi kaudu kehasse, kust see jõuab arterite ja kapillaaride kaudu kõikidesse organitesse ning kudedesse [13].

**Klapid** Südame neli klappi – trikuspidaal-, pulmonaal-, mitraal- ja aordiklapp tagavad vere ühesuunalise liikumise ning takistavad tagasivoolu [13, 15]. Klappid avanevad ja sulguvad passiivselt rõhugradiendi muutuste tõttu, ilma lihaste aktiivse osaluseta.

**Koronaararterid.** Südamelihase saab hapnikku ja toitaineid koronaararterite kaudu, mis hargnevad aordi juurtelt vahetult pärast aordiklappi [13]. Vasak ja parem koronaararter varustab vastavaid südame piirkondi; nende ahenemine (arteroskleroos) on müokardiinfarkti peamine põhjus [2].

**Perikard.** Südant ümbritseb kahekihiline sidekoe kest ehk perikard, mis koosneb välimisest fibroossest perikardist ja sisemisest seroossest perikardist [18]. Seroosne perikard jaguneb omakorda kaheks leheks: parietaalseks leheks, mis katab fibroosse perikardi sisepinda, ning vistseraalseks leheks ehk epikardiks, mis katab südame välispinda. Nende kahe lehe vahele jääb perikardiline õõnus, mis on täidetud ligikaudu 15–50 ml perikardiaalvedelikuga, mis vähendab hõõrdumist südame liikumisel ning kaitseb südant mehaaniliste ja infektsioonist tingitud kahjustuste eest [13, 18].



**Joonis 2: Südame anatoomia.** Südame läbilõige eestvaates, millel on näidatud neli kambrit ning sõlmed: sinoatriaalne sõlm (SA-sõlm) paremas kojas genereerib rütmilise elektrimpulsi, mis levib internodaalsete radade kaudu atrioventrikulaarsesse sõlme (AV-sõlm). AV-sõlmest jätkub impulss His'i kimbu kaudu parema ja vasaku kimbu harudesse ning sealt Purkinje fiibrite kaudu vatsakeste müokardini, käivitades koordineeritud kontraktsiooni [19].

### 2.1.2 Südamelihase eripära

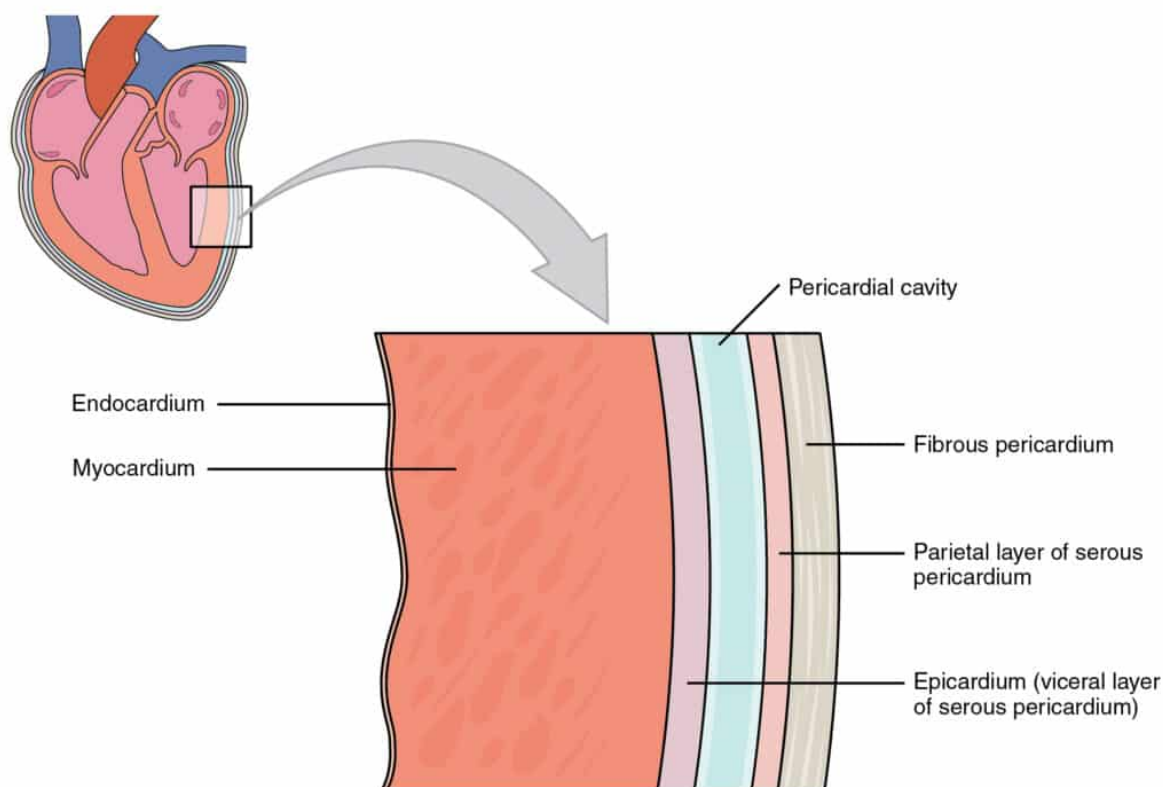
Südamelihas, ehk müokard, on oma omadustelt skeleti- ja silelihase vahepealne lihaskoe-tüüp [3, 4]. Erinevalt skeletilihasest on kardiomüotsüüdid ühetuumalised (harvemal juhul ka hetuumalised), hargnenud ning ühendatud üksteisega ketaste kaudu [20]. Need kettad sisaldavad mehaanilisi (desmosoomid) ja elektrilisi ühendusi, mis võimaldavad aktsioonipotentsiaali kiiret ja sünkroonset levimist üle kogu müokardi kui [3, 20]. Tänu sellele struktuurilisele eripärale toimub südame kontraktsioon ühtsena, tagades efektiivse vereringe.

Kardiomüotsüütide energiatarve on see-eest väga suur ning müokard sõltub peaaegu täielikult aeroobsest ainevahetusest, kasutades substraatidena rasvhappeid, glükoosi ja laktaati [21].

### 2.1.3 Südame spetsialiseerunud rakutüübid ja nende paiknemine

Süda koosneb ise veel mitmest funktsionaalselt erineva rolliga rakupopulatsioonist. Nende täpne paiknemine ja elektrofüsioloogiline profiil on koordineeritud kontraktsiooni seisukohalt äärmiselt oluline.

**Sinoatriaalsed rütmiseadja rakud (SA-sõlm)** Sinoatriaalne (SA) sõlm paikneb parema koha ülaosas, ülemise õõnesveeni suudme lähedal [22, 23]. See väike, ligikaudu 1–2 cm<sup>2</sup> suurune struktuur sisaldab endas rütmiseadja rakke, mis genereerivad spontaanseid aktsioonipo-



**Joonis 3: Südame seina kihid ja perikard.** Südame seina läbilõige näitab kihilist ülesehitust seestpoolt väljapoole: endokard voerdab südame õõnsusi seestpoolt, müokard moodustab südame lihaskihi ning epikard (seroosne perikard, vistseraalne leht) katab südame välispinda. Epikardit ja parietaalset seroosset perikardi eraldab perikardiline õõnus, mis on täidetud perikardiaalvedelikuga. Välimisena piirab südant fibroosne perikard [19].

tentsiaale sagedusega 60–100 korda minutis puhkeolekus [24]. SA-sõlme rakkudel puudub stabiilne puhkepotentsiaal; selle asemel toimub järkjärguline spontaanne diastoolne depolarisatsioon, mida vahendavad kolm peamist voolu: (1) *funny current* ( $I_f$ ) HCN-kanalite kaudu, mis aktiveeruvad polarisatsioonil ja kannavad sissenevaid  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  vooge; (2) T-tüüpi kaltsiumivool  $\text{Ca}_V$ ; ning (3) hiline L-tüüpi kaltsiumivool, mis viib lõpliku depolarisatsioonini [24, 25]. SA-sõlme rakud on väiksemad ja sisaldavad vähem kontraktilseid müofibrille kui töötavad kardiomüotsüüdid. Nende peamine ülesanne on elektrilise rütmiseadmissignaali genereerimine [22]. Samaaegselt levib impulss SA-sõlmest vasakusse kotta Bachmani kimbu kaudu, tagades mõlema koja sünkroonse aktivatsiooni [13].

**Atriaalsed kardiomüotsüüdid** Kodade (atriaalsed) kardiomüotsüüdid moodustavad parema ja vasaku koja seina lihasmassi ning edastavad SA-sõlmest lähtuva elektrilise signaali kiiresti üle kodade pinna [26]. Need rakud on õhema seinaga ja väiksema läbimõõduga kui ventrikulaarsed kardiomüotsüüdid. Nende aktsioonipotentsiaali platoofaas on lühem tänu rakutüübi spetsiifilisele ja sellele omasele kiirele kaaliumivoolule, mida vatsakeste rakkudes ei esine [26].

**Atrioventrikulaarne sõlm (AV-sõlm)** Atrioventrikulaarne (AV) sõlm paikneb kodade ja vatsakeste vaheseina alumises osas, Kochi kolmnurgas [23]. See struktuur täidab kahte ülesannet: (1) filtreerib kodadest saabuvasid impulsse, lubades vaid sobiva sagedusega signaale

vatsakestesse edasi, ning (2) tekitab kontrollitud viivituse ( $\sim 120\text{--}200\text{ ms}$ ), mis annab vatsakestele aega täituda verega enne kontraktsiooni [23, 26]. AV-sõlme rakud on võimelised ka ise spontaanseks depolarisatsiooniks, kuid madalama sagedusega (40–60 lööki/min). See varu rütmiseadmise funktsioon aktiveerub SA-sõlme rikke korral [22]. Kuigi AV-sõlme rütmiseadmine hoiab inimese lühiajaliselt elus, on 40–60 lööki minutis füüsilise koormuse jaoks ebapiisav. SA-sõlme rikke all kannatavad patsiendid kogevad rasket väsimust, pearinglust, minestamishooge ning madalat elukvaliteeti, kuna südame minutimaht ei suuda kohaneda organismi muutuvate hapnikuvajadustega [23, 27]. Ilma meditsiinilise sekkumiseta on täielik AV-blokaad eluohtlik seisund, mille suremus esimese aasta jooksul ulatub kuni 50%-ni [27]. Standardraviks on püsirütmiseadja implanteerimine, mis täidab SA-sõlme funktsiooni ning taastab füsioloogilise löögisageduse koos koormustundlikkusega (*rate response*); ajutise sil-lana kasutatakse farmakoloogiliselt atropiini või isoprenaaliini, mis kiirendavad AV-juhtivust kuni püsiravi rakendamiseni [27].

**Purkinje fiibrid** Purkinje fiibrid on His'i kimbu hargnemistest tekkivad suured, spetsialiseerunud kardiomüotsüüdid, mis jooksevad mööda vatsakeste sisemist (endokardi) pinda ning tagavad elektrilise signaali kiirema ja koordineerituma leviku vatsakeste müokardis [22, 23]. Nende läbimõõt on oluliselt suurem kui töötavatel kardiomüotsüütidel. Neil on suurenenud koguses *gap junction*'e ning nende juhtivuskiirus ulatub kuni 4 m/s. Võrdluseks, tavaline ventrikulaarne lihas juhib impulsse kiirusega 0.3–1 m/s [3]. Purkinje fiibrid aktiveerivad vatsakese müokardi esmalt seestpoolt ning allpool paiknevate müokardikihtide suunas, mis tagab vere efektiivse väljutamise aorti ja kopsutüvve [22].

**Ventrikulaarsed kardiomüotsüüdid** Vatsakeste (ventrikulaarsed) kardiomüotsüüdid on südame suurimad, mehaaniliselt kõige aktiivsemad ja enim uuritud rakutüübid [3]. Nad moodustavad südame peamise lihassassi. Nende aktsioonipotentsiaal on kestusega 200–400 ms ning iseloomustub karakteristikliku platoo-faasiga, mida ei esine skeletilihase rakkudel [3]. Käesolevas töös kasutatakse just ventrikulaarseid kardiomüotsüüte eksperimentaalses mudelis, mistõttu kirjeldatakse nende rakusisest kaltsiumi signaliseerimist täpsemalt.

**Soolised erinevused südame elektrofüsioloogias** Naiste ja meeste süda erineb nii hormonaalsel kui ka elektrofüsioloogilisel tasandil [28]. Naistel on puhkeoleku südame löögisagedus keskmiselt kõrgem ning korrigeeritud depolarisatsiooni ja repolarisatsiooni, ehk QT-intervall, pikem. Meestel on see pikem ning see erinevus ilmneb puberteedieas ning peegeldab suguhormoonide mõju  $K^+$ -kanalite ekspressioonile [28], millele antud töös pikemalt ei keskenduta. Selline erinevus QT-intervallis teeb naised haavatavamaks teatud ravimitele ning eluohtlikele arütmiatele nagu *torsades de pointes*, samas kui mehed on eelsoodumalikumad Brugada sündroomiga seotud arütmiatele [28].

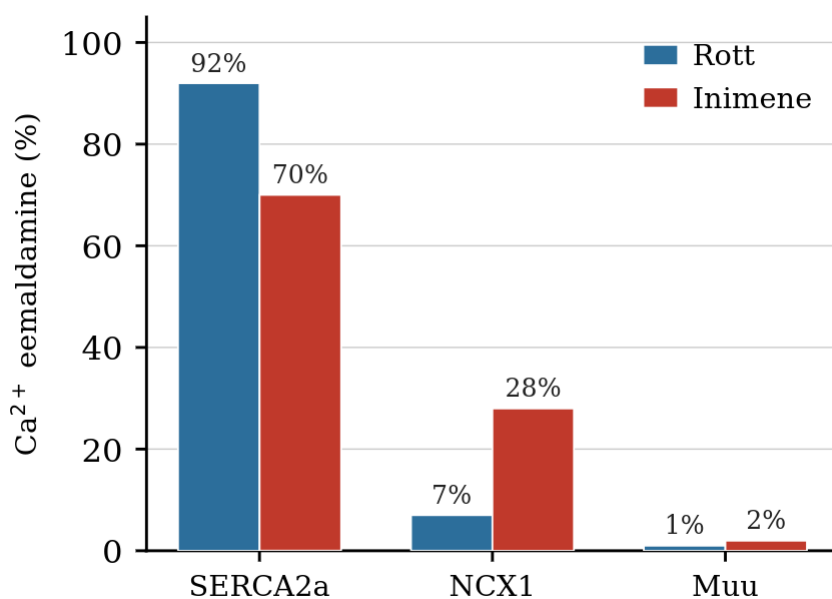
Need erinevused on kliiniliselt olulised, kuid nende mõistmine on pikka aega kannatanud uuringupopulatsioonide soolise tasakaalustamatuse all: 2010–2017 läbi viidud kardiovaskulaarsetes uuringutes moodustasid naised endiselt vaid ligikaudu 27% uuritavatest subjektidest [29], mis on oluliselt piiranud sooliselt eristatud teadmiste omandamist valdkonnas.

## 2.1.4 Erinevused roti ja inimese südame vahel

**Füsioloogilised ülderinevused** Rott ja inimene on mõlemad imetajad ning jagavad sama neljakambrilist südameehitust, vereringe põhiülesannet ja sarnast molekulaarset aparatuuri [30, 31]. Selle sarnasuse tõttu on rottide kardiomüotsüüdid ühed enim kasutatavad rakud südamete uurimises [3]. Siiski, erinevad inimesed ja rotid mitmes olulises kohas.

Roti süda kaalub ligikaudu 1–2 g, inimese süda aga 250–350 g – ligikaudu 200-kordne erinevus massilt [30]. Sellest sõltumata, kui normeerida südame massid keha massidega, siis roti süda moodustab ligikaudu 0.4% roti massist ja inimesel ligikaudu 0.38% [32], ehk normeerituna on massierinevus väike. Puhkeseisundis on rottidel südamelöögisagedus 260–450 lööki minutis, inimesel 60–100 lööki [30]. Roti eluiga on 2–3 aastat, inimesel 70–85 aastat [32, 33]. Hinnanguliselt saavutab roti süda eluea jooksul ~700 miljonit kontraktsiooni, samas saavutab inimese süda ligikaudu 2,5 miljardit lööki [34].

**Elektrofüsioloogilised erinevused** Kõige olulisem ja mudeldamise seisukohalt kriitilisem erinevus on ventrikulaarse aktsioonipotentsiaali kuju. Inimese ventrikulaarsetel südamerakkudel on selge platoo-faas (200–400 ms kestus), mida vahendavad L-tüüpi kaltsiumikanalid [3]. Rottidel sisuliselt puudub platoo-faas: aktsioonipotentsiaal repolariseerub kiiresti tänu domineerivale väljapoole suunatud kaaliumivoolule, mis teeb roti aktsioonipotentsiaali kestuseks vaid 50–100 ms [3, 31]. Lisaks ekspresseerivad roti ventrikulaarsed kardiomüotsüüdid valdavalt  $\alpha$ -müosiini rasket ahelat ( $\alpha$ -MHC, >94%), mis tagab kiirema müosiini ristsilla kiineetika, samas kui inimestel domineerib  $\beta$ -MHC, mis on aeglasema kiineetikaga [31]. Need erinevused selgitavad, miks roti süda suudab mehaaniliselt täielikult kontraheeruda ja lõõgastuda üle 300 korra minutis, samas kui inimese süda töötab 60–100 lööki minutis ning vajab pikemat kontraktsiooni- ja lõõgastusaega [3, 31].



**Joonis 4: Kaltsiumi eemaldamise mehhanismide osakaalud rotil ja inimesel.** Pärast kontraktsiooni eemaldakse tsütoplasmaatiline  $Ca^{2+}$  peamiselt SERCA2a ja NCX1 vahendusel, kuid nende suhteline osakaal erineb liikide vahel märkimisväärselt. Rotil domineerib SERCA2a (~92%), samas kui inimesel on NCX1 panus oluliselt suurem (~28%). PMCA ja mitokondrite osakaal on mõlemas liigis marginaalne. Andmed: [3, 31, 35].

Kaltsiumi signaaliülekanne kardiomüotsüütides toimib nn kaltsiumist indutseeritud kaltsiumi-vabanemise (CICR) mehhanismi kaudu: membraani depolarisatsioon avab L-tüüpi kaltsiumi-kanalid, mis käivitavad sarkoplasmaatilise retiikuli (SR) rüanodiini retseptorite kaudu suurema kaltsiumi vabanemise SR-ist tsütoplasmasse, põhjustades kontraktsiooni [3]. Lõõgastumiseks tuleb tsütoplasmaatiline kaltsium eemaldada, milleks kardiomüotsüütidel on peamiselt kaks mehhanismi: SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaas (SERCA2a), mis pumpab kaltsiumi aktiivselt tagasi SR-i, ning naatriumkaltsiumtransporter (NCX1), mis viib kaltsiumi rakust välja [3]. Vähesel määral osaleb ka plasmamembraani  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaas (PMCA), kuid selle panus on marginaalne ( $\sim 1\text{--}2\%$ ) [3, 35, 36].

Nende mehhanismide osakaal erineb kahe liigi vahel märkimisväärselt. Rottidel eemaldatakse tsütoplasmaatiline kaltsium pärast kontraktsiooni peamiselt SERCA2a kaudu SR-i ( $\sim 92\%$ ), NCX1 panus on tagasihoidlikum ( $\sim 7\%$ ) ning PMCA moodustab  $\sim 1\%$  [3]. Inimesel on suhe märkimisväärselt erinev: SERCA2a osakaal on  $\sim 70\%$ , NCX1 osakaal  $\sim 28\%$  ning PMCA ja mitokondrite osalus on  $\sim 2\%$  [3]. See tähendab, et roti müokard on funktsionaalselt palju rohkem sõltuv SERCA2a efektiivsusest, samas kui inimese rakus mängib NCX1 oluliselt suuremat rolli kaltsiumi homöostaasis [35].

### 2.1.5 Aktsioonipotentsiaal

Aktsioonipotentsiaal on rakumembraani potentsiaali lühiajaline muutus, mille käigus membraanipotentsiaal depolariseerub kiirelt positiivseks ning repolariseerub seejärel tagasi puhketasemele [37]. Südames eristatakse kahte funktsionaalselt erinevat aktsioonipotentsiaali tüüpi – kiiret ja aeglast – mille jaotus rakutüübiti on tihedalt seotud koordineeritud kontraktsiooni tagamisega (joonis 5).

**Kiire aktsioonipotentsiaal** Kiired aktsioonipotentsiaalid esinevad atriaalsetes kardiomüotsüütides, ventrikulaarsetes kardiomüotsüütides ning Purkinje fiibrides [37, 38]. Nende rakkude puhkepotentsiaal on ligikaudu  $-85$  kuni  $-90$  mV, mis tagab naatriumkanalite ( $\text{Na}_V1.5$ ) valmisoleku kiireks aktivatsiooniks [37].

Kiire aktsioonipotentsiaali kulg jaguneb viieks faasiks (joonis 5):

**Faas 0 – kiire depolarisatsioon.** Kui membraanipotentsiaal ületab lävedepinget ( $\sim -65$  mV), avanevad pingetundlikud naatriumkanalid ning  $\text{Na}^+$  ioonid sisenevad raku elektrokeemilise gradiendi tõttu, tõstes membraanipotentsiaali kiiresti positiivseks (kuni  $+30$  mV). Seejärel aktiveeruvad T-tüüpi kaltsiumikanalid, mis toetavad depolarisatsiooni jätkumist [37, 38].

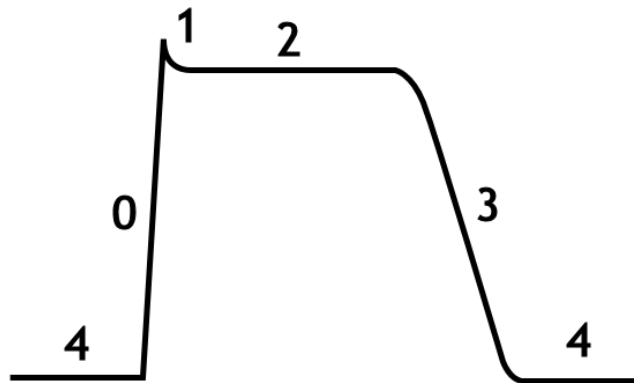
**Faas 1 – esialgne repolarisatsioon.** Naatriumkanalid inaktiveeruvad kiiresti ning lühiajaline väljapoole suunatud kaaliumivool ( $I_{to}$ ) põhjustab membraanipotentsiaali väikese languse enne platoo-faasi algust [37].

**Faas 2 – platoo.** L-tüüpi kaltsiumikanalite (LTCC,  $\text{Ca}_V1.2$ ) kaudu sisenev kaltsiumi vool on tasakaalus aeglase välja suunatud kaaliumivooludega ( $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ ), hoides membraanipotentsiaali ligikaudu  $0$  mV lähedal. See on südame aktsioonipotentsiaali kõige olulisem eripära võrreldes skeletilihase või neuroni aktsioonipotentsiaaliga ning võimaldab pikka refraktaar-

perioodi, välistades tetaanilise kontraktsiooni [3, 37].

**Faas 3 – kiire repolarisatsioon.** LTCC-d sulguvad ning kaaliumikanalid püsivad avatud, tekitades neto väljapoole suunatud voolu, mis viib membraanipotentsiaali tagasi puhkeväärtusele [37].

**Faas 4 – puhkepotentsiaal.** Töökardiomüotsüütides (atriaalsed, ventrikulaarsed, Purkinje) püsib membraanipotentsiaal stabiilselt  $\sim -85$  kuni  $-90$  mV kuni järgmise välise stiimulini.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaas taastab ioongradiendid, kulutades ATP-d [3, 37].



**Joonis 5: Aktsioonipotentsiaali faaside lihtsustatud illustatsioon.** Joonisel on kujutatud kiire aktsioonipotentsiaali viis faasi (0–4): kiire depolarisatsioon (0), esialgne repolarisatsioon (1), platoo (2), kiire repolarisatsioon (3) ning puhkepotentsiaal (4). Tegemist on lihtsustava skeemiga; täpne liigitundlik faaside kuju on esitatud joonisel 6 [39].

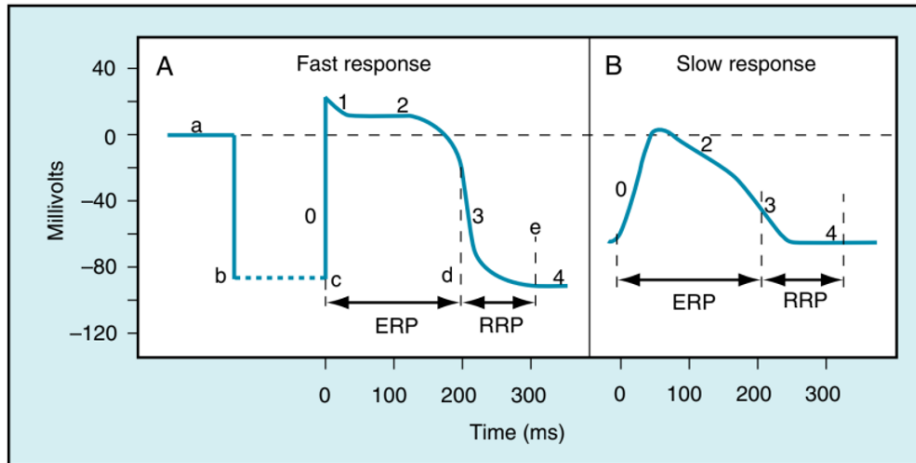
**Aeglane aktsioonipotentsiaal** Aeglased aktsioonipotentsiaalid esinevad sinoatriaalses (SA) ja atrioventrikulaarses (AV) sõlmes [37, 38]. Nende rakkude puhkepotentsiaal on oluliselt vähem negatiivne – ligikaudu  $-50$  kuni  $-60$  mV –, millest tulenevalt on naatriumkanalid inaktiveeritud ega osale depolarisatsioonis [37, 40].

Selle asemel vahendavad depolarisatsiooni kolm voolukomponenti: (1) *funny current* ( $I_f$ ) HCN-kanalite kaudu, mis aktiveerub hüperpolarisatsioonil ja kannab sissepoole suunatud  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  voolu, algatades spontaanse diastoolse depolarisatsiooni; (2) T-tüüpi kaltsiumikanalid, mis avanevad depolarisatsiooni varajases faasis; ning (3) L-tüüpi kaltsiumikanalid, mis käivitavad lõpliku kiire depolarisatsioonilaine (faas 0) [24, 37, 41]. Kuna puudub kiire naatriumivool, on aeglase aktsioonipotentsiaali tõusukiirus ( $\sim 1$ – $10$  V/s) oluliselt väiksem kui kiire AP puhul ( $\sim 200$ – $400$  V/s) [37].

Pärast depolarisatsiooni toimub aeglane repolarisatsioon, mis kulgeb faasist 0 faasi 3, ilma selge platoo-faasita (joonis 6). Faas 4 ei ole stabiilne, vaid kujutab spontaanset diastoolset depolarisatsiooni, mille kiirus määrab rütmiseadja sageduse ning mida ise moduleerivad autonoomne närvisüsteem ja hormoonid [24, 25].

## 2.1.6 Elektro-mehaaniline sidestus

Südamelihasraku kokkutõmbumise molekulaarne alus on kaltsiumist sõltuv kaltsiumivabamine, CICR, mis seob membraani elektrilise aktiivsuse mehaanilise kontraktsiooniga [3,



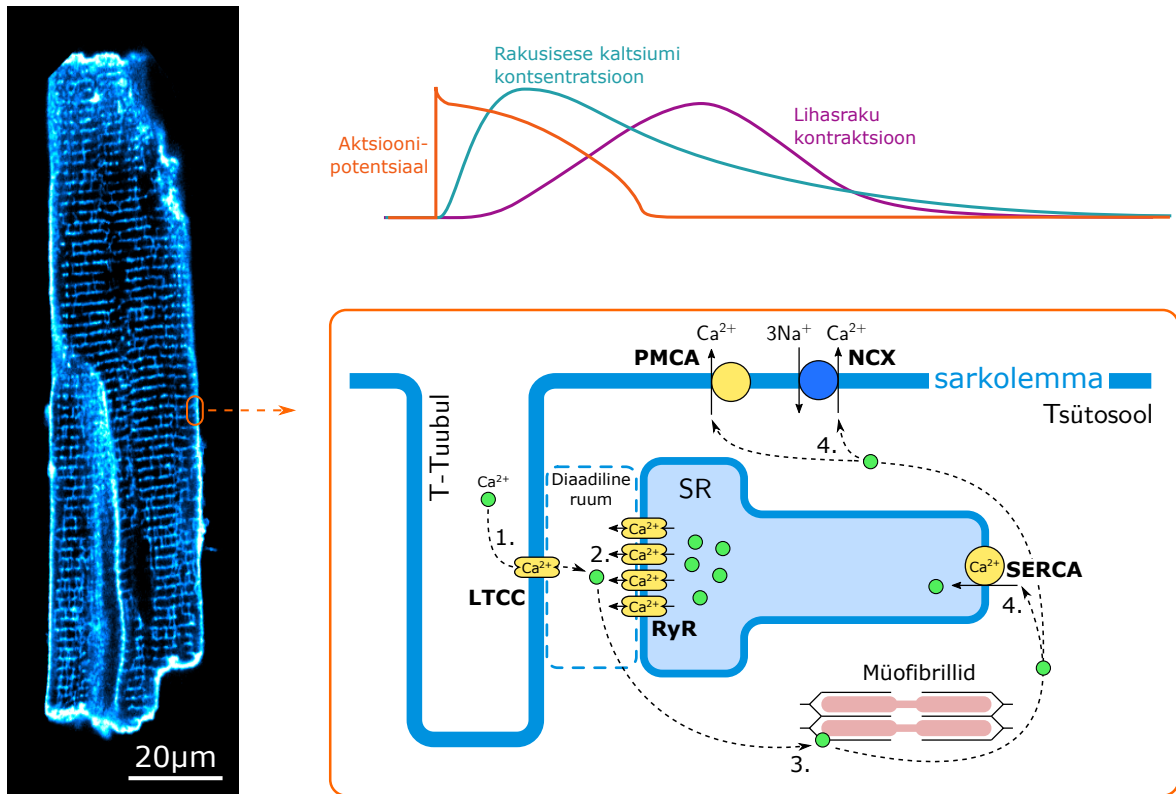
**Joonis 6: Kiire ja aeglase aktsioonipotentsiaali võrdlus.** (A) Kiire aktsioonipotentsiaal atriaalsetes, ventrikulaarsetes või Purkinje rakkudes: puhkepotentsiaal on ligikaudu  $-90$  mV, faas 0 on järsk (kiire  $\text{Na}^+$  vool), platoo-faas (2) on selgelt eristatav ning efektiivne refraktsiooniperiood (c–d) eelneb suhtelisele refraktsiooniperioodile (d–e). (B) Aeglane aktsioonipotentsiaal SA- või AV-sõlmes: puhkepotentsiaal on vähem negatiivne ( $\sim -55$  mV), faas 0 on lauge (L-tüüpi kaltsiumi vool), faas 1 puudub ning refraktsiooniperiood ulatub kaugemale faasi 4, kus toimub spontaanne diastoolne depolarisatsioon [37].

43]. Selle protsessi käivitavad L-tüüpi kaltsiumikanalid ( $\text{Ca}_V1.2$ ), mis paiknevad sarkolemaalse T-tuubulite membraanis, mis viivad signaali rakusisese SR-i lähedusse [3, 44]. Aktsioonipotentsiaali platoo-faasis avanevad L-tüüpi kanalid ning võimaldavad väikese, kuid funktsionaalselt olulise kaltsiumi voo tsütosooli. L-tüüpi kanaleid iseloomustab kõrge aktivatsioonilävepinge ( $\sim -30$  mV), aeglane inaktivatsiooni kineetika ning pikk avatud olek. Need omadused eristavad neid lühemat aktsioonipotentsiaali tekitavatest T-tüüpi kanalitest, mis on domineerivad SA-sõlme rütmiseadja-rakkudes [44, 45].

Elektro-mehaaniline sidestus (*excitation-contraction coupling*, ECC) on mehhanism, mis seob raku elektrilise ergastuse mehaanilise kontraktsiooniga rakusisese kaltsiumi kontsentratsiooni muutuste kaudu [3, 43]. ECC kulgeb järgmiste sammudena. Aktsioonipotentsiaal levib mööda sarkolemat ja T-tuubulite kaudu raku sügavusse, depolariseerides membraani ning avades L-tüüpi kaltsiumikanalid. Väike kogus kaltsiumi siseneb raku, mis ei ole piisav kontraktsiooni käivitamiseks, kuid aktiveerib SR-i pinnal paiknevad rüanodiinireseptorid (RyR2) [3, 46]. rüanodiinireseptorid vabastavad seejärel SR-ist suure kaltsiumi koguse tsütosooli. Kaltsiumi kontsentratsioon tõuseb puhkeoleku  $\sim 100$  nmol/l tasemelt kuni  $\sim 1$   $\mu\text{mol/l}$ -ni [3, 47].

L-tüüpi kanalite kaudu sisenev kaltsium aktiveerib SR-i membraanis paiknevaid rüanodiinireseptoreid (RyR2), mis vabastavad SR-ist suure kaltsiumi koguse tsütosooli. Antud fenomeni nimetatakse tihti amplifikatsiooniprotsessiks ning on tuntakse pareimini kaltsiumisädeme nime all [3, 46]. SR on kardiomüotsüütides peamine intratsellulaarne kaltsiumi reservuaar ning selle täituvusaste määrab otseselt, kui palju kaltsiumi on igal kontraktsioonil saadaval ja see omakorda reguleerib kontraktsiooni jõudu [3, 48].

Vaba kaltsium seondub troponiin-C-ga, mis vallandab konformatsioonimuutuse troponiin-I kompleksis, paljastades aktiinifilamentidel müosiini sidumiskohad [3]. Müosiinipead seonduvad aktiiniga ning hüdrolüüsivad ATP-d, põhjustades aktiin- ja müosiinifilamentide üksteisest



**Joonis 7: Elektro-mehaaniline sidestus.** Joonisel üleval paremal on skemaatiline illustratsioon elektro-mehaanilisest sidestusest, mis seob omavahel aktsioonipotentsiaali, kaltsiumi kontsentratsiooni muutuse ja kontraktsiooni. Vasak paneel näitab ühe südameraku konfokaalset kujutist, millel on värvitud sarkolemma koos rakku sissetungivate membraanitorukestega ehk T-tuubulitega. Parem alumine paneel kirjeldab ECC sündmuste jada makroskoopilisel tasemel järgnevate etappide kaupa: 1. sarkolemma depolarisatsioon aktsioonipotentsiaali toimel, mis käivitab pingetundliku L-tüüpi kaltsiumikanali (LTCC) avanemise; 2. suurenenud diaadilise kaltsiumi tase aktiveerib RyR2-id SR-i pinnal; 3. sellest tulenev kaltsiumi vabanemine põhjustab raku tsütosoolis kaltsiumi kontsentratsiooni suurenemist, mis omakorda käivitab kontraktsiooni; 4. algab raku lõõgastumine kaltsiumi eemaldamise tõttu SR-i sarkoplasmaatilise/endoplasmaatilise retikulumi kaltsiumi ATPaasi (SERCA), naatrium-kaltsiumivaheti (NCX1) ja plasmamembraani kaltsiumi ATPaasi (PMCA) poolt [3, 42].

mööda libisemise, ehk sarkomeer lüheneb ja raku toimub kontraktsioon [3].

SR-i kaltsiumi laadimist tagab SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaas (SERCA2a), mida reguleerib väike inhibitoorne valk fosfolambaani (PLN) [49].  $\beta$ -adrenergilise stimulatsiooni korral (nt adrenaliin) fosforüülib proteiinkinaas A (PKA) nii fosfolambaani kui ka L-tüüpi kanaleid: fosfolambaani fosforüülvamine eemaldab SERCA2a inhibitsiooni, kiirendades kaltsiumi üles võttu tagasi SR-i, ning L-tüüpi kanalite fosforüülvamine suurendab kaltsiumi sissevoolu [50]. Mõlemad efektid tugevdavad järgmist kontraktsiooni tsüklit ja kiirendavad relaksatsiooni [3, 49].

Relaksatsioon toimub kaltsiumi aktiivse eemaldamise kaudu tsütosoolist, peamiselt SERCA2a ja NCX1 vahendusel, mille tulemusel kaltsiumi kontsentratsioon langeb. Kaltsium eraldub troponiin-C-st ning aktiin-müosiini sild laguneb [3]. Sarkomeeri algne pikkus taastub ning müofibrillide ahel, mis katab 50–60% raku mahust, tagab efektiivse mehaanilise töö [51]. Kogu ECC tsükli energeetikat toetavad mitokondrid, mis paiknevad müofilamentide vahel ning moodustavad 30–40% raku mahust, tarnides ~80% südamelihase ATP vajadusest [51, 52].

### 2.1.7 Kofeiin ja süda

**Kofeiini lühike ajalugu meditsiinis** Kofeiin on maailmas enim tarbitav psühhoaktiivne aine: hinnanguliselt tarbib seda enam kui 80% maailma täiskasvanutest, peamiselt kohvi, tee, energiajookide ja karastusjooji kujul [53, 54]. Kofeiini esimene dokumenteeritud teaduslik uurimine pärineb 19. sajandi algusest, kui Friedlieb Ferdinand Runge isoleeris selle 1819. aastal kohvist [53]. 20. sajandi esimesel poolel kasutati kofeiini kliinilises meditsiinis aktiivselt bronhodilataatorina, diureetikumina ning vererõhulanguse korral südame veresoonkonda stimuleeriva ainenä [54].

Kofeiini kardiovaskulaarsete mõjude teaduslik uurimine hoogustus oluliselt 20. sajandi teisel poolel, kui selgus, et kofeiin toimib adenosiniinireseptorite antagonistina [53]. Sellest ajast peale on avaldatud tuhandeid uuringuid kofeiini mõju kohta südame rütmile, vererõhule, müokardi kontraktiilsusele ning arütmiate riskile. Vaatamata ulatuslikule uurimistööle on mitmed kofeiini mõjud – eriti seoses arütmiate, südamepuudulikkuse ja vererõhuga – siiani vaidlusalused ning erinevad uuringud annavad kohati vastuolulisi tulemusi [55, 56]. Seda vaidlust peegeldab hästi Palatini et al. 2009. aasta ülevaateartikkel *Journal of Hypertension*'is, mis järeldas, et kofeiini krooniline tarbimine ei ole iseenesest üheselt seotud kõrgeenenud kardiovaskulaarse riskiga, kuid rõhutas, et mõju on tugevalt genotüübisõltulik, eriti CYP1A2 ensüümi polümorfism määrab kofeiini metabolismi kiiruse ning sellest tuleneva riskiprofiili [55].

**Kofeiini mehhanismid makrotasandil** Kofeiini peamine toimimismehhanism on adenosiniinireseptorite ( $A_1$  ja  $A_{2A}$ ) kompetitiivne antagonism [53]. Adenosiin on endogeenne neuromodulaator, mis puhkeolekus avaldab negatiivseid kronotroopseid (südamelöögisagedust aeglustav) ja dromotroopseid (AV-juhtivust pidurdav) toimeid, samuti vähendab müokardi hapnikutarvet ja soodustab vasodilatatsiooni [53, 54]. Kofeiini blokeerides neid retseptoreid tõuseb süda löögisagedus, paraneb AV-juhtivus ja suureneb müokardi kontraktiilsus – need toimed on sarnased sümpaatilise aktivatsiooniga, ent toimivad erineva mehhanismi kaudu [53, 54].

Möödukates annustes (kuni 400 mg päevas ehk ligikaudu 3–4 tassi kohvi) on kofeiini mõju kardiovaskulaarsüsteemile enamikul inimestel mööduv ning ei ole seostatud krooniliselt suurenenud südame-veresoonkonnahaiguste riskiga [54, 55]. Vastupidiselt levinud arvamusele on mitmed suured epidemioloogilised uuringud näidanud, et möödukas kohvitarbimine on seostatud *madalama* kodade virvendusarütmia (KVA) riskiga [56]. Cheng et al. 2014. aasta metaanalüüs, mis hõlmas üle 228 000 osaleja, leidis, et iga lisanduv tass kohvi päevas on seostatud KVA riski 6% langusega [56]. Samas on suurtes annustes ja eriti tundlikel inimestel (nt hüpertoonia, südame rütmihäired) kofeiini tarbimine seotud vererõhu ajutise tõusu ja palpitationskaebustega [55].

**Kofeiini toimemehhanismid rakutasandil** Rakutasandil avaldab kofeiin südamele kaht peamist toimet, mis sõltuvad kontsentratsioonist ja vaadeldavast rakutüübist. Esimene toime on fosfodiesterasaaside inhibeerimine, mis takistab tsüklilise adenosiinmonofosfaadi (cAMP) lagunemist [3, 53]. cAMP kuhjumine aktiveerib PKA, mis fosforüülib L-tüüpi kaltsiumikana-

leid, RyR2-e ja fosfolambaani, mille tulemuseks on suurem kaltsiumivoog L-tüüpi kanalite kaudu, suurem SR-i kaltsiumi maht ning kiirem kaltsiumi tagasivoog SERCA2a poolt. See protsess on analoogne  $\beta$ -adrenergilise stimulatsiooniga ning selgitab kofeiini positiivset inotropset toimet [3].

Teine, eriti oluline toime kõrgemates kontsentratsioonides ( $>1$  mmol/l *in vitro*) on rüanodii-niretseptorite otsene tundlikumaks muutmine. Kofeiin alandab RyR2 kaltsiumi aktivatsiooni-läve, põhjustades SR-i kaltsiumi vabanemise ka L-tüüpi kanalite eelneva aktivatsioonita [3, 5]. See omadus teeb kofeiinist väärtusliku laboratoorse tööriista: kiire kofeiini (20 mmol/l) rakendamine vabastab SR-ist kogu selles ladustatud kaltsiumi korraga, ning tekkev NCX1 vahendatud vooluamplituud korreleerub otseselt SR-i eelneva kaltsiumi täituvusastmega [3, 57].

Kontrollimatu kaltsiumi vabanemine SR-ist võib siiski olla ka arütmogeenne: rüanodii-niretseptorite üleaktiveerimisest tekivad spontaansed kaltsiumi lained põhjustavad membraani järeldepolarisatsioone (DAD, *delayed afterdepolarizations*), mis võivad käivitada vatsakeste tahhüarütmiaid [58]. Seda efekti on täheldatud eriti katehoolamiinergiline polümorfset vent-rikulaarset tahhükardiat (CPVT) põhjustavate RyR2 mutatsioonide korral, kus kofeiin võib olla provotseeriv faktor [58].

### 2.1.8 Südame elektrofüsioloogia uurimismeetodid

Südame elektrofüsioloogilisi nähtusi uuritakse mitmel tasandil, alates tervest organist, lõpe-tades üksiku ionikanali uurimisega. Iga tasand eeldab erinevat eksperimentaalset metoo-dikat. Meetodite mõistmine on oluline nii eksperimentaalsete andmete tõlgendamisel kui ka matemaatiliste mudelite parametrizeerimisel ja valideerimisel. Erinevad meetodid võimalda-vad uurida südame elektrilist aktiivsust erineva ruumilise ja ajalise lahutusega ning ükski neist ei anna iseseisvalt täielikku pilti südame tööst.

**Makroskoopilised meetodid.** Kliinilises praktikas kasutatakse südame elektrilise aktiivsu-se uurimiseks elektrokardiograafiat (EKG), mis registreerib nahaelektroodide kaudu südame ionivoolude summaarset elektrivälja kehapinnal [13]. EKG võimaldab tuvastada rütmihäi-reid, elektrilisi juhtivushäireid ja isheemilisi muutusi, kuid annab vaid kaudset informatsiooni üksikute rakkude või ionikanalite tasandil toimuvate protsesside kohta [13]. Meetodi peami-ne eelis seisneb selle mitteinvasiivsuses ja kõrges ajalises lahutuses, kuid ruumiline lahutus jääb piiratuks [41, 59].

Invasiivsemaks lähenemiseks on elektrofüsioloogiline südameuuring, mille käigus viiakse kateetrid veresoonte kaudu südame õõntesse, registreeritakse lokaalne elektriline aktiivsus ning provotseeritakse ja kaardistatakse arütmiaid [59]. Võrreldes pindmise EKG-ga võimal-dab see meetod täpsemalt lokaliseerida arütmiate tekkekohti südamesiseselt. Samas ei an-na ka see meetod otsest teavet rakusisese  $Ca^{2+}$  dünaamika ega üksikute ionikanalite käi-tumise kohta.

Koe ja terve südame tasandil kasutatakse ka optilist kaardistamist (*optical mapping*), mille korral mõõdetakse pinge- või kaltsiumitundlike fluorestsentsvärvide abil elektrilise aktivatsiooni levikut südame pinnal. Meetod võimaldab suure ruumilise lahutusega uurida voole ja

arütmiate tekkimist, ühendades makroskoopilise elektrilise aktiivsuse rakutasandil kaltsiumi signalisatsiooniga [60].

**Rakutasandi meetod: membraanilapikese meetod** Üksikute rakkude elektrofüsioloogiliseks uurimiseks on kujunenud kuldstandardiks *patch clamp* ehk membraanilapikese meetod [61, 62]. Meetodi kontseptuaalne alus pärineb Kenneth Cole'i töödest, kes kasutas 1940. aastatel pinget fikseerivat (*voltage clamp*) tehnikat hiidkalmaari aksonitel, võimaldades esmakordselt ioonvoole kontrollitud membraanipotentsiaali tingimustes mõõta [62]. Erwin Neher ja Bert Sakmann täiustasid meetodit 1976. aastal, luues gigaoomlise tihendi (*gigaseal*) klaasmikropipeti ja rakumembraani vahel, mis võimaldas registreerida isegi üksikute ioonikanalite pikoampriseid voole [61]. Selle töö eest pärjati Neher ja Sakmann 1991. aastal Nobeli füsioloogia- ja meditsiiniauhinnaga [61].

Membraanilapikese meetodit kasutatakse mitmes konfiguratsioonis. *Cell-attached* konfiguratsioon võimaldab mõõta üksikute kanalite aktiivsust tervet rakku kahjustamata. *Whole-cell* konfiguratsioonis purustatakse membraanilapike, võimaldades mõõta kogu raku ioonvoole ja kontrollida rakusisest keskkonda. *Inside-out* ja *outside-out* konfiguratsioonid võimaldavad uurida membraanikanalite regulatsiooni rakusisestel või rakuvälistel tingimustel isoleeritud membraanilapil [61, 62].

Meetodi peamine tugevus seisneb selle väga kõrges ajalises lahutuses ja võimes mõõta otsest membraanivoolusid. Samas on *whole-cell* konfiguratsiooni oluliseks piiranguks asjaolu, et pipetilahus asendab osaliselt tsütoplasmat ning võib lahjendada endogeenseid puhvreid ja muuta  $Ca^{2+}$  signalisatsiooni dünaamikat [3]. Lisaks on meetod tehniliselt keerukas, töömahukas ning kaasneb risk rakupreparaadi kahjustamiseks.

**Optilised ja raku terviklikkust säilitavad meetodid** membraanilapikese meetodi piirangute ületamiseks on välja töötatud optilised meetodid, mis võimaldavad uurida rakusisest  $Ca^{2+}$  signalisatsiooni ilma rakumembraani mehaaniliselt kahjustamata. Fluorestsentsmikroskoopia koos kaltsiumitundlike indikaatoritega, nagu fluo-4 ja indo-1, võimaldab reaalsajas visualiseerida tsütoplasmaatilise  $Ca^{2+}$  kontsentratsiooni muutusi tervetes rakkudes [46].

Konfokaal-mikroskoopia võimaldab suure ruumilise lahutusega registreerida isegi üksikuid kaltsiumisädemeid (*Ca<sup>2+</sup> sparks*), mis peegeldavad RyR2 kanalite lokaalset aktivatsiooni [46]. Võrreldes membraanilapikese meetodiga säilitavad optilised meetodid paremini raku füsioloogilise seisundi ning sobivad eriti hästi SR-i  $Ca^{2+}$  sisalduse, RyR2 aktiivsuse ja  $Ca^{2+}$  lainelevi uurimiseks [3]. Samas on nende ajaline lahutus üldiselt madalam kui membraanilapikese meetodil ning mõõtmise on sageli kaudne, kuna fluorestsentsisignaali sõltub kasutatavast indikaatorist ja selle kineetikast [46, 63].

**Meetodite kokkuvõte** Käesolevas töös kasutati  $Ca^{2+}$  signalisatsiooni uurimiseks fluorestsentsmikroskoopiat, mis võimaldab jälgida rakusisese  $Ca^{2+}$  dünaamikat tervetes rakkudes ilma membraani mehaanilise häirimiseta. Valitud meetod sobib eriti hästi RyR2 vahendatud spontaanse  $Ca^{2+}$  vabanemise ja SR-i  $Ca^{2+}$  käsitluse uurimiseks füsioloogiliselt lähedastes tingimustes.

## 2.2 Elektrofüsioloogia modelleerimine

### 2.2.1 Matemaatiliste mudelite vajadus

Südame kaltsiumivoogude uurimine ainult eksperimentaalsete meetoditega on piiratud mitmel põhjusel. Üksiku raku mõõtmised annavad küll täpset teavet üksikute voolude kohta, kuid ionikanalite ja pumpade käitumine ei ole üksteisest eraldatud ning nende omavahelised interaktsioonid on oma olemuselt mittelineaarse dünaamikaga. Teisisõnu, üksikute komponentide andmetest on keeruline ekstrapoleerida kogu raku käitumist [64, 65]. Lisaks muutub süsteemi käitumine kvalitatiivselt skaleerides rakutasandilt kõrgematele tasanditele, kuna ilmnevad uued eneseorganiseerumisel põhinevad käitumismustrid ning väliste faktorite mõju kasvab [64]. Matemaatilised mudelid võimaldavad uurida parameetrite mõju kontrollitud tingimustes ning siduda eksperimentaalsed andmepunktid terviklikuks mehhanistikuks raamistikuks [66]. Käesolevas töös kasutatav modelleerimisstrateegia on sellest põhimõttest tuletatud: eksperimentaalsed  $\text{Ca}^{2+}$  mõõtmised on sisendid mudeli täiendamiseks.

### 2.2.2 Ioonvoolude matemaatiline kirjeldus

Elektrofüsioloogiliste mudelite aluseks on ioonvoolude kirjeldamine elektrokeemiliste gradientide abil. Kõige aluseks saab võtta Nernsti võrrandi, mis kirjeldabiooni  $x$  tasakaalupotentsiaali:

$$E_x = \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{[x]_o}{[x]_i} \right) \quad (1)$$

kus  $R$  on universaalne gaasikonstant,  $T$  temperatuur Kelvinites,  $z$  iooni valentsus,  $F$  Faraday konstant ning  $[x]_o$  ja  $[x]_i$  on vastavalt raku välis- ja sisemine kontsentratsioon [64]. Nernsti võrrand kirjeldab tasakaaluseisundit ühe iooni jaoks, kuid reaalses rakkudes liiguvad samaaegselt mitmed ioonid läbi poolläbilaskvate membraanide. Selleks laiendatakse Nernsti käsitlust Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) membraanipotentsiaali võrrandiga, mis arvestab  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ja  $\text{Cl}^-$  samaaegset läbilaskvust ning membraanipotentsiaali mõju igale ioonivoolule [66, 67, 68]:

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \left( \frac{P_K[\text{K}^+]_o + P_{\text{Na}}[\text{Na}^+]_o + P_{\text{Cl}}[\text{Cl}^-]_i}{P_K[\text{K}^+]_i + P_{\text{Na}}[\text{Na}^+]_i + P_{\text{Cl}}[\text{Cl}^-]_o} \right) \quad (2)$$

kus  $P_K$ ,  $P_{\text{Na}}$  ja  $P_{\text{Cl}}$  on vastavate ionide membraanläbilaskvused [67, 68]. GHK võrrand on paljudes tänapäevastes südamedudelites alusvalemiks ionikanalite voolude kirjeldamisel, sh Pandit–Terkildsen roti ventrikulaarse mudeli kaltsiumi käsitluses [7, 69].

Nernsti võrrandi peamine piirang on selle kehtivus vaid tasakaaluseisundis: voolu läbimisel muutub ionide efektiivne kontsentratsioon membraani lähedal ning võrrand muutub ebatäpseks [66].

### 2.2.3 Raku membraan kui elektriabel: Hodgkin-Huxley raamistik

Rakumembraani elektrilist käitumist on alates Hodgkin ja Huxley (HH) 1952. aasta teedrajavaast tööst modelleeritud elektriabelana [70]. Selles käsitluses kujutatakse membraani mah-

tuvust  $C_m$  kondensaatorina ning iga ionikanal on paralleelne takisti koos pinge allikaga. Seega, kogu transmembraanne vool jaguneb mahtuvusvooks ja ioonvoogudeks:

$$I_{tot} = C_m \frac{dV}{dt} + \sum_i I_i \quad (3)$$

kus  $I_i$  tähistab üksikuid ionikanalite voole [70]. Hodgkin-Huxley mudel kirjeldas esmakordselt kvantitatiivset seost membraanipotentsiaali ja ionikanalite aktivatsiooni-inaktivatsiooni kineetika vahel, kasutades diferentsiaalvõrrandite süsteemi [70]. See kontseptuaalne raamistik, kus membraan on kui elektriabel, kanalid kui muutuvad takistid, on tänaseni kõigi südame elektrofüsioloogia mudelite alus.

#### 2.2.4 Südame elektrofüsioloogia mudelite areng

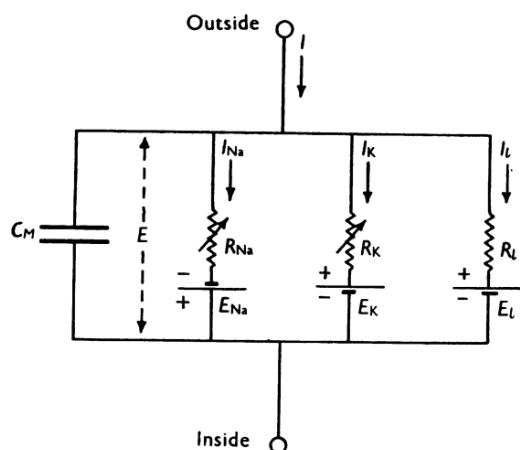
Hodgkin-Huxley raamistiku rakendamine südamele jätkus Denis Noble'i 1962. aasta tööga, kus Hodgkin-Huxley (HH) võrrandeid kohandati Purkinje fiibrise aktsioonipotentsiaali modelleerimiseks, kirjeldades esmakordselt südame iseloomulikku platoo faasi [40]. Noble'i mudeli loogiliseks edasiarenduseks oli McAllisteri, Noble'i ja Tsieni (MNT) 1975. aasta mudel, mis rakendas vahepeal arenenud eksperimentaalseid meetodeid ning kirjeldas Purkinje fiibrise aktsioonipotentsiaali täiendavate ionikanalite kineetikaga [71]. MNT mudeli peamine piirang oli see, et see suutis kirjeldada vaid membraani aktsioonipotentsiaale, jättes välja rakusise ioonidünaamika ja pumbad. Esimese ventrikulaarse kardiomüotsüüdi mudeli lõi Beeler ja Reuter 1977. aastal, lisades kaltsiumivoolu kirjelduse [72]. Selle lünga, rakusise ioonidünaamika puudumise, täitis DiFrancesco ja Noble'i 1985. aasta mudel, mis lisas esmakordselt ioonipumbad ja rakusise  $Ca^{2+}$  kontsentratsiooni muutused südame elektrofüsioloogia mudelitesse [73]. DiFrancesco ja Noble näitasid, et NCX1 ja kaltsiumist sõltuvad voolud täidavad dünaamilist rolli repolarisatsioonis, mitte ainult passiivset rolli nagu varem arvati ning et repolarisatsiooniprotsess on paratamatult seotud müokardi inotroopse seisundiga [73]. See oli tollal revolutsiooniline ning lõi aluse kõigile järgnevatele rakusisest kaltsiumidünaamikat kaasavatele mudelitele.

Järgnes oluline areng Luo ja Rudy poolt 1991. ja 1994. aastal, kes laiendasid mudelit täiendavate ionikanalite kineetikaga ning lisasid rakusise  $Ca^{2+}$  dünaamika, sh SR-i täitmise ja vabanemise. Need mudelid suutsid kirjeldada mitte ainult aktsioonipotentsiaali kuju, vaid ka kaltsiumi transienti ning selle seost kontraktsiooniga [74, 75].

#### 2.2.5 Roti kardiomüotsüüdi mudelid: Pandit ja Terkildsen

Roti ventrikulaarse kardiomüotsüüdi modelleerimiseks lõi Pandit, Clark, Giles ja Demir 2001. aastal matemaatilise mudeli, mis kirjeldas roti vasaku vatsakese rakkude aktsioonipotentsiaali ning parametrizeeriti rottide eksperimentaalsete elektrofüsioloogiliste andmete põhjal [69].

Terkildsen, Niederer, Crampin, Hunter ja Smith integreerisid 2008. aastal Pandit et al. elektrofüsioloogilise mudeli koos Hinch et al. kaltsiumidünaamika mudeliga ja Niederer & Smith mehaanikamudeliga ühtseks Pandit-Hinch-Niederer (PHN) mudeliks, kasutades selleks CellML



**Joonis 8: Rakumembraan kui elektrihael.** Hodgkin-Huxley membraanimudeli vooluahel, kus membraani mahutuvust kujutab kondensaator  $C_M$  ning iga ioonvoolu teekond on esitatud paralleelse haruna, mis koosneb muutuvas takistist ( $R_{Na}$ ,  $R_K$ ,  $R_l$ ) ja pingeallikast ( $E_{Na}$ ,  $E_K$ ,  $E_l$ ). Naatriumi ja kaaliumi takistused varieeruvad ajas ning sõltuvalt membraanipotentsiaalidest, lekkevoolu takisti  $R_l$  on konstantne. Võetud Hodgkin ja Huxley originaalartiklist [70].

1.1 standardit [7]. PHN mudel kirjeldab terviklikult roti kardiomüotsüüdi elektromehhaanikat: elektrilisest aktivatsioonist kuni aktiivse jõu genereerimiseni. Lisaks korrigeeris Terkildsen et al. Panditi originaalvõrrandites esinenud ebatäpsusi, mis parandasid mudeli kvantitatiivset kooskõla eksperimentaalse andmestikuga [7]. Käesolevas magistritöös kasutatakse just seda PHN mudelit lähtepunktina, ning seda täiendatakse kofeiini protokolliga ja parametriseeritakse vastavalt eksperimentaalsete kaltsiumi mõõtmistega.

## 3 Metoodika

### 3.1 Mudelivalik

Rakusise kaltsiumi dünaamika täpne kirjeldamine on keskse tähtsusega ventrikulaarsete kardiomyotsüütide elektro-mehaanilise sidestuse (ECC) mõistmisel. Kuna elektriline aktiivsus, kaltsiumi dünaamika ja mehaaniline kontraktsioon on tihedalt põimunud, peab arvutuslik mudel hõlmama võimalusel kõiki kolme alamsüsteemi ning kirjeldama nende vahelisi seoseid [6]. Sobiva mudeli leidmiseks hinnati kolme kandidaati.

**Bondarenko (2004).** Bondarenko mudel kujutab endast detailset rekonstruktsiooni hiire ventrikulaarse kardiomyotsüüdi aktsioonipotentsiaalset, mis koosneb 67 diferentsiaalvõrrandist ning on valideeritud hiire ventrikulaarsete kardiomyotsüütide eksperimentaalsete andmete alusel [76]. Mudeli peamiseks puudujäägiks on SR-i  $\text{Ca}^{2+}$  vabanemise fenomenoloogiline käsitus: vabanemine on skaleeritud otseselt  $I_{\text{CaL}}$  järgi modulatsiooniteguriga  $P_{\text{RyR}}$ , ilma lokaalse CaRU düaadse dünaamikata ning gradueeritud  $\text{Ca}^{2+}$  vabanemiseta [77]. Lisaks puudub dünaamiline müofilamentide  $\text{Ca}^{2+}$  puhverdus, kus troponiin ja kalmoduliin on fikseeritud puhvritena ning kontraktsioonimudel puudub [78], mis muudab mudeli antud juhul mitte sobivaks.

**Pandit (2001).** Pandit jt [69] mudel kirjeldab täpselt roti vasaku vatsakese transmuraalset aktsioonipotentsiaali heterogeensust, kuid  $\text{Ca}^{2+}$  käsitlussüsteem ning  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  mudel pärinevad valdavalt koera ja merisea andmetest, mitte rotilt [7]. Lisaks puudub gradueeritud  $\text{Ca}^{2+}$  vabanemine: SR-i vabanemine ei sõltu kohalikust düaadsest  $\text{Ca}^{2+}$  kontsentratsioonist [69], ning müofilamentide dünaamiline  $\text{Ca}^{2+}$  sidumine on samuti puudu.

**Terkildsen (2008) – valitud mudel.** Terkildsen jt [7] integreeritud mudel ühendab Panditi elektrofüsioloogia [69] Hinchy CaRU raamistikuga [79] ning Niederer jt müofilamentide kontraktsioonimudeli [78] ühtseks ODE-süsteemiks, lahendades mõlema eelmise mudeli põhipuudused: (1) CICR kirjeldatakse läbi lokaalse CaRU düaadse dünaamika; (2) RyR2 värvamehhanism tuleneb Markov-ahela kineetikast; ning (3) troponiin C toimib dünaamilise kaltsiumi puhvrina. Originaalmudel sisaldab endas 22 harilikku diferentsiaalvõrrandit ning 106 algebrailist seost, moodustades 128 võrrandist ja 93 parameetrist koosneva süsteemi [7]. Käesolevas töös laiendati mudelit kofeiini toimemehhanismiga (§3.6) ning FCa puhverduse kirjeldusega. Originaalmudeli 22 diferentsiaalvõrrandit ja 106 algebrailist seost jäid struktuurilt muutmata, välja arvatud neli RyR2 üleminekukiirust ( $\mu_{\text{poc}}, \mu_{\text{pcc}}, \beta_{\text{poc}}, \beta_{\text{pcc}}$ ), mida täiendati kofeiinivõrranditega (§3.6). Lisaks lisati üks uus seisundimuutuja FCa fluorestseeruva indikaatori modelleerimiseks, viies harilike diferentsiaalvõrrandite arvu 23-ni, ning kokku lisati 7 uut parameetrit, viies parameetrite koguarvu 100-ni. Samuti sisaldab mudel ka mitmeid abivalemeid ja teisendusvalemeid.

### 3.2 Eksperimentaalne andmeallikas

Simulatsiooni valideerimises kasutati ventrikulaarsetest kardiomyotsüütidest mõõdetud kaltsiumi transiendi andmeid. Rakud isoleeriti roti südamest ning permeabiliseeriti mehaanili-

selt. Rakusisese  $\text{Ca}^{2+}$  dünaamika jälgimiseks kasutati fluorestseeruvat indikaatorit Fluo-4. Mõõtmised hõlmasid perioodilist elektrilist stimulatsiooni püsirežiimi saavutamiseks, millele järgnes kofeiini lisamine, et vaadelda sarkoplasmaatilise retiikuumumi täituvustaset ning tühjenemist [8].

### 3.3 Stimulatsioonisageduse valik

Käesolevas töös kasutatud eksperimendid viidi läbi toatemperatuuril (ligikaudu  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Isoleeritud kardiomüotsüütidel lüheneb eluvõimeline katseaeg märkimisväärselt füsioloogilisel temperatuuril ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), mistõttu raku-uuringuid tehakse üldjuhul madalama temperatuuri juures [80]. Madalama temperatuuri tagajärjel aeglustub SR-i  $\text{Ca}^{2+}$  tsükli kineetika, mis nihutab stabiilse stimulatsiooni ajavahemikku pikema perioodi suunas ning muudab 1 Hz sageduse sobivamaks nende tingimuste jaoks.

Terkildseni PHN-mudel on valideeritud vahemikus 1 kuni 2 Hz [7], mis on kooskõlas isoleeritud rotirakude käitumisega toatemperatuuril. Kuna mudeli parameetrid on sobitatud nendes katsetingimustesse, kasutati simulatsioonides stimulatsioonisagedust 1 Hz (periood 1000 ms), mis vastab eksperimendi temperatuuritingimustele ning tagab mudeli stabiilse ja tõlgendatava käitumise.

### 3.4 Mudeli implementatsioon

Terkildseni PHN-mudeli diferentsiaalvõrrandite süsteem võeti CellML mudelihoidlast [7] automaatselt masingenereeritud C-koodina [81]. Mudeli väljakutsumise hõlbustamiseks implementeeriti eraldi C-keelne integreerimismoodul (`ode_solver.c`), mis sisaldab RK4 fikseeritud sammuga integraatorit ning liidese funktsioone Pythonist väljakutsumiseks. Pythoni ühtse lahendikeskkonna kaudu oli võimalik valida integraatorite vahel: C-põhine klassikaline Runge-Kutta meetod (RK4) või Pythoni SciPy teegi adaptiivsed meetodid LSODA ja BDF [82].

### 3.5 Numbriline integreerimine

PHN-mudeli diferentsiaalvõrrandite süsteem on jäik (*stiff*), kuna sisaldab protsesse, mille ajaskaalad erinevad mitmeid suurusjärke: aktsioonipotentsiaali kiire depolarisatsioon ja RyR2 üleminekukineetika toimuvad millisekundite skaalal, samas kui SR-i  $\text{Ca}^{2+}$  tasakaalu saavutamine võib võtta sadu stimulatsiooniperioode [6, 7]. Fikseeritud sammuga meetodid, näiteks Runge-Kutta, peavad jäikuse tõttu kasutama äärmiselt väikest sammu kogu integratsiooni vältel, muutes need arvutuslikult ebaefektiivseks [83].

Käesolevas töös võrreldi kolme integraatorit:

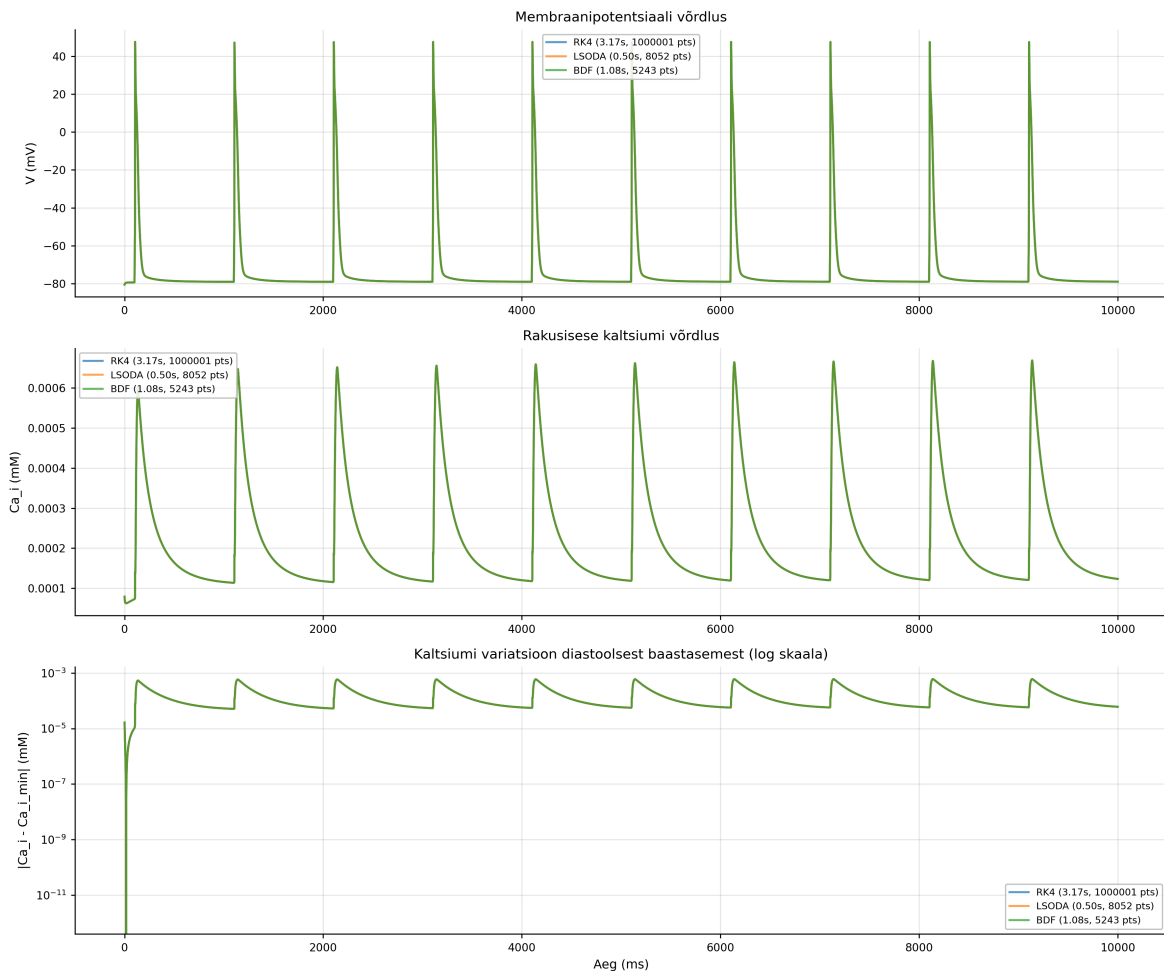
- **RK4** – C-keeles implementeeritud fikseeritud sammuga neljandat järku Runge-Kutta, sammuga  $\Delta t = 0,01\text{ ms}$  [83];
- **LSODA** (*Livermore Solver for Ordinary Differential Equations with Automatic stiffness detection*) – adaptiivselt sammu ja meetodit vahetav integraator, mis lülitub automaatselt Adamsi mittejäiga ja BDF jäiga meetodi vahel vastavalt lokaalsele jäikusele [84];

- **BDF (Backward Differentiation Formula)** – mitmesammuline meetod, mis on spetsiaalselt jäikade süsteemide jaoks mõeldud [83].

Kõigile SciPy integraatoritele rakendati absoluuttolerants  $\varepsilon_{\text{abs}} = 10^{-6}$  ja relatiivtolerants  $\varepsilon_{\text{rel}} = 10^{-6}$ .

### 3.5.1 Võrdluse tulemused

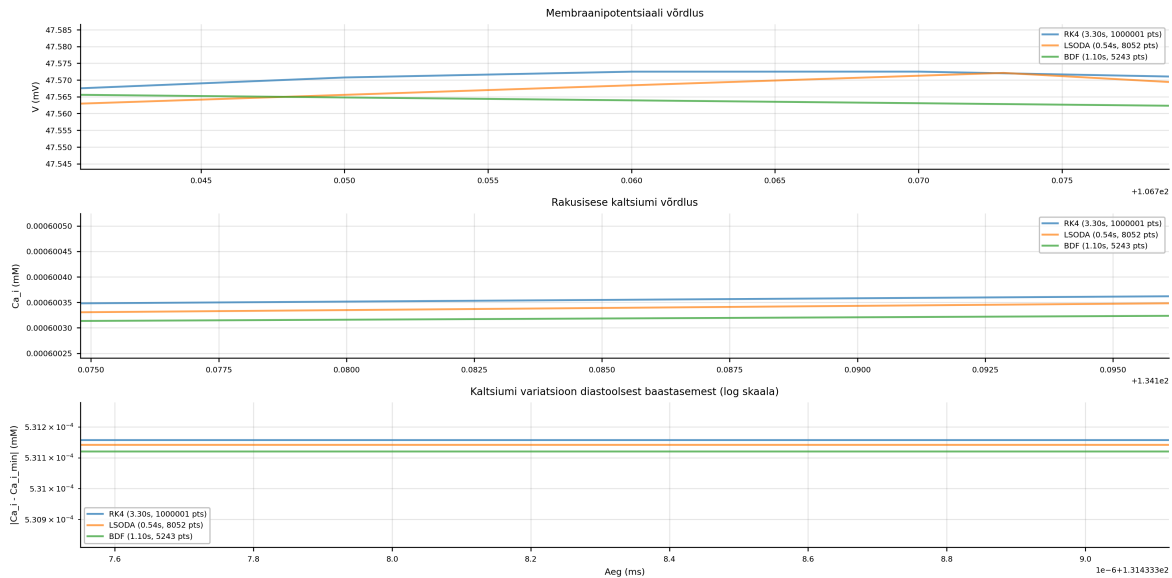
Integraatorite võrdlus viidi läbi 10-sekundilisel simulatsioonil (10 stimulaatsiooniperioodi, 1 Hz). Tulemused on esitatud joonisel 9.



**Joonis 9:** Kolme integraatori – RK4 (sinine,  $\Delta t = 0,01$  ms, 1 000 001 punkti, 3,12 s), LSODA (oranž, 8 052 punkti, 0,56 s) ja BDF (roheline, 5 243 punkti, 1,13 s) – lahendite võrdlus 10-sekundilise simulatsiooni vältel. Ülemine paneel: membraanipotentsiaal  $V(t)$ ; keskmine paneel: tsütosoolne  $\text{Ca}^{2+}$  transient; alumine paneel:  $\text{Ca}^{2+}$  kõrvalekalle diastoolsest miinumist logaritmilisel skaalal. Kõik kolm kõverat kattuvad visuaalselt täielikult, kinnitades lahendi sõltumatust integraatori valikust.

Aktsioonipotentsiaali tipul on integraatorite vaheline erinevus alla 0,02% tipuamplituudist (joonis 10). Kaltsiumi transiendi tipu tasemes on erinevus suurusjärgus  $10^{-7}$ .

Alumise paneeli diastoolses faasis nähtav konstantne nihe saab seletada järgnevalt. Suurus  $[[\text{Ca}^{2+}]_i - [\text{Ca}^{2+}]_{i,\text{min}}]$  arvutatakse iga integraatori oma absoluutse miinimumi suhtes. Kuna kolme meetodi  $\text{Ca}^{2+}$  miinumid erinevad omavahel  $\sim 10^{-7}$  mM tasemel, siis on erinevus olemuslikult ujukomaaritmeetika täpsuse piiri tõttu antud tolerantsitaseme juures. Diastool-



**Joonis 10:** Integraatorite lahendite suurendatud võrdlus aktsioonipotentsiaali tipu (ülemine paneel) ja  $Ca^{2+}$  transiendi tipu ümbruses (keskmine paneel). Alumine paneel näitab  $|[Ca^{2+}]_i - [Ca^{2+}]_{i,min}|$  diastoolse faasis: konstantne nihe  $\sim 10^{-7}$  mM peegeldab iga meetodi absoluutmiinimumi erinevust ujukomaaritmeetikas. See kinnitab meetodite omavahelist kooskõla kuni numeerilise täpsuse piirini.

ses faasis, kus kõikumine on väga väike, domineerib see konstantne nihe ning kõverad näevad välja kui eraldiseisvad horisontaaljooned. Tegemist on visualiseerimise artefaktiga.

### 3.5.2 Efektiivsuse võrdlus

Arvutusliku efektiivsuse seisukohalt on erinevused märkimisväärsed. RK4 vajab  $10^6$  fikseeritud sammu ning arvutuse läbiviimiseks kulub 3,12 s, samal ajal kui LSODA kasutab ainult 8 052 adaptiivset sammu ja on ligikaudu 6 korda kiirem (0,56 s). BDF on LSODA-st aeglasem (1,13 s, 5 243 sammu), kuna süsteem nõuab igal sammul jakobiaani lahendamist. Seega pole RK4 ebasobiv täpsuse, vaid efektiivsuse poolest.

Kuna lahendid on integraatoritest sõltumatud ning LSODA osutus arvutuslikult kõige efektiivsemaks, valiti lõplikuks integraatoriks LSODA tolerantsidega  $\varepsilon_{abs} = 10^{-6}$  ja  $\varepsilon_{rel} = 10^{-6}$ , mis tagab efektiivsuse ja täpsuse vahel mõistliku tasakaalu.

### 3.6 Mudeli täiendused

Terkildseni PHN-mudeli originaalversioon ei sisalda fluorestseeruva kaltsiumiindikaatori dünaamikat ega kofeiini toimet kirjeldavaid võrrandeid. Käesolevas töös lisati mõlemad komponendid, mis on eksperimendi ja simulatsiooni otseseks võrdlemiseks hädavajalikud.

#### 3.6.1 Fluorestseeruva kaltsiumiindikaatori modelleerimine

Eksperimentaalsetes mõõtmistes jälgitakse rakusisest kaltsiumi dünaamikat fluorestseeruva indikaatorvärvi Fluo-4 signaali kaudu. Fluo-4 seondub kaltsiumiga pöörduvalt ning muudab sellega seondudes oma fluorestsentsi intensiivsust. Kuna indikaator ise toimib kaltsiumi puhvrina, muudab selle olemasolu rakus vaba  $Ca^{2+}$  dünaamikat [85]. Selleks, et simuleeritud trajektorid oleksid otseselt võrreldavad mõõdetud FCa signaaliga, lisati mudelisse indikaator

tori seandumisdünaamikat kirjeldav diferentsiaalvõrrand uue olekumuutujana [FCa] (seotud Fluo-4 kontsentratsioon, mM):

$$J_{FCa} = \frac{d[FCa]}{dt} = k_{on} \cdot (F_{tot} - [FCa]) \cdot [Ca^{2+}]_i - k_{off} \cdot [FCa] \quad (4)$$

kus  $F_{tot}$  on Fluo-4 kogukontsentratsioon rakus,  $k_{on}$  ja  $k_{off}$  on seandumise ja lahtiseandumise kiiruskonstant. Kasutatud parameetrid on  $k_{on} = 100 \text{ (mM}\cdot\text{ms)}^{-1}$ ,  $k_{off} = 0,11 \text{ ms}^{-1}$  ning  $F_{tot} = 0,025 \text{ mM}$ .

FCa lisamine muudab kaltsiumi tasakaaluvõrrandit kahel tasandil. Esiteks, efektiivne puhverdukoeffitsient  $\beta_{CMDN}$  (kalmoduliini puhverdukord) muudetakse kombineeritud koeffitsiendiks, mis arvestab mõlemat puhvrit paralleelselt [85]. Kahe sõltumatu puhvri puhul on kombineeritud efektiivne koeffitsient  $\beta_{total}$  määratud kui paralleelsete puhvrite vastupanude summa pöördväärtus:

$$\beta_{total} = \frac{1}{\frac{1}{\beta_{CMDN}} + \frac{k_{on} \cdot (F_{tot} - [FCa])}{k_{off}}} \quad (5)$$

kus kalmoduliini puhverdamise liige on:

$$\beta_{CMDN} = \left( 1 + \frac{k_{CMDN} \cdot B_{CMDN}}{(k_{CMDN} + [Ca^{2+}]_i)^2} \right)^{-1} \quad (6)$$

ning teine liige nimetajas,  $k_{on} \cdot (F_{tot} - [FCa]) / k_{off}$ , väljendab vabade Fluo-4 seandumiskohtade efektiivset tihedust tasakaaluseisundis. Kuna  $\beta_{total} < \beta_{CMDN}$  kehtib alati, aeglustab FCa efektiivne puhver kaltsiumi transiendi tõusu- ja languskiirust.

Teiseks lahutatakse FCa seandumiskiirus otseselt  $[Ca^{2+}]_i$  diferentsiaalvõrrandist:

$$\frac{d[Ca^{2+}]_i}{dt} = \beta_{total} \cdot (J_{RyR} - J_{SERCA} + J_{SR,leak} + J_{TRPN} - J_{membr} - J_{FCa}) \quad (7)$$

kus  $J_{membr}$  koondab kõik  $Ca^{2+}$  voolu läbi sarkolemma ning  $J_{TRPN}$  kirjeldab troponiin-C netto seandumist: positiivne väärtus tähendab kaltsiumi vabanemist troponiin-C-st tsütosooli, negatiivne väärtus  $Ca^{2+}$  seandumist troponiin-C-ga [79]. Seega eemaldatakse Fluo-4-ga seotud kaltsium vabast kaltsiumist enne puhverdukorrigeerimise rakendamist.

Simuleeritud FCa signaal normaliseeriti puhkeoleku väärtuse suhtes:

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{[FCa] - [FCa]_0}{[FCa]_0} \quad (8)$$

mis võimaldab otsest kõrvutamist eksperimentaalse signaaliga sõltumata absoluutkalibratsioonist.

### 3.6.2 RyR2 kofeiini mudeli termodünaamiline tuletuskäik

Kofeiini mõju rüdiiniretseptori kineetikale on modelleeritud termodünaamilistest printsiipidest lähtudes.

**RyR2 kui sidumisprotsess.** RyR2 kanali avanemist kirjeldatakse lihtsustatud keemilise tasakaaluna:



kus  $\text{RyR}^*$  tähistab avatud olekut ja  $n$  on  $\text{Ca}^{2+}$  ionide kooperatiivsus. Massi säilimise seadusest saame avatud oleku tõenäosuse Hill'i funktsiooni [86] kujul:

$$P_{\text{open}} = \frac{[\text{Ca}^{2+}]^n}{[\text{Ca}^{2+}]^n + K_d} \quad (10)$$

**Efektiivne dissotsiatsioonikonstant.** Kofeiini mõjul muutub avatud konformatsioon energiaalt soodsamaks [87], mis väljendub vabaenergia langusena  $\Delta G \rightarrow \Delta G - \Delta G_{\text{caff}}$ . Kuna  $K_d \propto e^{\Delta G/RT}$  [88] ning eeldades lineaarset sõltuvust kontsentratsioonist, mis kehtib väikeste kontsentratsioonide piirkonnas, siis saame efektiivse dissotsiatsioonikonstandi  $\Delta G_{\text{caff}} = \beta_0 c_{\text{caff}}$ . Defineerides  $\alpha_{\text{caff}} \equiv \beta_0/RT$  ning asendades eksponendi Padé lähendiga  $e^{-x} \approx 1/(1+x)$  [89], mis säilitab positiivsuse kogu  $c_{\text{caff}} \geq 0$  piirkonnas, saame:

$$K_d^{\text{eff}} = \frac{K_{\text{RyR}}}{1 + \alpha_{\text{caff}} \cdot c_{\text{caff}}} \quad (11)$$

Parameeter  $\alpha_{\text{caff}} = 6,1 \text{ mM}^{-1}$  vastab vaatlusele, mille kohaselt 10 mM kofeiin nihutab RyR2  $\text{EC}_{50}$ -d (poolmaksimaalset efektiivset kontsentratsiooni, s.t  $\text{Ca}^{2+}$  taset, mille juures pool RyR2 kanalitest on avatud) ligikaudu 62-kordselt [90].

**Kineetiline skaleerimistegur.** Lisaks tundlikkuse nihkele kiirendab kofeiin avanemis- ja aeglustab sulgemiskineetikat [87], mis vastab sellele, et avamistõke väheneb ja sulgemistõke suureneb [79]. Eeldades sümmeetrilist ja lineaarset sõltuvust kontsentratsioonist:

$$k_{\text{open}}^{\text{eff}} = k_{\text{open}} (1 + \beta_{\text{caff}} c_{\text{caff}}) \quad (12)$$

$$k_{\text{close}}^{\text{eff}} = \frac{k_{\text{close}}}{1 + \beta_{\text{caff}} c_{\text{caff}}} \quad (13)$$

Tähistades  $\xi_{\text{caff}} \equiv 1 + \beta_{\text{caff}} \cdot c_{\text{caff}}$ , on tasakaaluline avanemistõenäosus:

$$P_{\text{open}}^{\text{eq}} = \frac{\xi_{\text{caff}}^2 k_{\text{open}}}{\xi_{\text{caff}}^2 k_{\text{open}} + k_{\text{close}}} \quad (14)$$

mis kasvab  $\xi_{\text{caff}} > 1$  korral monotoonselt.  $K_d^{\text{eff}}$  langus võimendab efekti veelgi, kuna mõlemad mehhanismid toimivad samaaegselt. Käesolevas töös kasutatakse kombineeritud lähendamist (vt kolme alternatiivi analüüsi lisa 3.6).

### 3.6.3 Kofeiini mõju modelleerimine RyR2 kineetikas

Eelnevalt tuletatud  $K_d^{\text{eff}}$  (võrrand 11) ja  $\xi_{\text{caff}}$  rakendatakse Hinch'i jt [79] kaltsiumivabastuse ühiku (CaRU) raamistikus, mis kirjeldab RyR2 stohhastilist käitumist deterministliku diferentsiaalvõrrandite süsteemina. Iga CaRU koosneb ühest L-tüüpi kaltsiumikanalist (LCC)

ja ühest RyR2 kanalist düaadilises ruumis; neli redutseeritud seisundimuutujat kirjeldavad LCC ja RyR2 ühisjaotust: LCC suletud/RyR2 suletud ( $z_1$ ), LCC avatud/RyR2 suletud ( $z_2$ ), LCC suletud/RyR2 avatud ( $z_3$ ) ning LCC avatud/RyR2 avatud ( $z_4 = 1 - z_1 - z_2 - z_3$ ).

**Modifitseeritud üleminekukiirused.** RyR2 avanemist kirjeldavad kaks üleminekukiirust:  $\mu_{pcc}$  (suletud→avatud, tsütosoolse  $Ca^{2+}$  poolt juhitud) ja  $\mu_{poc}$  (avatud→avatud, düaadilise  $Ca^{2+}$  poolt juhitud). Kofeiini lisamisel:

$$\mu_{pcc}^{eff} = \xi_{caff} \cdot \frac{[Ca^{2+}]_i^2}{\tau_R ([Ca^{2+}]_i^2 + (K_d^{eff})^2)} \quad (15)$$

$$\mu_{poc}^{eff} = \xi_{caff} \cdot \frac{C_{oc}^2}{\tau_R (C_{oc}^2 + (K_d^{eff})^2)} \quad (16)$$

Sulgemiskiirused  $\beta_{pcc}$  ja  $\beta_{poc}$  jagatakse sama teguriga:

$$\beta_{pcc}^{eff} = \frac{1}{\xi_{caff}} \cdot \frac{[Ca^{2+}]_i^2}{\tau_R ([Ca^{2+}]_i^2 + (K_d^{eff})^2)}, \quad \beta_{poc}^{eff} = \frac{1}{\xi_{caff}} \cdot \frac{C_{oc}^2}{\tau_R (C_{oc}^2 + (K_d^{eff})^2)} \quad (17)$$

Avamiskiiruse korrutamine ja sulgemiskiiruse jagamine sama  $\xi_{caff}$ -ga tagab  $P_{open}$  tõusu mõlema efekti kaudu samaaegselt. Kofeiinita ( $c_{caff} = 0$ ) on  $\xi_{caff} = 1$  ja  $K_d^{eff} = K_{RyR}$ , seega taanduvad kõik võrrandid Hinchl originaalvõrranditele [79].

**FCa ja kofeiini koostoime.** Kofeiinipulsi ajal vabaneb SR-ist kaltsium, mis põhjustab  $[Ca^{2+}]_i$  järsu tõusu. Tõusnud kontsentratsioon suurendab FCa seondumiskiirust (võrrand 4), mis omakorda vähendab  $\beta_{total}$ -i (võrrand 5) ning aeglustab  $Ca^{2+}$  transiendi tippu ja pikendab taastumist.

### 3.7 Füsioloogiliste algväärtuste ja stabiilse seisundi määramine

Diferentsiaalvõrrandite süsteemi integreerimine nõuab algväärtuste määramist kõigile muutujatele. Terkildseni originaalmudeli algväärtused on sobitatud üldiste roti ventrikulaarse kardiomyotsüüdi tingimustele [7], kuid käesolevas töös kohandati kaltsiumiga seotud algkontsentratsioonid eksperimentaalsete mõõtmiste põhjal, et mudeli lähteolek vastaks konkreetse katse tingimustele ning on leitav lisadest (tabel 4).

Kuna diferentsiaalvõrrandite süsteem on tugevalt mittelineaarne, ei pruugi kõik algväärtused viia füsioloogiliselt representatiivsele trajektoorige. Süsteem võib viibida üleminekuseisundis, mis ei peegelda stabiilset löögist-lööki dünaamikat. Seetõttu simuleeriti korduvaid stimulatsiooniperioode (maksimaalselt 5000, tsükli pikkus 1000 ms) kuni süsteem saavutas perioodilise püsirežiimi.

Koondumise kriteeriumina kasutati seisundimuutujate suhteliste kõrvalekallete maksimumi järjestikustel perioodidel:

$$\delta = \max_i \frac{|x_i(n+1) - x_i(n)|}{s_i} < \varepsilon \quad (18)$$

kus  $x_i(n)$  on  $i$ -nda olekumuutuja väärtus  $n$ -nda stimulatsiooniperioodi lõpus,  $s_i$  on muutuja  $i$  iseloomulik skaala (nt  $s_V = 100$  mV,  $s_{Ca_i} = 5 \times 10^{-4}$  mM) ning tolerants  $\varepsilon = 10^{-6}$ . Lisaks

tuvastati piirtsükkel eraldi kriteeriumiga: kui viimase 50 löögi  $\delta$  väärtuste standardhälve jäi alla  $10^{-6}$ , loeti süsteem piirtsüklisse koondunuks.

Pärast koondumist rakendati täiendav 500 ms pikkune stimulatsioonivaba lödvestuspäss, mille käigus integreeriti mudelit ilma elektrilise stimulatsioonita. See samm on vajalik, kuna löögist-lööki koondumiskriteeriumi täitmine ei garanteeri, et CaRU redutseeritud seisundid  $z_1, z_2, z_3$  on jõudnud oma tõelisele puhkeoleku püsipunkti. Ilma selle sammuta tekiks järgnevates simulatsioonides esimese  $\sim 50$  ms jooksul artefaktne  $[Ca^{2+}]_i$  transient, mis tuleneks CaRU seisundite korrigeerumisest ja põhjustaks ebaõige RyR2 voolu simulatsiooni alguses. Alles pärast mõlemat sammu võeti saadud seisundimuutujate väärtused aluseks edasistele simulatsioonideks.

### 3.8 Atraktoranalüüs ja piirtsükli stabiilsuse hindamine

#### 3.8.1 Atraktoranalüüsi motivatsioon

Parameetrite sobitamise eelselt oli vaja välja selgitada, kas mudel säilitab füsioloogiliselt tõlgendatava käitumise ka siis, kui SR-i kaltsiumi sisaldus erineb originaalmudeli algväärtustest.

Selle küsimuse lahendamiseks viidi läbi kaheastmeline analüüs: (i) kontrolliti, kas mudel omab normaalsetes stimulatsioonitingimustes ühtainsat atraktorit (*attractor*), ning (ii) tuvastati, millisel SR-i  $Ca^{2+}$  täituvustasemel toimub siirdumine alternatiivsele püsiseisundile, st määrati ligikaudne bifurkatsioonilävi.

#### 3.8.2 Kolm algväärtuste komplekti

Analüüsiks konstrueeriti kolm erinevat algväärtuste komplekti (AK), mis esindavad kvalitatiivselt erinevaid lähtepunkte faasiruumis:

- **AK1** – mudeli standardsed algväärtused või eelnevalt salvestatud püsirežiimi olek ( $[Ca^{2+}]_{SR} = 0,7$  mM,  $[Ca^{2+}]_i \approx 7,9 \times 10^{-5}$  mM; vt tabel 4), mis esindab normaalset füsioloogilist lähtepunkti [7, 69];
- **AK2** – tühjendatud SR, kus  $[Ca^{2+}]_{SR} = 0,1$  mM ja  $[Ca^{2+}]_i = 5 \times 10^{-5}$  mM, esindades SR-i tühja olekut [80];
- **AK3** – ülelaaditud SR, kus  $[Ca^{2+}]_{SR} = 1,5$  mM ja  $[Ca^{2+}]_i = 5 \times 10^{-4}$  mM, esindades võimalikku patoloogilist ülekoormusolekut [91].

Igat algväärtuste komplekti integreeriti kuni 1000 stimulatsiooniperioodi (1 Hz, periood 1000 ms), kasutades integraatorit LSODA.

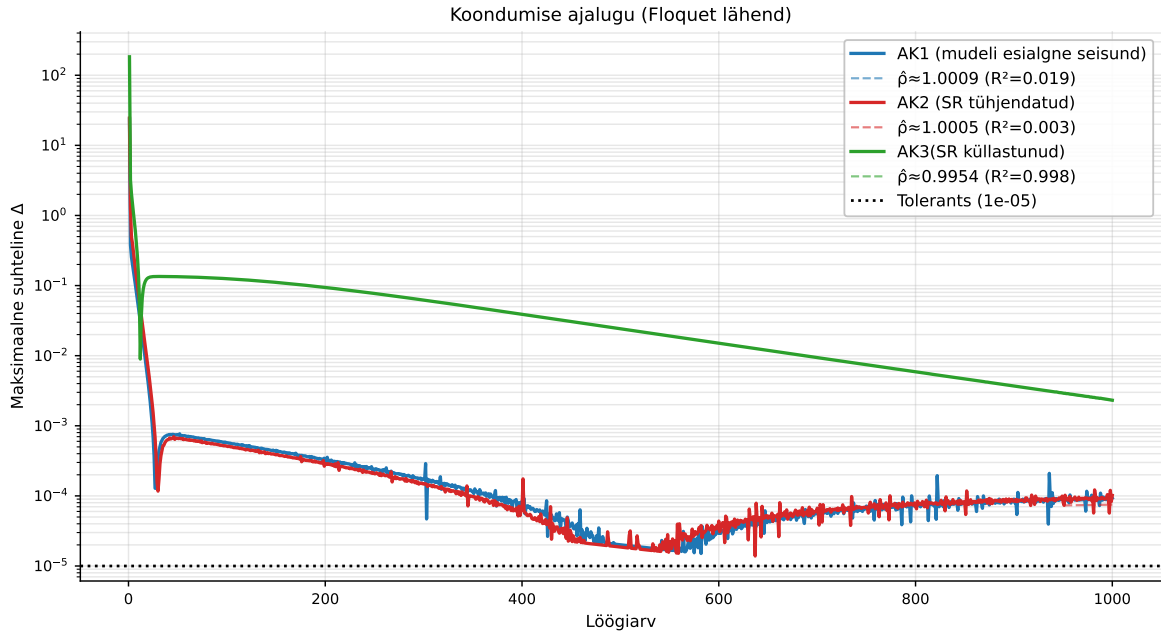
#### 3.8.3 Löögist-lööki koondumisanalüüs

Piirtsüklile koondumist mõõdeti löögist-lööki maksimaalse suhtelise erinevuse  $\delta(n)$  abil, mis on defineeritud kui:

$$\delta(n) = \max_i \frac{|x_i(n) - x_i(n-1)|}{s_i} \quad (19)$$

kus  $x_i(n)$  tähistab  $i$ -nda olekumuutuja väärtust  $n$ -nda löögi lõpus ning  $s_i$  on vastava muutuja tüüpiline skaala, mis on valitud iga muutuja füsioloogilise vahemiku põhjal (nt  $s_V = 80$  mV,  $s_{[Ca^{2+}]_i} = 5 \times 10^{-4}$  mM). koondumiskriteeriumiks seati  $\delta < 10^{-5}$ .

Tulemused on esitatud joonisel 11. AK1 ja AK2 puhul esialgsete transientide järel stabiliseerus  $\delta(n)$  platoole ligikaudu  $10^{-4}$  tasemel, kus see püsis 1000 löögi vältel ning ei saavutanud koondumisläve. AK3 puhul oli käitumine kvalitatiivselt erinev:  $\delta(n)$  langes 1000 löögi vältel monotoonselt ja logaritmilisel skaalal lineaarselt, mis viitab eksponentsiaalse koondumise seaduspärasusele.



**Joonis 11:** Löögist-lööki koondumisajalugu kolme algväärtuste komplekti korral. Vertikaalteljel on näidatud maksimaalne suhteline muutus  $\delta(n)$  logaritmilisel skaalal, horisontaalteljel löögi järjekorranumber. Pidevad jooned: AK1 (sinine), AK2 (punane), AK3 (roheline). Katkendjooned: Floquet' lähenduse lineaarne sobitamine iga trajektoori sabale. Punktiirjoon: koondumiskriteerium  $\delta = 10^{-5}$ . AK3 puhul on näha selge eksponentsiaalne koondumine ( $R^2 = 0,998$ ), samas kui AK1 ja AK2 jäävad marginaalsele platoole, mis on iseloomulik bifurkatsioonile lähedal asuvalle atraktorile.

### 3.8.4 Floquet' kordajate geomeetiline lähendus

Täpne Floquet' analüüs nõuaks jakobiaani maatriksi integratsiooni üle kogu stimulatsiooniperioodi, mis on 23-mõõtmelise süsteemi puhul arvutuslikult kulukas protseduur [92]. Käesolevas töös rakendati geomeetrist lähendust: kuna piirtsükli koondumine on lokaalses ümbruses eksponentsiaalne, siis domineerivat Floquet' kordajat  $\hat{\rho}$  saab hinnata logaritmi lineaarse regressiooni teel  $\delta(n)$  sabale.

Konkreetselt sobitati viimase 50 löögi andmeteile mudel:

$$\ln \delta(n) = n \ln \hat{\rho} + \text{const} \quad (20)$$

Selle lähenduse füüsikaline põhjendus tuleneb Floquet' teooriast: piirtsükli ümbruses käituvad lahendite kõrvalekalded kui  $\delta(n) \propto \hat{\rho}^n$ , kus  $\hat{\rho}$  on domineeriv, ehk absoluutväärtuse poolest suurim, Floquet' kordaja [92]. Seega teisendab  $\ln \delta(n)$  eksponentsiaalse lagunemise

lineaarseks sõltuvuseks lõõgist  $n$ , mille kalle annab otse  $\ln \hat{\rho}$ . Piirtsükkel on stabiilne parajasti siis, kui  $|\hat{\rho}| < 1$ .

Lähendus väldib jakobiaani arvutamist ja on rakendatav iga skalaarsele monotoonsele koondumisele. See on arvutuslikult minimalistlik, kuid annab piisavalt usaldusväärse hinnangu domineeriva Floquet' kordaja jaoks, eeldusel et koondumise saba on piisavalt pikk ja monotoonne.

Saadud tulemused on kokkuvõtlikult esitatud tabelis 1.

**Tabel 1:** Floquet' kordaja hinnangud kolme algväärtuste kompleksi korral.  $\hat{\rho}$  on domineeriva Floquet' kordaja lähendus,  $R^2$  on logaritmilise lineaarse regressiooni headusenäitaja viimase 50 lõõgi sabale.

Algväärtused	atraktor	$\hat{\rho}$	$R^2$
AK1 (vaikealgväärtused)	normaalne	$\approx 1,0009$	0,019
AK2 (tühjendatud SR)	normaalne	$\approx 1,0005$	0,003
AK3 (ülelaaditud SR)	depolariseeritud	$\approx 0,9954$	0,998

AK3 puhul on sobituse kvaliteet kõrge ( $R^2 = 0,998$ ) ning  $\hat{\rho} \approx 0,9954 < 1$  kinnitab selgelt stabiilset piirtsükli, mille iseloomulik koondumisajakonstant on ligikaudu  $\tau = -1/\ln \hat{\rho} \approx 218$  stimulatsiooniperioodi.

AK1 ja AK2 puhul on  $\hat{\rho}$  väärtused veidi üle ühiku ja  $R^2$  peaaegu null, aga ei tähenda ebastabiilsust, sest lahendid ei haju. AK1 ja AK2 puhul on tegu kriitilise aeglustumisega (*critical slowing down*): lähedal sadulsõlme-bifurkatsioonile muutub atraktori lokaalne külgetõmme äärmiselt nõrgaks ning koondumiskiirus läheneb nullile [92]. Sellisel juhul ei ole  $\delta(n)$  saba enam ühe eksponendiga kirjeldatav ja saba domineerivad mürarikkad ostsillatsioonid, mistõttu regressiooni headusenäitaja langeb. See tähendab, et AK1 ja AK2 koonduvad küll normaalsele piirtsüklile, kuid äärmiselt aeglaselt ja eeldatavasti alles mitmete tuhandete lõõkide järel.

### 3.8.5 Aktsioonipotentsiaalid ja $Ca^{2+}$ transiendid

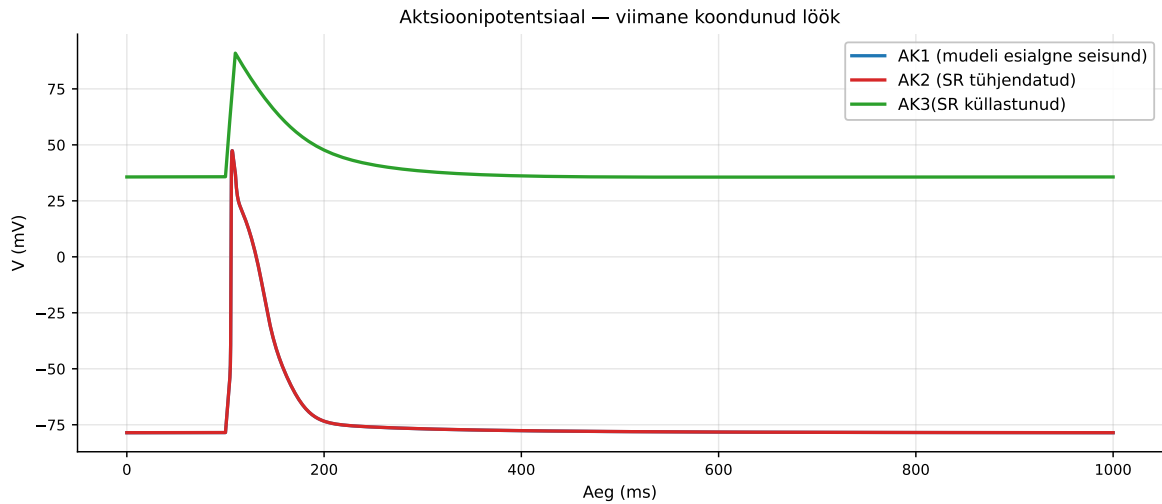
Joonised 12 ja 13 esitavad viimase simuleeritud lõõgi aktsioonipotentsiaali ja  $Ca^{2+}$  transiendi kõvera iga algväärtuste komplekti korral.

AK1 ja AK2 kattuvad mõlemas joonisel peaaegu täielikult, mis kinnitab, et mõlemad algväärtuste komplektid koonduvad samale normaalsele piirtsüklile, hoolimata sellest, et SR-i  $Ca^{2+}$  algväärtused erinesid rohkem kui kümme korda. See on tugev tõendus normaalsete algväärtuste atraktori ühesuse kohta.

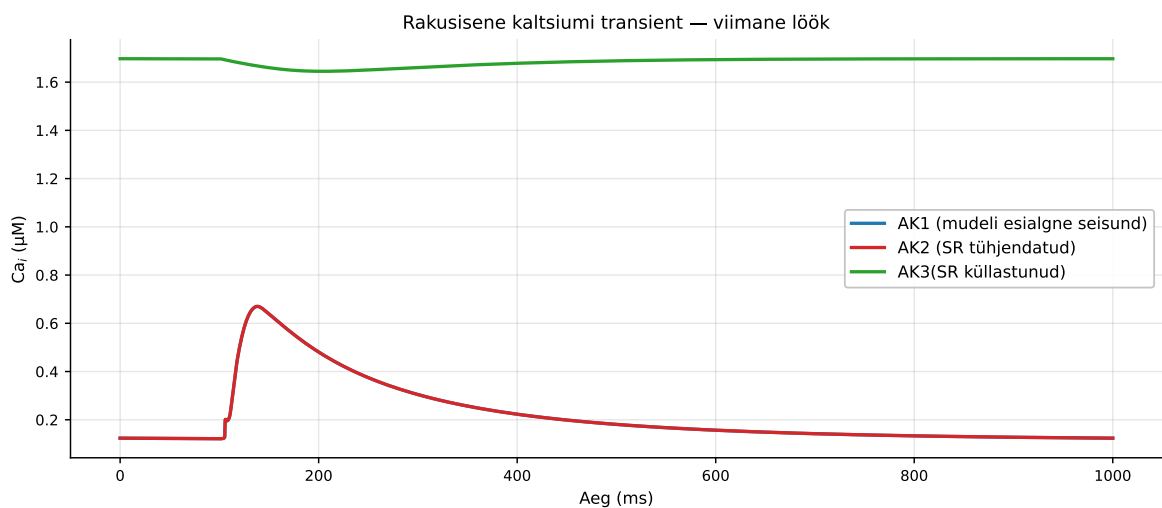
### 3.8.6 Bifurkatsioonilävi

Kahe atraktori koeksisteerimise ja nendevahelise bifurkatsioonikünnisväärtuse täpsemaks määramiseks viidi läbi parameetruumi skanneerimine (*basin scan*). Skanneerimisel varieeriti SR-i  $Ca^{2+}$  algväärtust vahemikus  $[Ca^{2+}]_{SR} \in [1,46; 1,50]$  mM ( $n = 40$  punkti, sammuga  $\approx 0,001$  mM), kasutades 300 soojenemislööki enne lõpliku seisundi klassifitseerimist.

Kriitiline metodoloogiline valik on siinjuures see, et  $[Ca^{2+}]_i$  ja FCa kovarieeriti lineaarselt SR-i  $Ca^{2+}$  algväärtusega, ankurdades suhted AK3 referentsile ( $[Ca^{2+}]_{SR,ref} = 1,5$  mM):



**Joonis 12:** Aktsoonipotentsiaal viimase simuleeritud löögi lõpus kolme algväärtuste komplekti korral. AK1 (sinine) ja AK2 (punane) kattuvad praktiliselt täielikult: puhkepotentsiaal  $\approx -78$  mV ning stimuleerimisele järgnev normaalne aktsoonipotentsiaal. AK3 (roheline) kujutab kvalitatiivselt erinevat seisundit, kus membraanpotentsiaal on püsivalt  $\approx +35$  mV juures, kasvades vaid transiitse stiimuluse korral, kuid ei repolariseeru normaalselt. See vastab depolarisatsiooniblokaadile, kus  $\text{Na}^+$ -kanalid on suletud ning NCX1 toetab sissetulevat voolu kõrgeendatud  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  kaudu.



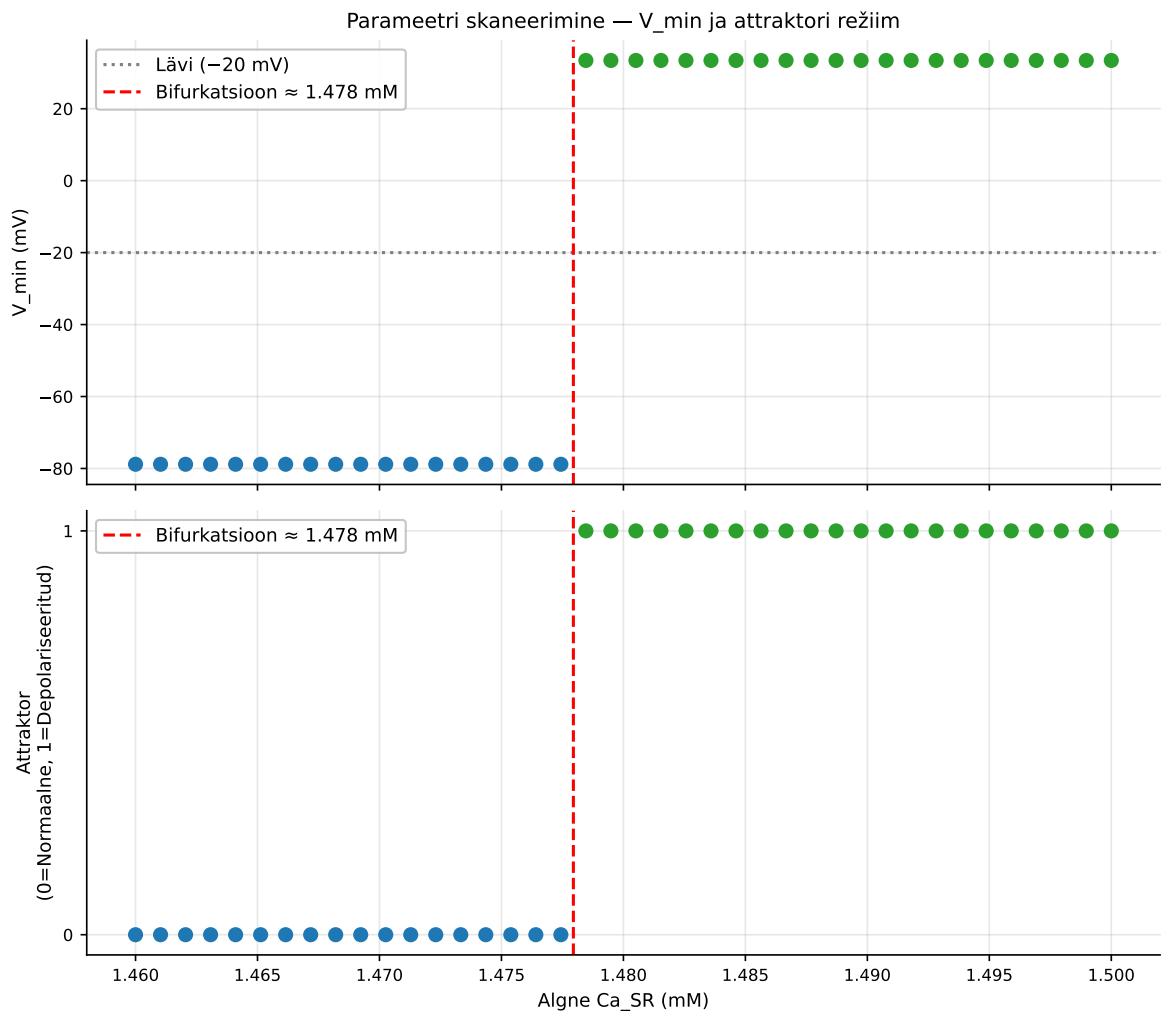
**Joonis 13:** Rakusisene  $\text{Ca}^{2+}$ -transient viimase simuleeritud löögi vältel. AK1 (sinine) ja AK2 (punane) esindavad füsioloogilist transienti: diastoolne tase  $\approx 0.15$   $\mu\text{M}$ , süstoolne tipp  $\approx 0.67$   $\mu\text{M}$ . AK3 (roheline) näitab tooniliselt kõrgeendatud  $[\text{Ca}^{2+}]_i \approx 1.67$   $\mu\text{M}$  ilma korduva transiendita, mis on SR-i ülekoormusest tingitud tsütosoolse kaltsiumi ülekoormuse tunnusmärki.

$$[\text{Ca}^{2+}]_i^{(0)} = [\text{Ca}^{2+}]_{i,\text{ref}} \cdot \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}}{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR,ref}}}, \quad [\text{FCa}]^{(0)} = [\text{FCa}]_{\text{ref}} \cdot \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}}{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR,ref}}} \quad (21)$$

See kovariatsioon tagab, et iga skanneerimispunkt asetseb faasiruumi piirkonnas, mis vastab füsioloogiliselt sidusale ülelaaditud olekule, mitte suvalisele teljelõigule. Ainult SR-i  $\text{Ca}^{2+}$  varieerimine, jättes  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  konstantseks, annaks tulemuseks valepositiivsed negatiivsed klassifikatsioonid, kuna esialgne trajektor ei asuks depolariseeritud atraktori mahus.

Seisundi klassifitseerimiseks mõõdeti viimase löögi minimaalset membraanpotentsiaali  $V_{\min}$ : kui  $V_{\min} > -20$  mV, loeti süsteem depolariseerituks, muul juhul normaalseks.

Tulemused on esitatud joonisel 14. Bifurkatsioon on terav, ehk kõik 21 punkti alla künnise,  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}} < 1,478$  mM, klassifitseerisid normaalseks ( $V_{\min} \approx -80$  mV) ning kõik 19 punkti üle künnise depolariseerituks ( $V_{\min} \approx +30$  mV). Vahepealset käitumist ei täheldatud.



**Joonis 14:** SR-i  $\text{Ca}^{2+}$  parameetriruumi skanneerimine vahemikus 1,46–1,50 mM ( $n = 40$  punkti, 300 soojenemislööki). Ülemine paneel: viimase löögi minimaalne membraanpotentsiaal  $V_{\min}$  iga SR-i  $\text{Ca}^{2+}$  algväärtuse korral; punktiirjoon tähistab klassifitseerimiskünnist  $-20$  mV. Alumine paneel: binaarne atraktori klassifikatsioon (0 = normaalne, 1 = depolariseeritud). Punane katkendliin: bifurkatsioonilävi  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}} \approx 1,478$  mM, mis eraldab kahe atraktori basseine. Üleminek on järsk, vahepealse käitumisetä, mis on iseloomulik sadulsõlme-bifurkatsioonile.

Tuvastatud bifurkatsioonilävi  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}} \approx 1,478$  mM on käesoleva töö parameetrisobitamise seisukohalt otsese tähtsusega. Kuna sobitusprotsessis leitud SR-i  $\text{Ca}^{2+}$  tasemed jäid ligikau-

du 1,2 mM juurde, siis leidus ka sobitavusi, mis lähenesid kriitilisele piirile. Seega, määrati sobitamisel ülempiir SR-i täituvusele, et parameetrisobitamise tulemused kujutaks eranditult normaalse piirtsükli lähedasi seisundeid.

Bifurkatsiooni tüübi osas viitab terava ja järsu ülemineku iseloom sadulsõlme-bifurkatsioonile piirorbiidil (*saddle-node on a limit cycle*) [92], kus kaks püsivat piirtsükli, normaalne ja depolariseeritud, koeksisteerivad ning on eraldatud ebastabiilse sadulpunktiga. Selline dünaamiline struktuur on südame  $\text{Ca}^{2+}$  ülekoormusel põhinevate arütmiate üldtunnustatud mehhanismiks [58].

### 3.9 Mudeli parameetrite sobitamine

Kofeiiniprotokolli parameetrite määramiseks viidi iga eksperimendi jaoks läbi sobitamine, kuna vaadeldavate parameetrite, tundlikkuse nihet ja kineetilist skaleerimistegurit, ei mõõdetud eksperimentaalselt. Modelleerimine on seetõttu ainus realistlik viis nende väärtuste hindamiseks.

**Sihtfunktsioon.** Optimeerimise eesmärgiks oli leida parameetrivektori

$$\theta = [\alpha_{\text{caff}}, \beta_{\text{caff}}, s_{\text{NCX}}, s_{\text{SERCA}}, s_{\text{PMCA}}, s_{\text{CaSR}}]^T \quad (22)$$

väärtused, mis minimeerivad simuleeritud ja mõõdetud  $\Delta F/F_0$  kõverate vahelist ruuthälvet kofeiinipulsi ajal. Iga ajahetke  $t_k$  residuaal defineeriti:

$$r(t_k) = \frac{[\text{FCa}](t_k)}{[\text{FCa}]_0} - \left(\frac{\Delta F}{F_0}\right)_{\text{exp}}(t_k) \quad (23)$$

kus  $[\text{FCa}]_0$  on simuleeritud FCa puhkeoleku väärtus enne kofeiinipulsi algust ning  $(\Delta F/F_0)_{\text{exp}}$  on eksperimentaalne normaliseeritud fluorestsentsisignaali samal ajahetkel. Residuaalide kogu  $\mathbf{r}(\theta) = [r(t_1), \dots, r(t_K)]^T$  moodustab residuaali vektori, mille ruutnormi  $\|\mathbf{r}\|^2$  minimaalne väärtus on optimeerimise sihtmärk. Sobitamine viidi läbi ainult kofeiinipulsi ajal ( $t > t_{\text{caff}}$ ), mitte kogu eksperimendi vältel.

**Otsitavad parameetrid ja piirangud.** Sobitamisel varieeriti kuut parameetrit koos alumiste ja ülemiste piirangutega:

**Tabel 2:** Sobitatud parameetrid ning nende piirangud.

Parameeter	Tähendus	Alumine piir	Ülemine piir
$\alpha_{\text{caff}}$	$\text{Ca}^{2+}$ tundlikkuse nihe ( $\text{mM}^{-1}$ )	1,2	9,3
$\beta_{\text{caff}}$	Kineetiline skaleerimistegur ( $\text{mM}^{-1}$ )	2,0	16,0
$s_{\text{NCX}}$	NCX juhtivuse skaleerimistegur	0,2	2,0
$s_{\text{SERCA}}$	SERCA juhtivuse skaleerimistegur	0,2	2,0
$s_{\text{PMCA}}$	PMCA juhtivuse skaleerimistegur	0,2	1,5
$s_{\text{CaSR}}$	SR-i $\text{Ca}^{2+}$ algväärtuse skaleerimistegur	0,50	1,99

Kolm juhtivuse skaleerimistegurit ( $s_{\text{NCX}}$ ,  $s_{\text{SERCA}}$ ,  $s_{\text{PMCA}}$ ) on dimensioonitud korrutustegurid originaalparameetri suhtes, mis võimaldavad mudelil kohaneda rakuspetsiifiliste erinevus-

tega  $\text{Ca}^{2+}$  ekstrusioonikiiruses. SR-i kaltsiumi skaleerimistegur  $s_{\text{CaSR}}$  võimaldab sobituse käigus kohandada SR-i täituvustaset, mis on kofeiintransiendi amplituudi peamine määraja.

**Optimiseerimismeetod.** Kasutati SciPy teegi `least_squares` funktsiooni TRF (*Trust Region Reflective*) algoritmiga [82], mis on mõeldud just piirangutega vähimruutude ülesannete jaoks. Konvergenstolerantsiks seati  $f_{\text{tol}} = x_{\text{tol}} = g_{\text{tol}} = 10^{-8}$ , kus  $f_{\text{tol}}$  on lubatud suhteline muutus veaväärtusfunktsiooni väärtuses,  $x_{\text{tol}}$  parameetrite väärtuses ning  $g_{\text{tol}}$  gradiendi normis.

Kohaliku miinimumi probleemi leevendamiseks rakendati mitmikalgpunkti strateegiat:  $N = 20$  algpunkti, millest esimene vastas kirjanduse vaikeväärtustele ( $\alpha_{\text{caff}} = 6,1$ ,  $\beta_{\text{caff}} = 10,0$ , kõik skaleerimistegurid = 1,0) ning ülejäänud 19 sobitamist tehti juhuslikult ühtlasejaotusega parameetrite piirangute vahemikust (fikseeriti generaatoriseeme `rng=42` reprodutseeritavuse tagamiseks). Kõigi algpunktide hulgast valiti parima veaväärtusfunktsiooni väärtusega tulemus.

**Simulatsiooni ülesehitus.** Iga residuaali arvutus koosnes kahest faasist. Esimeses faasis integreeriti mudelit ilma kofeiinita kuni kofeiinipulsi alguseni, kasutades lähtepunktina eelnevalt arvatud püsirežiimi seisundit. See tagab, et mudeli lähteolek kofeiinipulsi alguses vastab eksperimendi puhkeolekule. Teises faasis rakendati kofeiin ( $c_{\text{caff}} = 10,0$  mM) ning integreeriti kofeiinipulsi kestuse vältel, arvutades simuleeritud  $\Delta F/F_0$  kõvera otseseks võrdluseks eksperimentaalsete andmetega.

Sobitamise tulemusel salvestati iga eksperimendi jaoks parimate parameetrite väärtused koos saavutatud ruutkeskmise hälbega.

**Parameetrite ebakindlus.** Iga sobitatud parameetri usaldusvahemiku hindamiseks kasutati TRF-algoritmi poolt tagastatud Jakobiaani maatriksit  $\mathbf{J}$ , mille alusel arvutati ligikaudne kovariatsioonimaatiks [82]:

$$\mathbf{C} \approx \sigma^2 (\mathbf{J}^T \mathbf{J})^{-1} \quad (24)$$

kus  $\sigma^2 = \text{RMS}^2$  on residuaalide dispersiooni hinnang. Parameetri  $i$  standardhälve saadi kovariatsioonimaatriksi peadiagonaalelemendi ruutjuurena:

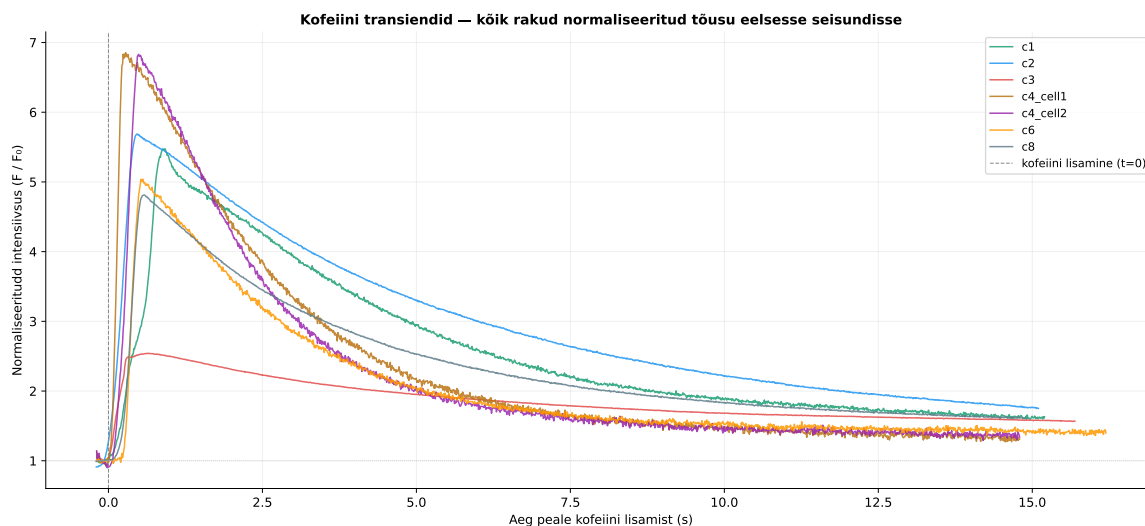
$$\sigma_i = \sqrt{C_{ii}} \quad (25)$$

Need standardhälbed väljendavad parameetri lokaalset identifitseeritavust sobitamispunkti ümbruses, kus suur standardhälve viitab sellele, et sihtfunktsioon on antud parameetri suhtes lame ning selle väärtus on andmetest halvasti määratud. Kovariatsioonimaatriksi arvutus on implementeeritud otse `scipy.optimize.least_squares` funktsioonis ning kättesaadav lahendi `.jac` atribuudi kaudu [82].

## 4 Tulemused

### 4.1 Eksperimentaalsete kofeiini transientide varieeruvus

Kofeiini sobitamiseks katseandmetega valiti välja 7 transiendi mõõtmised roti ventrikulaarsel kardiomyotsüüdil (katsed c1, c2, c3, c4\_cell1, c4\_cell2, c6, c8). Joonis 15 esitab kõigi katsete normaliseeritud Fluo-4 fluorestsentsisignaali  $F/F_0$  ajas, kus kõik kõverad on joondatud kofeiini lisamishetke suhtes ja normaliseeritud oma puhkeoleku baastasemele.



**Joonis 15:** Normaliseeritud Fluo-4 fluorestsentsisignaali  $F/F_0$  kõigis seitsmes katses. Kofeiini lisamise hetk on tähistatud vertikaalse katkendjoone kaudu ( $t = 0$  s). Iga kõver on normaliseeritud oma puhkeoleku keskmise baastaseme suhtes.

Ehkki kõik rakud pärinevad samast isolatsioonist (st samalt loomalt) ning katsed viidi läbi lühikese ajavahemiku jooksul, esineb katsete vahel märkimisväärne varieeruvus nii tõusu amplituudis kui ka languse kineetikas, peegeldades eraldatud kardiomyotsüütidele iseloomulikke rakudevahelist heterogeensust SR-i  $Ca^{2+}$  täituvustasemes ja kaltsiumi väljutamiskiiruses. Tõusu amplituud  $F/F_0^{\max}$  varieerub ligikaudu 2,7-kordselt: kõrgeima amplituudiga katsed c4\_cell1 ja c4\_cell2 ulatuvad  $\sim 6,8\times$  baastasemest, samas kui madalaima amplituudiga katse c3 ulatub vaid  $\sim 2,5\times$  kõrgemale. See on kooskõlas kirjanduses leiduva SR-i  $Ca^{2+}$  sisalduse rakudevahelise varieeruvusega eraldatud kardiomyotsüütides [93].

Tõusu kineetika on seevastu katsete vahel suhteliselt ühtlane.  $Ca^{2+}$  kontsentratsioon saavutab maksimumi ligikaudu 0,3–0,6 s pärast kofeiini lisamist. Erandiks on katse c3, kus tõus on selgelt lamedam ja aeglasem: maksimum saavutatakse  $\sim 1$  s juures ning teravat tippu ei ilmne, mis viitab sellele, et antud rakus oli SR-i täituvustase mõõtmise hetkel teistest madalam või RyR2 avanemiskineetika kofeiinitundlikkus väiksem. Oluline on rõhutada, et madal amplituud ei vähenda katse c3 usaldusväärsust: madal SR-i täituvustase on füsioloogiliselt tavaline ja eraldatud rakkudes sageli täheldatud nähtus [94], ning katse c3 koondumine puhkeoleku baastasemele enne kofeiini pulsi algust on selgelt näha.

Languse kineetikas esineb samuti varieeruvus, mis peegeldab NCX1 kaudu toimuva kaltsiumi väljavoolu kiirust ning SR-i uuesti täitumise panust [3]. Katse c2 langeb erandlikult

aeglaselt,  $\sim 2\times$  baastasemest veel 15 s pärast kofeiini lisamist, mis võib viidata NCX1 vähenenud aktiivsusele või suuremale SR-i  $\text{Ca}^{2+}$  taastäitumise panusele languse ajal. Katsed c4\_cell1, c4\_cell2, c6 ja c8 languskineetika on sarnane ja kiire, jõudes  $\sim 1,3 \times F_0$  tasemeni  $\sim 5$  s jooksul. Katse c1 languse kiirus jääb nende kahe äärmuse vahele.

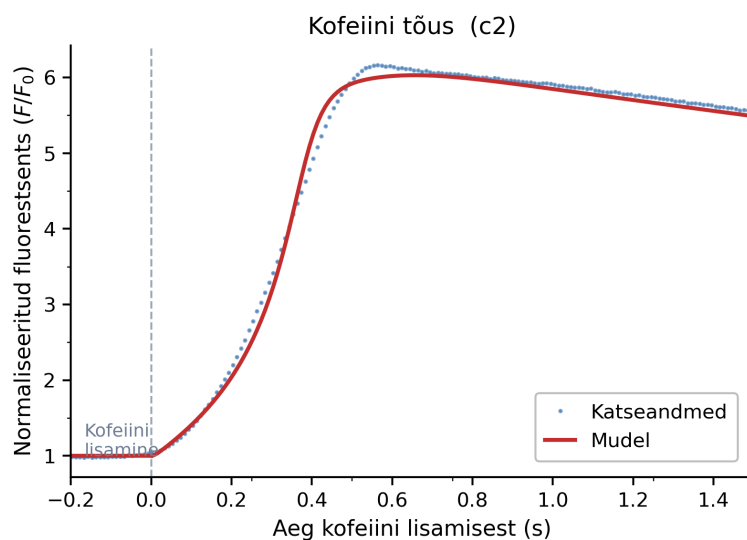
Samuti, kõigi kõverate baastase pärast kofeiini transienti ( $t > 10$  s) stabiliseerub  $\sim 1,3-1,8 \times F_0$  juures, mitte algtasemele  $1,0\times$ . See püsiv kõrgendatud tase peegeldab tõenäoliselt SR-i mittetäielikku tühjendamist ning  $\text{Ca}^{2+}$  ja Fluo-4 vahelist jääkseondumist pärast transienti. Erinevustest motiveeritud, tuleb mudeli parameetreid individuaalselt sobitada igale katsele eraldi.

## 4.2 Mudeli sobitamine eksperimentaalsetele andmetele

Täiendatud Terkildseni mudelit koos kofeiini protokolliga sobitati igale katsele eraldi TRF-meetodil. Sobitamine viidi läbi kofeiinipulsi ajal mõõdetud  $F/F_0$  kõvera suhtes, minimeerides ruutkeskmist hälvet (RMS) mudeli ja katseandmete vahel. Lokaalsetest miinimumidest tingitud koondumisprobleemide vähendamiseks kasutati 20 juhuslikku algpunkti parameetrite rüümitamises, valides lõpptulemuseks väikseima RMS-väärtusega lahendi. See strateegia vähendab lokaalse miinimumi ohtu, kuid ei välista seda täielikult.

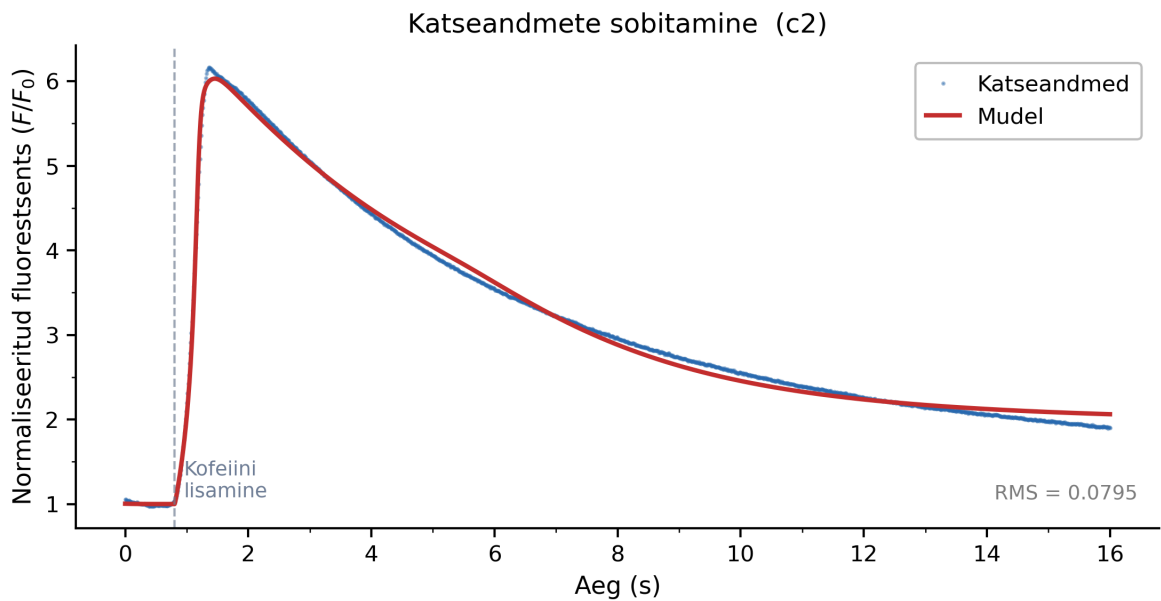
### 4.2.1 Esinduslik näide: katse c2

Joonis 16 näitab kofeiini tõusu sobitamist katses c2 ning joonis 17 kogu sobitust koos kofeiini eelse faasiga. Katse c2 valiti esinduslikuks näiteks, kuna selle languse kineetika on kõigi katsete seas erandlikult aeglane ning seega kujutab eeldatavasti mudeli jaoks kõige nõudlikumat sobitamisülesannet.



**Joonis 16:** Kofeiini tõusu sobitamine katses c2 (RMS = 0,080). Sinised punktid: katseandmed; punane joon: mudeli parim sobitamine. Vertikaalne katkendjoon tähistab kofeiini lisamise hetke ( $t = 0$  s). Mudel kirjeldab tõusu kuju ja amplituudi ( $F/F_0^{\max} \approx 6,1$ ) ligikaudselt.

Mudel suudab c2 puhul kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt sobitada nii tõusu kui languse kineetikat üle kogu 16-sekundilise ajavahemiku. Väikseim kõrvalekalle esineb tõusu tipus ( $t \approx 0,5-$



**Joonis 17:** Sobitamine katses c2, hõlmates nii kofeiini eelset puhkeolekut (0–0,8 s) kui kofeiini transienti (0,8–16 s). Mudel sobitab edukalt nii kiiret tõusu ( $\sim 0,5$  s) kui aeglast eksponentsiaalset langust, mis kestab 15 s.

0,6 s), kus andmed ületavad mudeli  $\sim 0,2 F/F_0$  võrra — see võib peegeldada lühiajalist  $Ca^{2+}$  ülelaadimist, mida lihtsustatud SR-i mudelikomponent täielikult ei kata.

#### 4.2.2 Kõigi katsete sobitamine

Joonis 18 esitab kõigi seitsme katse kofeiini tõusu sobitamise tulemused ühel koondjoonisel. Mudel kirjeldab edukalt kõigi seitsme katse kofeiini tõusu kineetikat hoolimata märkimisväärselt varieeruvusest amplituudis ( $2,5\text{--}6,8 \times F_0$ ). RMS väärtused jäävad vahemikku 0,040–0,105, kusjuures parim sobitamine saavutatakse katses c6 (RMS = 0,040) ja nõrgim katses c4\_cell2 (RMS = 0,105). Katses c1 alahindab mudel tõusu tipu amplituudi ligikaudu  $0,5 F/F_0$  võrra, mis viitab sellele, et antud rakus oli SR-i  $Ca^{2+}$  vabanemine kiirem kui mudeli RyR2 parameetristiku vaikeväärtused ennustavad.

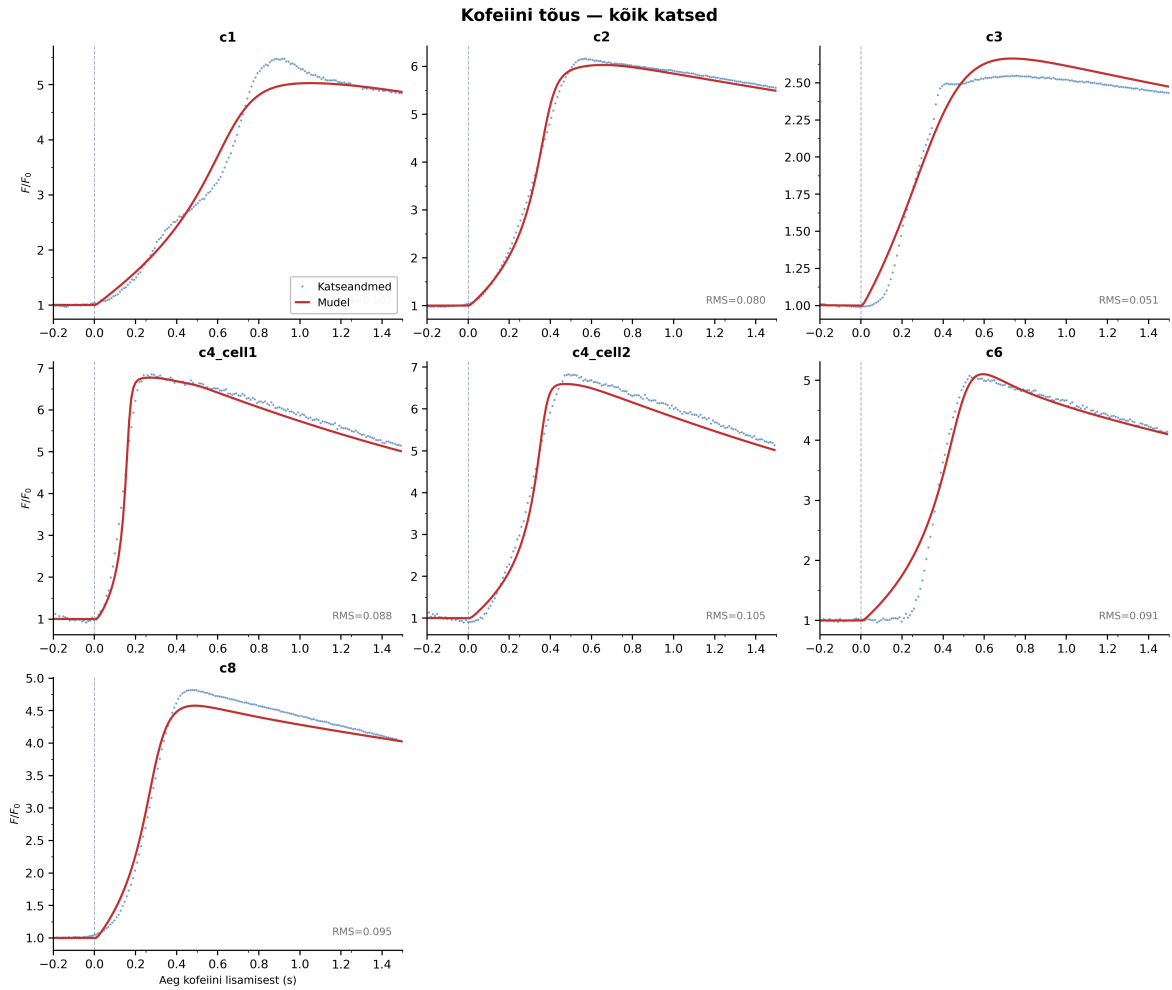
### 4.3 Sobitatud parameetrid

#### 4.3.1 Kofeiini parameetrite varieeruvus

Kofeiini  $Ca^{2+}$  tundlikkuse nihe  $\alpha_{caff}$  ja kineetiline skaleerimistegur  $\beta_{caff}$  varieeruvad katsete vahel märkimisväärselt, peegeldades rakudevahelist erinevust RyR2 kanalite kofeiinile reageerimisel. Mõlemad parameetrid on katseandmetest hästi identifitseeritavad, mida näitavad suhteliselt väiksed standardhälbed võrreldes parameetri väärtusega — erandiks osutub katse c6, kus  $\alpha_{caff}$  ja  $\beta_{caff}$  standardhälved on võrdlemisi suured, mis võib viidata nende parameetrite osalisele korrelatsioonile antud katse sobitamisel.

#### 4.3.2 Ioonkanali parameetrite identifitseeritavus ja anomaaliad

Tabelist 3 ilmneb mitu tähelepanuväärset mustrit.



**Joonis 18:** Kofeiini tõusu sobitamise tulemused kõigis seitsmes katses. Sinised punktid on katseandmed, punane joon on mudeli parim sobitamine.

**Tabel 3:** Sobitatud kofeiini parameetrid ja juhtivuse skaleerimistegurid kõigi katsete jaoks.  $\alpha_{caff}$ :  $Ca^{2+}$  tundlikkuse nihe ( $mM^{-1}$ );  $\beta_{caff}$ : kineetiline skaleerimistegur ( $mM^{-1}$ );  $s_{NCX}$ ,  $s_{SERCA}$ ,  $s_{PMCA}$ : juhtivuse skaleerimistegurid;  $s_{CaSR}$ : SR-i  $Ca^{2+}$  algväärtuse skaleerimistegur.

Katse	$\alpha_{caff}$	$\beta_{caff}$	$s_{NCX}$	$s_{SERCA}$	$s_{PMCA}$	$s_{CaSR}$	RMS
c1	$3,81 \pm 0,01$	$15,75 \pm 0,10$	$0,58 \pm 0,00$	$0,21 \pm 0,00$	$1,45 \pm 0,01$	$1,61 \pm 0,00$	<b>0,102</b>
c2	$3,51 \pm 0,03$	$8,24 \pm 0,17$	$0,42 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,01$	$1,50 \pm 0,04$	$1,73 \pm 0,00$	<b>0,080</b>
c3	$9,30 \pm 2,71$	$5,75 \pm 5,15$	$0,60 \pm 0,64$	$0,59 \pm 1,61$	$1,50 \pm 3,54$	$0,50 \pm 0,26$	<b>0,056</b>
c4_cell1	$4,21 \pm 0,00$	$4,60 \pm 0,01$	$0,93 \pm 0,00$	$0,20 \pm 0,00$	$1,35 \pm 0,00$	$1,99 \pm 0,00$	<b>0,088</b>
c4_cell2	$2,45 \pm 0,00$	$4,45 \pm 0,02$	$0,99 \pm 0,00$	$0,26 \pm 0,00$	$1,05 \pm 0,01$	$1,96 \pm 0,00$	<b>0,105</b>
c6	$7,20 \pm 0,05$	$9,12 \pm 0,11$	$1,06 \pm 0,00$	$0,20 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,00$	$1,23 \pm 0,00$	<b>0,040</b>
c8	$7,26 \pm 0,02$	$11,65 \pm 0,00$	$0,70 \pm 0,00$	$0,62 \pm 0,00$	$0,78 \pm 0,01$	$1,33 \pm 0,00$	<b>0,095</b>
Keskmine	5,39	8,51	0,76	0,33	1,12	1,48	
Standardhälve	2,33	3,82	0,22	0,18	0,45	0,48	

**NCX1 skaleerimistegur varieeruvus.**  $s_{NCX}$  varieerub katsete vahel vahemikus 0,42–1,06. Katsed c4\_cell1 (0,93) ja c4\_cell2 (0,99) on lähedal mudeli originaalparameetritele, mis viitab sellele, et nende rakkude NCX1 aktiivsus vastab Terkildseni mudeli vaikeväärtusele hästi. Seevastu katsed c2 (0,42) ja c3 (0,60) viitavad oluliselt vähenenud NCX1 aktiivsusele. See varieeruvus on kooskõlas kirjandusega: kofeiini transiendi languse kiirus peegeldab peamiselt NCX1 aktiivsust [3], ning NCX1 panuse varieeruvuses eraldatud kardiomyotsüütides on hästi dokumenteeritud [93]. Lisaks võivad isoleerimisprotsessist tingitud lühiajaline isheemia ja mehaaniline stress muuta sarkolemmaalsete kanalite ekspressiooni ja lokalisatsiooni [94], ning eraldatud rakud kaotavad naaberrakkudega elektrilise sidestuse *gap junction*’ide kaudu [95], mis normaaltingimustes mõjutab NCX1 tööd.

**SERCA skaleerimistegur.**  $s_{SERCA}$  jääb enamikus katsetes vahemikku 0,20–0,35, mis on märkimisväärselt madal võrreldes originaalparameetriga. Katse c8 on erand (0,62). Kuna SERCA aktiivsus avaldub peamiselt languse kineetikas, mitte tõusu amplituudis, võib madalate väärtuste taga olla identifitseeritavuse probleem: tõusufaasile keskenduva sobitamiskna tõttu ei ole SERCA panus andmetes piisavalt ekspresseeritud. Seda toetab asjaolu, et SERCA standardhälbed on kohati suured (c3: 1,61).

Alternatiivselt võib rolli mängida ATP defitsiit: isoleeritud rakud ei pruugi rakuvälisest lahusest saada piisavalt metaboliite, mistõttu ATP tootmine võib olla häiritud ning SERCA, mis on energiasõltuv pump, töötada allmahtuvusel. Samas tuleb arvestada, et isoleeritud rakud ei pea tegema mehaanilist tööd, mistõttu on ka ATP tarbimine oluliselt madalam võrreldes in situ olekuga. Kahe vastassuunalise mõju tõttu ei saa madala  $s_{SERCA}$  põhjuseks ATP puudust üheselt väita.

**PMCA skaleerimistegur.**  $s_{PMCA}$  varieerub vahemikus 0,20–1,50, keskmisega  $1,12 \pm 0,45$ . Enamikus katsetes (c1, c2, c3, c4\_cell1, c4\_cell2) jääb  $s_{PMCA}$  vahemikku 1,05–1,50, mis on lähedal originaalparameetritele. Erandlik on katse c6 ( $s_{PMCA} = 0,20$ ), mis asub alumisel piiril ning viitab kas drastiliselt vähenenud PMCA aktiivsusele selles rakus või sellele, et PMCA panus on antud katse sobitamisknas teistest liikmetest halvasti lahutatav.

**SR-i  $Ca^{2+}$  algväärtuse skaleerimistegur.** Välja arvatud katse c3, varieerub  $s_{CaSR}$  vahemikus 1,23 (c6) kuni 1,99 (c4\_cell1), keskmisega  $\approx 1,64$ . See tähendab, et sobitatud SR-i  $Ca^{2+}$  täituvustase on enamikus rakkudes oluliselt kõrgem kui Terkildseni mudeli vaikeväärtus, mis on kooskõlas kirjanduses täheldatuga: perioodiliselt stimuleeritud raku SR kipub laaduma kõrgemale tasemele kui puhkeolek üksi ennustaks [80]. Katse c3 erand ( $s_{CaSR} = 0,50$ ) käsitletakse allpool.

**c3 anomaalia.** Katse c3 eristub teistest mitmes aspektis:  $s_{CaSR} = 0,50$  on kõigist teistest drastiliselt madalam (teised: 1,23–1,99),  $\alpha_{caff} = 9,30$  on kõrgeim kõigi katsete seas ning  $s_{PMCA}$  standardhälve on 3,54, mis viitab halvale identifitseeritavusele. Need parameetrid on kooskõlas joonisel 15 nähtavaga: c3 tõusu amplituud on kõigist madalaim ( $\sim 2,5 \times F_0$ ), mis viitab erandlikult madalale SR-i  $Ca^{2+}$  tasemele mõõtmise hetkel. Madal SR-i täituvustase on füsioloogiliselt tavaline nähtus [93] ning ei anna alust katse c3 väljajätmiseks. Mudel on suuteline seda olekut kirjeldama, mida näitab ka madal RMS (0,056). Kõrge  $\alpha_{caff}$  on füsioloogiliselt loo-

giline kompensatsioon: madala SR-i täituvustaseme juures peab kofeiin RyR2-d tugevamalt sensibiliseerima mudelis, et saavutada täheldatud tõusu kiirus katses.

#### 4.4 Parameetrite skaneerimine

TRF-optimeerija tulemuste valideerimiseks ja kulufunktsiooni maastiku süstemaatiliseks kaardistamiseks viidi katse c8 jaoks läbi kuuedimensionaalne võresskaneerimine. Gradientipõhise TRF-algoritmi tundlikkus lokaalsetest miinimumidest ei välista ühegi algpunkti korral püüdumist halba lahendisse, mistõttu sõltumatu otsing üle kogu parameetriruumi pakub olulist täiendust.

##### 4.4.1 Skännimise ülesehitus

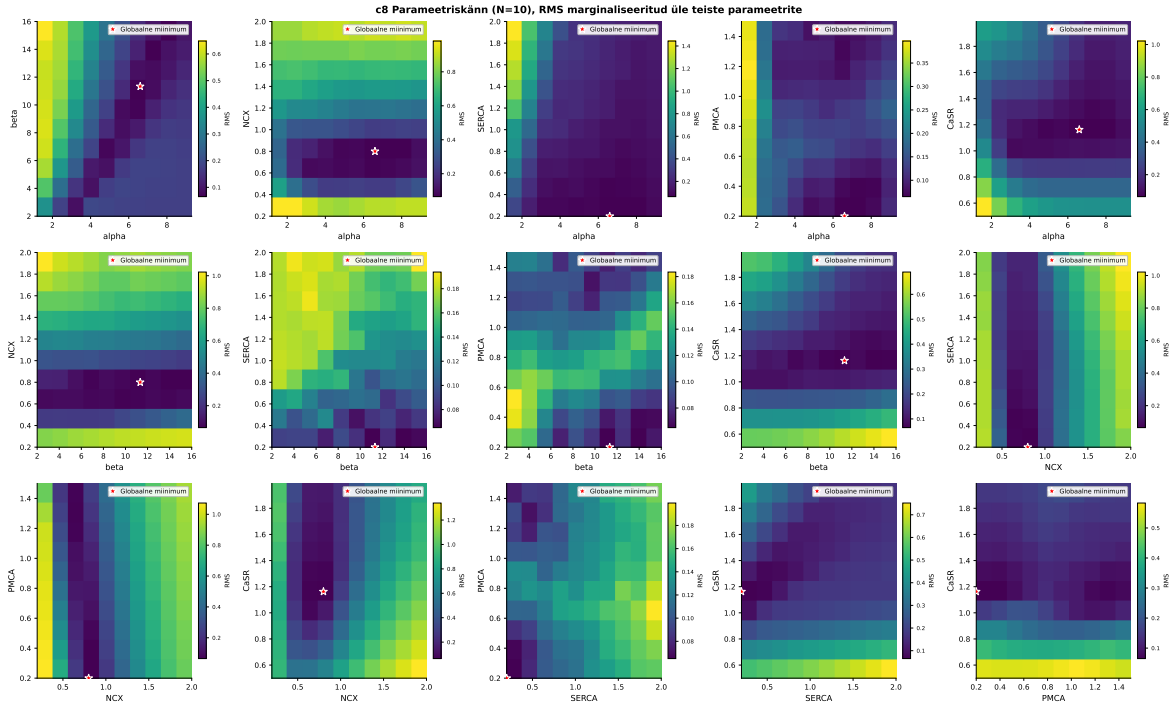
Konstrueeriti ühtlane võre  $N = 10$  punktiga iga parameetri kohta, hõlmates kuut sobitusparameetrit:  $\alpha_{caff}$ ,  $\beta_{caff}$ ,  $s_{NCX}$ ,  $s_{SERCA}$ ,  $s_{PMCA}$  ja  $s_{CaSR}$ . Kokku hinnati  $N^6 = 10^6$  parameetrikombinatsiooni, mis paralleliseeriti protsessori tuumade vahel. Kulufunktsiooni visualiseerimiseks kasutati kahemõõtmelist marginaalset projektsiooni: iga parameetripaari  $(\theta_i, \theta_j)$  soojuskaart näitab minimaalset RMS-i üle ülejäänud nelja parameetri. Nii esitatakse 6D maastik 15 paneeli kaudu, mis võimaldab tuvastada paaristatud miinimumstruktuure, korrelatsioone ja lamede piirkondade esinemist üksikutes dimensioonides.

Skaneerimine viidi läbi kahes etapis. Esimeses etapis kaardistati lai vahemik ( $\alpha_{caff} \in [2,0; 9,0]$ ,  $s_{NCX}$ ,  $s_{SERCA} \in [0,2; 2,0]$  jne), et tuvastada globaalse miinimumi asukoht kogu parameetriruumis (joonis 19). Teises etapis täpsustati otsingut  $\pm 1\sigma$  ümber parima tulemuse ( $\alpha_{caff} \in [5,99; 7,21]$ ,  $s_{NCX} \in [0,70; 0,90]$ ,  $s_{CaSR} \in [1,08; 1,24]$  jne), et hinnata globaalse miinimumi ümbrust kõrgema eraldusvõimega (joonis 20).

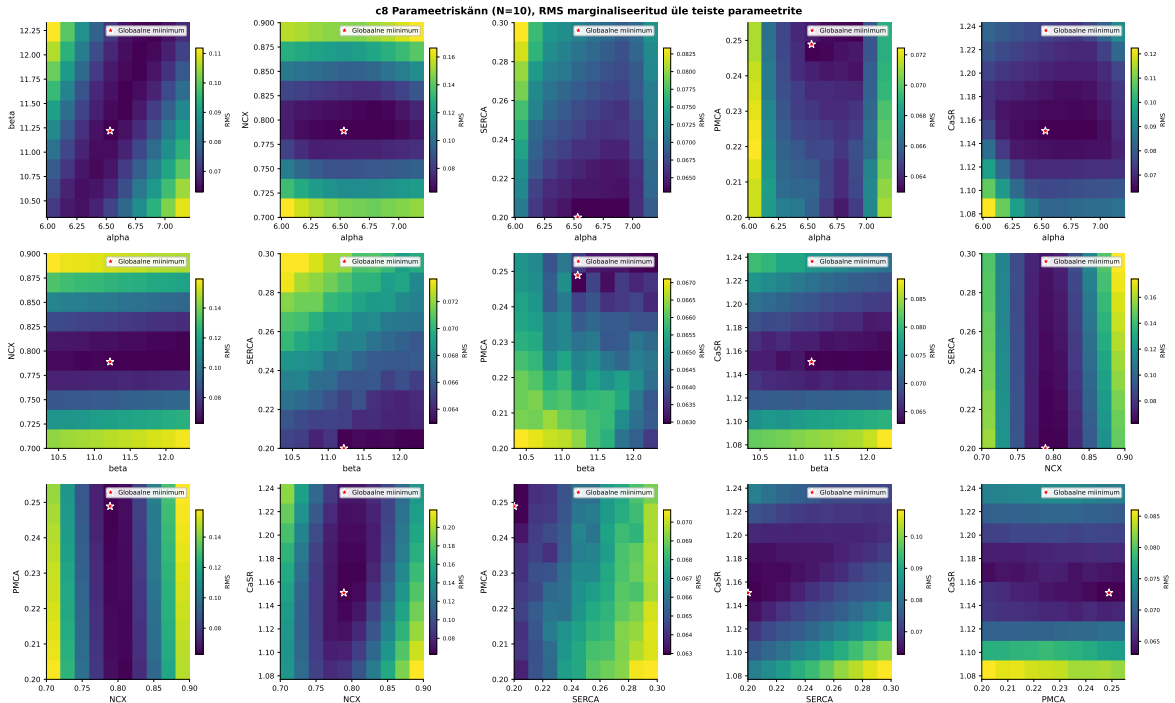
##### 4.4.2 Kulufunktsiooni maastiku analüüs

Laia skaneerimise tulemustest (joonis 19) ilmneb mitu olulist mustrit. Kofeiiniparameetrid  $\alpha_{caff}$  ja  $\beta_{caff}$  on selgelt lokaliseeritud: madala RMS-i piirkond on kontsentreeritud  $\alpha \approx 6$  ja  $\beta \approx 11$  ümber ning kumbagi parameetrit muutes tõuseb RMS järsult, eriti väiksemate väärtuste suunas.  $s_{NCX}$  on samuti mõõdukalt piiritletud ( $\approx 0,8$ ) ning  $s_{CaSR}$  juhib miinimumi  $\approx 1,2$  suunas.  $s_{SERCA}$  puhul asub globaalne miinimum aga pidevalt alumises otsas kõigi projektsioonide vältel. Veelgi selgemalt eristub  $s_{PMCA}$ : selle soojuskaardid on enamikus projektsioonides peaaegu ühtlaselt tumedad, mis tähendab, et skaneerimise vahemikus  $([0,2; 1,4])$  on kulufunktsioon  $s_{PMCA}$  suhtes väga lame — see parameeter on antud andmetest praktiliselt identifitseerimatu.

Täpsustatud skaneerimise (joonis 20) põhjal on  $\alpha_{caff}-\beta_{caff}$  ühisprojektsioon eriti informatiivne: selge, sügav ja kompaktne minimumipiirkond kinnitab, et mõlemad kofeiiniparameetrid on katse c8 puhul hästi identifitseeritavad.  $s_{SERCA}$  asub kõigis viies seda sisaldavas projektsioonides täpselt alumisel piiril (0,20), mis on kooskõlas §4.3 järelausega: SERCA mõju avaldub peamiselt languse kineetikas ning tõusufaasile piirduv sobitamisen ei suuda selle tegelikku väärtust andmetest üheselt määrata.  $s_{PMCA}$  on täpsustatud kitsamas vahemikus  $([0,20; 0,255])$  mõõdukalt piiritletud, globaalse miinimumiga  $\approx 0,25$  juures.



**Joonis 19:** Katse c8 kulufunktsiooni marginaliseeritud soojuskaardid laias parameetrivahemikus ( $N = 10, 10^6$  hindamist). Tume (violettne) värvus tähistab madalat (paremat) RMS-i, hele (kollane) kõrget RMS-i; punane täht märgib globaalset miinimumi.  $\alpha_{caff}$  ja  $\beta_{caff}$  on selgelt lokaliseeritud ( $\alpha \approx 6, \beta \approx 11$ ) ning  $s_{NCX}$  ( $\approx 0,8$ ) ja  $s_{CaSR}$  ( $\approx 1,2$ ) on mõeldukalt piiritletud. Seevastu  $s_{SERCA}$  asub minimumis kogu maastiku vältel alumises otsas ning  $s_{PMCA}$  soojuskaardid on paljudes projektsioonides ühtlaselt tumedad, mis viitab kulufunktsiooni madalale tundlikkusele nende parameetrite suhtes antud andmetel.



**Joonis 20:** Katse c8 kulufunktsiooni täpsustatud marginaliseeritud soojuskaardid  $\pm 1\sigma$  ümber parima tulemu-  
se ( $N = 10, 10^6$  hindamist). Globaalne miinimum (punane täht):  $\alpha_{caff} = 6,53, \beta_{caff} = 11,22, s_{NCX} = 0,79,$   
 $s_{SERCA} = 0,20, s_{PMCA} = 0,25, s_{CaSR} = 1,15, RMS = 0,063.$   $\alpha_{caff}-\beta_{caff}$  ühisprojektsioon näitab kompakset ja sü-  
gavat minimumipiirkonda.  $s_{SERCA}$  asub kõrgis viies seda hõlmavas projektsioonides täpselt alumisel piiril (0,20),  
kinnitades §4.3 järeldust SERCA kehva identifitseeritavuse kohta tõusufaasile piirdumas sobitamisknas.

### 4.4.3 Võrdlus TRF-tulemusega

Skännimise globaalne miinimum ( $RMS = 0,063$ ) on oluliselt parem kui TRF-optimeerija katse c8 tulemus ( $RMS = 0,095$ , tabel 3). Parameetriväärtustes on erinevused samuti märkimisväärsed: TRF leidis  $s_{SERCA} = 0,62$  ja  $s_{CaSR} = 1,33$ , samas kui skaneerimise miinimumis on  $s_{SERCA} = 0,20$  ja  $s_{CaSR} = 1,15$ . Kuna TRF leitud SERCA väärtus ( $0,62$ ) jääb väljapoole skaneerimise otsingupiirkonda ( $[0,20; 0,30]$ ), esindavad TRF ja skaneerimine eraldiseisvaid lokaalseid miinimume: TRF koondus kõrgema SERCA ja halvema RMS-iga piirkonda, mis on tüüpiline märk lokaalse miinimumi püüdest ka 20 algpunkti korral. Kofeiiniparameetrid on seevastu mõlemas lähenemises sarnased ( $\alpha_{caff} \approx 6,5-7,3$ ,  $\beta_{caff} \approx 11,2-11,7$ ), mis kinnitab nende robustsust erinevate otsingustrateegiatega suhtes ja bioloogilist tõlgendatavust.

### 4.5 Kokkuvõte

Laiendatud Terkildseni mudel koos kofeiini protokolliga rakendusega suudab edukalt sobitada kõigi seitsme erineva kofeiini transiendi kujuga. Kõigi katsete sobitamise keskmine RMS on  $0,081 \pm 0,024 F/F_0$  ühikutes, mis vastab ligikaudu 1–3% maksimaalsest transiendi amplituudist. Kofeiini parameetrid  $\alpha_{caff}$  ja  $\beta_{caff}$  on katseandmetest hästi identifitseeritavad ning nende varieeruvus on bioloogiliselt tõlgendatav rakudevahelise erinevusena RyR2 kanalite kofeiini tundlikkuses. Suurim kõrvalekalle esineb katses c1, kus mudel alahindab tõusu tipu amplituudi ning see võib peegeldada SR-i  $Ca^{2+}$  vabastamise kiirust, mis ületab mudeli RyR2 parameetristiku vaikevahemikku.

Juhtivuse skaleerimistegurid  $s_{NCX}$ ,  $s_{SERCA}$ ,  $s_{PMCA}$  ja  $s_{CaSR}$  peegeldavad rakudevahelist heterogeensust kaltsiumikäitluses ning võimaldavad mudelil kohaneda iga raku individuaalsete tingimustega. Enamikus katsetes on  $s_{CaSR} > 1$ , mis viitab sellele, et isoleeritud rakkude SR-i täituvustase ületab mudeli vaikeväärtust.  $s_{SERCA}$  kaldub süstemaatiliselt alumisele piirile, mis peegeldab selle parameetri kehta identifitseeritavust tõusufaasile piirduvas sobitamisaknas.  $s_{NCX}$  varieeruvus ( $0,42-1,06$ ) on bioloogiliselt tõlgendatav NCX1 aktiivsuse rakudevahelise erinevusena, mis avaldub selgelt languse kineetika kaudu.

Katse c8 parameetrite ruumi võresskaneerimine kinnitab TRF-sobituse peamisi järeldusi:  $\alpha_{caff}$  ja  $\beta_{caff}$  on hästi piiritletud ning  $s_{NCX}$  ja  $s_{CaSR}$  on mõõdukalt identifitseeritavad. Seevastu  $s_{SERCA}$  asub kõigis projektsioonides alumisel piiril, mis toetab järeldust, et SERCA panust ei suuda tõusufaasile piirduv sobitamine andmetest üheselt eraldada. Lisaks tuvastas skaneerimine globaalse miinimumi ( $RMS = 0,063$ ), mis on parem kui TRF tulemus ( $RMS = 0,095$ ), näidates, et TRF koondus katse c8 puhul lokaalsesse miinimumi ja parameetrite ruumis eksisteerib vähemalt kaks lokaalset miinimumi.

## 5 Arutelu

### 5.1 Mudeli võimekus kofeiini transiendi kirjeldamisel

Käesolevas töös laiendati Terkildseni PHN-mudelit kofeiini otsese RyR2 sensibilliseerimise kirjeldusega ning sobitati mudel seitsmele eraldatud roti ventrikulaarse südameraku kofeiini transiendile. Kriitilise tähtsusega on see, et need seitse katset ei ole üksteisega sarnased: transiendi amplituud varieerub ligikaudu 2,7-kordselt ( $2,5\text{--}6,8 \times F_0$ ), SR-i täituvustase erineb ligi neljakordselt ( $s_{\text{CaSR}} \in [0,50; 1,99]$ ), languse kineetika varieerub katseti märkimisväärselt ning vähemalt üks katse (c3) esindab erandlikult madalat SR-i laadungustaset. Ometi suutis üks ühine mudeliraamistik, muutes ainult rakuspetsiifilisi parameetreid, sobitada kõigi seitsme katse kofeiini tõusu kineetikaga — saavutades keskmise RMS  $0,081 \pm 0,024 F/F_0$  ühikutes. See on tugev argument mudeli üldistuvuse kasuks: laiendatud PHN-mudel ei ole ühe konkreetse katse suhtes optimeeritud, vaid suudab reprodutseerida kardiomüotsüütide kaltsiumidünaamika olulist fenotüüpilist mitmekesisust. Leitud protokoll, kus kofeiin mõjutab samaaegselt nii RyR2  $\text{Ca}^{2+}$  tundlikkust ( $K_d^{\text{eff}}$ ) kui ka avanemis- ja sulgemiskineetikat ( $\xi$ ), on seega piisavalt paindlik, et kirjeldada seda varieeruvust ühe mehhanismipõhise raamistikuga.

Mudel kirjeldab kofeiini poolt esile kutsutud SR-i  $\text{Ca}^{2+}$  vabanemise mehhanismi, mida kirjanduses on hästi dokumenteeritud: kofeiin alandab RyR2 kaltsiumiaktivatsiooni läve, põhjustades SR-i tühjenemise sõltumata L-tüüpi kanalite eelnevast aktivatsioonist [3, 5]. See mudeli omadus peegeldub ka sobitatud  $\alpha_{\text{caff}}$  väärtuste (vahemikus  $2,45\text{--}9,30 \text{ mM}^{-1}$ ) rakudevahelises varieeruvuses: kõrgemad  $\alpha_{\text{caff}}$  väärtused (c3: 9,30; c8: 7,26) viitavad tugevamale RyR2  $\text{Ca}^{2+}$  tundlikuse nihkele kofeiini toimel.

### 5.2 SR-i kaltsiumi täituvustase ja selle varieeruvus

Kõige märkimisväärsem rakudevaheline erinevus avaldus SR-i  $\text{Ca}^{2+}$  algväärtuse skaleerimisteguris  $s_{\text{CaSR}}$ , mis varieerus vahemikus 0,50–1,99. See peegeldab otse SR-i täituvustaset mõõtmise hetkel, kuna kofeiini transiendi amplituud korreleerub SR-i  $\text{Ca}^{2+}$  sisaldusega [3, 57]. Katse c3 erandlikult madal  $s_{\text{CaSR}} = 0,50$  on kooskõlas joonisel 15 nähtava madala amplituudiga ( $\sim 2,5 \times F_0$ ) ning on füsioloogiliselt tavaline nähtus eraldatud rakkudes [94]. Oluline on rõhutada, et madal SR-i täituvustase ei viita probleemidele katse kvaliteediga, vaid peegeldab loomulikku varieeruvust SR-i  $\text{Ca}^{2+}$  tasakaaluolekus erinevate rakkude vahel.

Samuti tähelepanuväärne on asjaolu, et kõik kofeiini transiendid stabiliseeruvad  $t > 10$  s järel  $\sim 1,3\text{--}1,8 \times F_0$  tasemel, mitte algtasemele. See on ootuspärane: kofeiini juuresolekul ei saa SERCA SR-i täis laadida — RyR2 on pidevalt avatud olekus — mistõttu tsütosoolne kaltsium jääb püsivalt kõrgendatuks seni, kuni kofeiin eemaldatakse.

### 5.3 NCX ja SERCA parameetrite identifitseeritavus

NCX ja SERCA skaleerimistegurite ( $s_{\text{NCX}}$ ,  $s_{\text{SERCA}}$ ) suuremad standardhälbed ning  $s_{\text{SERCA}}$  süstemaatiliselt madalad väärtused viitavad nende parameetrite piiratud identifitseeritavusele. Sobitamine viidi läbi kogu kofeiinipulsi akna ulatuses, hõlmates nii tõusu kui langust, nagu katse c2 täissobituse näide (joonis 17) illustreerib. Hoolimata sellest jääb  $s_{\text{SERCA}}$  hal-

vasti määratuks, kuna NCX ja SERCA mõjud languse kineetikale võivad olla tugevalt korreleeritud: mõlemad eemaldavad  $\text{Ca}^{2+}$  tsütosolist ning nende individuaalseid panuseid ei pruugi mudel kofeiini transiendi kujust üheselt lahutada [3].

NCX aktiivsuse varieeruvus ( $s_{\text{NCX}} : 0,42-1,06$ ) on kooskõlas kirjandusega. Kofeiini transiendi languse kiirus on tuntud NCX1 aktiivsuse indikaator, kuna kofeiini juuresolekul on SERCA pärsitud ja NCX1 on peamine  $\text{Ca}^{2+}$  eemaldamise mehhanism [3]. Eraldatud rakkudes on NCX aktiivsuse rakudevaheline varieeruvus hästi dokumenteeritud nähtus ning võib osaliselt tuleneda ka isoleerimisprotsessist: lühiajaline isheemia südame eemaldamise ja ensümaatilise dissotsieerimise käigus võib muuta sarkolemmaalsete kanalite ekspressiooni ja lokalisatsiooni [94]. Lisaks kaotavad eraldatud kardiomyotsüüdid naaberrakkudega elektrilise sidestuse *gap junction*'ide kaudu [95], mis normaaltingimustes mõjutab NCX1 tööd süntsüüt-silises kontekstis.

## 5.4 Töö piirangud

Käesoleval lähenemisel on mitu olulist piirangut, mis tuleb tulemuste tõlgendamisel arvesse võtta.

**Mudeli lihtsustused.** Terkildseni PHN-mudel ei sisalda mitmeid füsioloogilisi mehhanisme, mis võivad mõjutada kofeiini transiendi kuju. Näiteks kaltsiumist sõltuv inaktiivatsioon (CDI), mitokondriaalse  $\text{Ca}^{2+}$  omastamine ning CaMKII-vahendatud RyR2 fosforüülmise [3]. Need mehhanismid võivad osaliselt selgitada süstemaatilist kõrvalekalde tõusu tipus katses c1, kus mudel alahindab amplituudi  $\sim 0,5 F/F_0$  võrra.

**Väike valim.** Seitsme rakuga valim on liiga väike, et teha üldistusi populatsiooni tasandil. Sobitatud parameetrite varieeruvust saab käesoleva töö raames tõlgendada ainult kirjeldavalt, mitte statistiliselt järelduslikult.

**Sooline esinduslikkus.** Käesoleva töö kontekstis on oluline märkida, et ka eksperimentaalsetes kardiomyotsüütide mudelites on traditsiooniliselt kasutatud isasloomade rakke, mistõttu sooliste erinevuste arvestamine mudelites on tulevikusuuna arenguvaldkond [96].

## 5.5 Järeldused ja edasised suunad

Käesolev töö demonstreerib, et Terkildseni PHN-mudeli laiendamine kofeiini protokollirakendusega on sobiv lähenemine SR-i  $\text{Ca}^{2+}$  käsitlemise kirjeldamiseks eraldatud kardiomyotsüütides. Mudel kirjeldab edukalt nii tõusu amplituudi varieeruvust kui ka kineetikat erinevates rakkudes, ning identifitseerib hästi kofeiini primaarparameetreid ( $\alpha_{\text{caff}}$ ,  $\beta_{\text{caff}}$ ,  $s_{\text{CaSR}}$ ). Seega leidis töö alguses püstitatud hüpotees kinnitust — kombineeritud kineetika- ja tasakaalu-muutusena kirjeldatud RyR2 sensibiliseerimine on piisav, et reprodutseerida erinevate SR-i täituvustasemetega rakkude kofeiini transiente.

Loomulik järgmine samm oleks teha eksperimendid kus SERCA on pärsitud tapsiagarginiga, et NCX aktiivsust isoleeritult hinnata [3]. See võimaldaks täiendavalt valideerida ka NCX ja SERCA parameetreid.

## 6 Viited

- [1] WHO analüütikud. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>. Viimati kasutatud: 02.05.2026. 2020.
- [2] World Health Organization. *Cardiovascular diseases (CVDs)*. Viimati kasutatud 05.02.2026. World Health Organization. Juuli 2025. URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
- [3] Donald M. Bers. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. 2. väljaanne. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002. ISBN: 978-0-7923-6544-5. DOI: 10.1007/978-94-010-0658-3.
- [4] Arnold M. Katz. *Physiology of the Heart*. 5. väljaanne. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. ISBN: 978-1-60831-171-2.
- [5] Hyun Kong *et al.* „Caffeine induces Ca<sup>2+</sup> release by reducing the threshold for luminal Ca<sup>2+</sup> activation of the ryanodine receptor“. *Biochemical Journal* 414.3 (2008), lk. 441–452. DOI: 10.1042/BJ20080489.
- [6] M Saleet Jafri. „Models of excitation–contraction coupling in cardiac ventricular myocytes“. *Bioinformatics and Drug Discovery* (2012), lk. 309–335.
- [7] J. R. Terkildsen *et al.* „Using Physiome standards to couple cellular mechanics to tissue models“. *Interface Focus* 1.3 (2008), lk. 338–348. DOI: 10.1098/rsfs.2010.0005.
- [8] Hamed Karimi *et al.* „A Unified Platform for FCS and RICS Analysis with Advanced Statistical Inference“. *ACS Omega* 11 (2026), lk. 19201–19219. DOI: 10.1021/acsomega.5c12269.
- [9] Liina-Liis Nõmme ja Silver Schnuri. *Süda*. <https://elundkonnad.weebly.com/suumlda.html>. Viimati kasutatud 05.02.2026. HITSA Innovatsioonikeskus, pole saadaval.
- [10] Institute for Quality ja Efficiency in Health Care. *In brief: What does blood do?* NCBI Bookshelf, National Library of Medicine, National Institutes of Health. Uuendatud 16.03.2023; järgmine uuendus planeeritud 2026; Viimati kasutatud 05.02.2026. InformedHealth.org [Internet]. Cologne, Germany: Institute for Quality ja Efficiency in Health Care (IQWiG), 2023. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279392/>.
- [11] Cleveland Clinic. *Kidney*. <https://my.clevelandclinic.org/health/body/21824-kidney>. Viimati uuendatud 05.11.2025; Viimati kasutatud 05.02.2026. Cleveland Clinic Health Library, 2025.
- [12] J. Gordon Betts *et al.* *Anatomy and Physiology 2e*. Viimati kasutatud 05.02.2026. Houston, Texas: OpenStax, 2022. Ptk 3.1.
- [13] Arthur C. Guyton ja John E. Hall. *Textbook of Medical Physiology*. 11. väljaanne. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2006. ISBN: 978-0-7216-0240-0.
- [14] Allan Lorents. *Anatoomia Ja Füsioloogia*. Viimati kasutatud: 05.02.2026. pole saadaval. URL: [https://www.hariduskeskus.ee/opiobjektid/anatoomia/?S%C3%9CDA.\\_VERERINGE.\\_VERI\\_\\_VERERINGE](https://www.hariduskeskus.ee/opiobjektid/anatoomia/?S%C3%9CDA._VERERINGE._VERI__VERERINGE).
- [15] British Heart Foundation. *How your heart works*. Viimati kasutatud 05.02.2026. 2024.

- [16] John B. West. *Respiratory Physiology: The Essentials*. 9. väljaanne. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2012. ISBN: 978-1-4511-1877-4.
- [17] GeeksforGeeks. *Alveoli Diagram*. 2024. URL: <https://www.geeksforgeeks.org/biology/alveoli-diagram/> (vaadatud 08.05.2026).
- [18] Mark L Entman *et al.* „Human cardiovascular system“. *Encyclopædia Britannica* (2020).
- [19] OpenStax. *Anatomy and Physiology 2e*. Viimati vaadatud 09.05.2026. litsentseeritud vastavalt CC BY 3.0 litsentsile. OpenStax, 2022. URL: <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology-2e>.
- [20] Nicholas J. Severs. „The cardiac muscle cell“. *BioEssays* 22.2 (2000), lk. 188–199. DOI: 10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<188::AID-BIES10>3.0.CO;2-T.
- [21] Lionel H. Opie. *Heart Physiology: From Cell to Circulation*. 4. väljaanne. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. ISBN: 978-0-7817-4655-5.
- [22] Mark R. Boyett, Haruo Honjo ja Ichiro Kodama. „The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure“. *Cardiovascular Research* 47.4 (2000), lk. 658–687. DOI: 10.1016/S0008-6363(00)00135-8.
- [23] Halina Dobrzynski, Mark R. Boyett ja Robert H. Anderson. „New insights into pacemaker activity: promoting understanding of sick sinus syndrome“. *Circulation* 115.14 (2007), lk. 1921–1932. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.616011.
- [24] Dario DiFrancesco. „The role of the funny current in pacemaker activity“. *Circulation Research* 106.3 (2010), lk. 434–446. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.208041.
- [25] Edward G. Lakatta ja Dario DiFrancesco. „What keeps us ticking: a funny current, a calcium clock, or both?“ *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 47.2 (2009), lk. 157–170. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2009.03.022.
- [26] Gijs Schram *et al.* „Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function“. *Circulation Research* 90.9 (2002), lk. 939–950. DOI: 10.1161/01.RES.0000018611.09460.F3.
- [27] Andrew E. Epstein *et al.* „ACC/AHA/HRS 2008 Guidelines for Device-Based Therapy of Cardiac Rhythm Abnormalities“. *Journal of the American College of Cardiology* 51.21 (2008), e1–e62. DOI: 10.1016/j.jacc.2008.02.032.
- [28] Rafik Tadros *et al.* „Sex differences in cardiac electrophysiology and clinical arrhythmias: epidemiology, therapeutics, and mechanisms“. *Canadian Journal of Cardiology* 30.7 (2014), lk. 783–792. DOI: 10.1016/j.cjca.2014.03.032.
- [29] Nisha Duma *et al.* „Representation of women in cardiovascular clinical trials“. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 38.3 (2018), lk. 534–543. DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.309513.
- [30] D. Papadimitriou *et al.* „The use of mice and rats as animal models for cardiopulmonary resuscitation research“. *Laboratory Animals* 42.3 (2008), lk. 265–276. DOI: 10.1258/1a.2007.006035.

- [31] Jeanne M. Nerbonne ja Robert S. Kass. „Molecular physiology of cardiac repolarization“. *Physiological Reviews* 85.4 (2005), lk. 1205–1253. DOI: 10.1152/physrev.00002.2005.
- [32] MedVet. *Rat History and Care Recommendations*. 2016. URL: <https://www.medvet.com/rat-history-care-recommendations/> (vaadatud 08.05.2026).
- [33] World Population Review. *Life Expectancy by Country 2026*. 2026. URL: <https://worldpopulationreview.com/country-rankings/life-expectancy-by-country> (vaadatud 08.05.2026).
- [34] Sami F. Noujaim *et al.* „From mouse to whale: a universal scaling relation for the PR interval of the electrocardiogram of mammals“. *Circulation* 110.18 (2004), lk. 2802–2808. DOI: 10.1161/01.CIR.0000146785.12222.89.
- [35] Tudor-Alexandru Popoiu, Christoph Maack ja Edoardo Bertero. „Mitochondrial calcium signaling and redox homeostasis in cardiac health and disease“. *Frontiers in molecular medicine* 3 (2023), lk. 1235188.
- [36] Nicholas Stafford *et al.* „The plasma membrane calcium ATPases and their role as major new players in human disease“. *Physiological reviews* 97.3 (2017), lk. 1089–1125.
- [37] Achilles J Pappano ja Withrow Gil Wier. *Cardiovascular Physiology-E-Book: Cardiovascular Physiology-E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2018.
- [38] B Hille. „Ion channels of excitable membranes. 3rd ed2001“. *Sunderland, Mass.: Sinauer. xviii* 8 (2001).
- [39] AmazonW3. [https://s3.amazonaws.com/static.wd7.us/fffd/Action\\_potential.png](https://s3.amazonaws.com/static.wd7.us/fffd/Action_potential.png). Viimati kasutatud: 15.05.2024. 2024.
- [40] Denis Noble. „A modification of the Hodgkin—Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pacemaker potentials“. *The Journal of physiology* 160.2 (1962), lk. 317.
- [41] Arthur CMD Guyton. *Text book of medical physiology*. China, 2006.
- [42] Ralf Magnus Palmiste. *Südamelihasku kaltsiumi dünaamika matemaatilise modelleerimise kreatiini puudulikes hirtes*. 2024.
- [43] Alexandre Fabiato. „Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum“. *American Journal of Physiology* 245.1 (1983), lk. C1–C14. DOI: 10.1152/ajpcell.1983.245.1.C1.
- [44] William A. Catterall *et al.* „International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels“. *Pharmacological Reviews* 57.4 (2005), lk. 411–425. DOI: 10.1124/pr.57.4.5.
- [45] Matteo E. Mangoni ja Joël Nargeot. „Genesis and regulation of the heart automaticity“. *Physiological Reviews* 88.3 (2008), lk. 919–982. DOI: 10.1152/physrev.00018.2007.
- [46] Heping Cheng, W. Jonathan Lederer ja Mark B. Cannell. „Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle“. *Science* 262.5134 (1993), lk. 740–744. DOI: 10.1126/science.8235594.

- [47] David A. Eisner *et al.* „Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart“. *Circulation Research* 121.2 (2017), lk. 181–195. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310230.
- [48] Andrew W. Trafford *et al.* „Modulation of CICR has no maintained effect on systolic Ca<sup>2+</sup>: simultaneous measurements of sarcoplasmic reticulum and sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> fluxes in rat ventricular myocytes“. *Journal of Physiology* 522.2 (2000), lk. 259–270. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2000.t01-2-00259.x.
- [49] David H. MacLennan ja Evangelia G. Kranias. „Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility“. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4.7 (2003), lk. 566–577. DOI: 10.1038/nrm1151.
- [50] Alicia Mattiazzi ja Evangelia G. Kranias. „The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease“. *Frontiers in Pharmacology* 5 (2014), lk. 5. DOI: 10.3389/fphar.2014.00005.
- [51] Rikke Birkedal *et al.* „Ontogeny of cardiomyocytes: ultrastructure optimization to meet the demand for tight communication in excitation–contraction coupling and energy transfer“. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 377.1864 (2022), lk. 20210321.
- [52] David A. Brown *et al.* „Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure“. *Nature Reviews Cardiology* 14 (2017), lk. 238–250.
- [53] Bertil B. Fredholm *et al.* „Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use“. *Pharmacological Reviews* 51.1 (1999), lk. 83–133.
- [54] Niels P. Riksen, Gerard A. Rongen ja Paul Smits. „Acute and long-term cardiovascular effects of coffee: implications for coronary heart disease“. *Pharmacology & Therapeutics* 121.2 (2009), lk. 185–191. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2008.10.006.
- [55] Paolo Palatini *et al.* „CYP1A2 genotype modifies the association between coffee intake and the risk of hypertension“. *Journal of Hypertension* 27.8 (2009), lk. 1594–1601. DOI: 10.1097/HJH.0b013e32832b9990.
- [56] Mario Cheng *et al.* „Caffeine intake and atrial fibrillation incidence: dose response meta-analysis of prospective cohort studies“. *Canadian Journal of Cardiology* 30.4 (2014), lk. 448–454. DOI: 10.1016/j.cjca.2013.12.026.
- [57] Jose Wilson M. Bassani, Rosana A. Bassani ja Donald M. Bers. „Calibration of indo-1 and resting intracellular [Ca]<sub>i</sub> in intact rabbit cardiac myocytes“. *Biophysical Journal* 68.4 (1995), lk. 1453–1460. DOI: 10.1016/S0006-3495(95)80318-8.
- [58] Donald M. Bers. „Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in systolic and diastolic function“. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 62 (2013), lk. 490–499. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.01.028.
- [59] [https://www.regionaalhaigla.ee/sites/default/files/documents/Sudamesisene\\_elekterfus\\_ioloogiline\\_uuring\\_ja\\_rutmihairete\\_kateeterablatsioon.pdf](https://www.regionaalhaigla.ee/sites/default/files/documents/Sudamesisene_elekterfus_ioloogiline_uuring_ja_rutmihairete_kateeterablatsioon.pdf). Viimati kasutatud: 06.02.2026. 2022.

- [60] Christopher O'Shea *et al.* „Cardiac optical mapping—State-of-the-art and future challenges“. *The international journal of biochemistry & cell biology* 126 (2020), lk. 105804.
- [61] The Nobel Committee for Physiology or Medicine. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1991 – Press Release*. 1991. URL: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1991/press-release/>.
- [62] Louis J DeFelice. *Electrical properties of cells: patch clamp for biologists*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [63] D. M. Bers. *Excitation–Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. 2nd. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. DOI: 10.1007/978-94-010-0658-3.
- [64] Joshua Mayourian, Eric A Sobie ja Kevin D Costa. „An introduction to computational modeling of cardiac electrophysiology and arrhythmogenicity“. *Experimental Models of Cardiovascular Diseases: Methods and Protocols* (2018), lk. 17–35.
- [65] Jason H Yang ja Jeffrey J Saucerman. „Computational models reduce complexity and accelerate insight into cardiac signaling networks“. *Circulation research* 108.1 (2011), lk. 85–97.
- [66] Robert Plonsey, Roger C Barr ja A Bioelectricity. „Quantitative Approach“. *Cham, Switzerland: Springer* (2007).
- [67] David E. Goldman. „Potential, impedance, and rectification in membranes“. *Journal of General Physiology* 27.1 (1943), lk. 37–60. DOI: 10.1085/jgp.27.1.37.
- [68] Alan L. Hodgkin ja Bernard Katz. „The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid“. *Journal of Physiology* 108.1 (1949), lk. 37–77. DOI: 10.1113/jphysiol.1949.sp004310.
- [69] S. V. Pandit *et al.* „A mathematical model of action potential heterogeneity in adult rat left ventricular myocytes“. *Biophysical Journal* 81.6 (2001), lk. 3029–3051. DOI: 10.1016/S0006-3495(01)75943-7.
- [70] Alan L Hodgkin ja Andrew F Huxley. „A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve“. *The Journal of physiology* 117.4 (1952), lk. 500.
- [71] R. E. McAllister, Denis Noble ja Richard W. Tsien. „Reconstruction of the electrical activity of cardiac Purkinje fibres“. *The Journal of Physiology* 251.1 (1975), lk. 1–59. DOI: 10.1113/jphysiol.1975.sp011080.
- [72] George W. Beeler ja Harald Reuter. „Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibres“. *The Journal of Physiology* 268.1 (1977), lk. 177–210. DOI: 10.1113/jphysiol.1977.sp011853.
- [73] Dario DiFrancesco ja Denis Noble. „A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes“. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 307.1133 (1985), lk. 353–398. DOI: 10.1098/rstb.1985.0001.

- [74] Ching-Hsing Luo ja Yoram Rudy. „A model of the ventricular cardiac action potential. Depolarization, repolarization, and their interaction“. *Circulation Research* 68.6 (1991), lk. 1501–1526. DOI: 10.1161/01.RES.68.6.1501.
- [75] Ching-Hsing Luo ja Yoram Rudy. „A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes“. *Circulation Research* 74.6 (1994), lk. 1071–1096. DOI: 10.1161/01.RES.74.6.1071.
- [76] Vladimir E Bondarenko *et al.* „Computer model of action potential of mouse ventricular myocytes“. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 287.3 (2004), H1378–H1403.
- [77] J. L. Greenstein ja R. L. Winslow. „An integrative model of the cardiac ventricular myocyte incorporating local control of  $\text{Ca}^{2+}$  release“. *Biophysical Journal* 83.6 (2002), lk. 2918–2945. DOI: 10.1016/S0006-3495(02)75301-0.
- [78] Steven A Niederer ja Nicolas P Smith. „A mathematical model of the slow force response to stretch in rat ventricular myocytes“. *Biophysical journal* 92.11 (2007), lk. 4030–4044.
- [79] R. Hinch *et al.* „A simplified local control model of calcium-induced calcium release in cardiac ventricular myocytes“. *Biophysical Journal* 87.6 (2004), lk. 3723–3736. DOI: 10.1529/biophysj.104.049973.
- [80] Thomas R. Shannon, Kenneth S. Ginsburg ja Donald M. Bers. „Reverse mode of the sarcoplasmic reticulum calcium pump and load-dependent cytosolic calcium decline in voltage-clamped cardiac myocytes“. *Biophysical Journal* 78.1 (2000), lk. 322–333.
- [81] *Terkildsen PHN Model C Code*. CellML Model Repository. [https://models.physiomeproject.org/exposure/e8ee336095b8955f75a3e6c09b791d42/Pandit\\_Hinch\\_Niederer.cellml/@cellml\\_codegen/C](https://models.physiomeproject.org/exposure/e8ee336095b8955f75a3e6c09b791d42/Pandit_Hinch_Niederer.cellml/@cellml_codegen/C), viimati vaadatud 01.05.2026.
- [82] Pauli Virtanen *et al.* „SciPy 1.0: Fundamental Algorithms for Scientific Computing in Python“. *Nature Methods* 17 (2020), lk. 261–272. DOI: 10.1038/s41592-019-0686-2.
- [83] Gerhard Wanner ja Ernst Hairer. *Solving ordinary differential equations II*. Köide 375. Springer Berlin Heidelberg New York, 1996.
- [84] Alan C Hindmarsh. *Toward a systematized collection of ODE solvers*. Tehniline raport. Lawrence Livermore National Lab., CA (USA), 1982.
- [85] Kyle R Gee *et al.* „Chemical and physiological characterization of fluo-4  $\text{Ca}^{2+}$ -indicator dyes“. *Cell calcium* 27.2 (2000), lk. 97–106.
- [86] Archibald Vivian Hill. „The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves“. *J. physiol.* 40 (1910), lk. iv–vii.
- [87] ERIC Rousseau, JEFFREY S Smith ja GERHARD Meissner. „Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single  $\text{Ca}^{2+}$  release channel“. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 253.3 (1987), lk. C364–C368.
- [88] Ken Dill ja Sarina Bromberg. *Molecular driving forces: statistical thermodynamics in biology, chemistry, physics, and nanoscience*. Garland Science, 2010.

- [89] William H Press. *Numerical recipes 3rd edition: The art of scientific computing*. Cambridge university press, 2007.
- [90] Elisa Bovo *et al.* „Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak by cytosolic Ca<sup>2+</sup> in rabbit ventricular myocytes“. *The Journal of physiology* 589.24 (2011), lk. 6039–6050.
- [91] CL Overend, DA Eisner ja SC O’Neill. „The effect of tetracaine on supontaneous Ca<sup>2+</sup> release and sarcoplasmic reticulum calcium content in rat ventricular myocytes“. *The Journal of physiology* 502.3 (1997), lk. 471–479.
- [92] Steven H Strogatz. *Nonlinear dynamics and chaos: with applications to physics, biology, chemistry, and engineering*. Chapman ja Hall/CRC, 2024.
- [93] S Kettlewell *et al.* „Changes of intra-mitochondrial Ca<sup>2+</sup> in adult ventricular cardiomyocytes examined using a novel fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicator targeted to mitochondria“. *Journal of molecular and cellular cardiology* 46.6 (2009), lk. 891–901.
- [94] William E Louch, Katherine A Sheehan ja Beata M Wolska. „Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer“. *Journal of molecular and cellular cardiology* 51.3 (2011), lk. 288–298.
- [95] Nicholas J Severs. „Gap junction remodeling and cardiac arrhythmogenesis: cause or coincidence?“ *Journal of cellular and molecular medicine* 5.4 (2001), lk. 355–366.
- [96] Stacie E. Geller *et al.* „The more things change, the more they stay the same: a study to evaluate compliance with inclusion and assessment of women and minorities in randomized controlled trials“. *Academic Medicine* 93.4 (2018), lk. 630–635. DOI: 10.1097/ACM.0000000000002027.

## 7 Tänuavaldus

Minu suureks rõõmuks oma haridusteel on olla loodusteadlaste ridades. Alates Salupere mehhaanikast, kus ta süstis minusse usku, et füüsika ei ole tegelikult raske, lihtsalt mina olin esimesel aastal lodev ja segaduses.

Samuti toon esile Alar Leibaku, kes tegi mulle teise tiiruga selgeks tõenäosuse ning innustas mind tagant matemaatikaga.

Dmitri Kartofelev, kes näitas mulle kaose põnevat maailma, kuigi objektiivselt olin ma vist tema nõrgim õpilane eelmine semester. Alati oli toeks ka LÜK, kus sain lootust aineid läbida. Samuti tahan tänada oma sõpru, jalgpallimeeskonda ja peret, et nad olid olemas ja aitasid mul puhata ja mõtestada oma tegevusi.

Kogu sellel teel oli ka minu suureks kaaslaseks minu esimene armastus, milleks on hip-hop. Alates MF DOOMist, Eminemist ja teised, lõpetades Kendricku ja Tyler the Creatoriga. Ilma selle muusika ja kultuurita ei oleks ma oma identiteeti leidnud sellel magistri teekonnal. Olles seal nii heas kui halvas nagu olid ka mu pere ja sõbrad. Seega, jätkaks lugejale ühe luuletuse:

Ma mäletan sa olid konfliktis  
Väärkohtlemas oma jõudu  
Mõnikord ma tegin sama  
Kuritarvitasin oma jõudu täis vimma

Vimm mis muutus sügavaks depressiooniks  
Leidsin ennast karjumas hostelitoas  
Ma ei tahtnud ennast hävitada  
Luisa kurjus oli kõikjal mu ümber

Seega ma läksin otsima vastuseid  
Kuniks ma jõudsin koju  
Aga see ei peatanud häbi  
Loendades oma teenitud armide

Pani mind mõistma kui nõrk mu vundament on  
Kuid samal ajal kui mu armsamad jätkasid oma igapäevast sõda kodus  
Sisenesin ma uude sõtta  
Sõtta mis seisnes apartiidis ja diskriminatsioonis

Soovisin selle peale naasta koju ja jagada sõpradega mida õppisin  
See sõna oli respekt  
See et sa kannad teisi värve kui mina  
Ei tähenda et ma ei saa austada sind kui inimesena

Unustades kõik selle valu mida üksteisele põhjustasime  
Sest sind respektierides, me liidame jõud ja peatame oma vaenlase  
Aga mida ma ka tean, ma pole mingi surelik mees,  
äkki olen ma lihtsalt üks suvaline slaav

*Kendrick Lamari "Mortal Man" eelne luuletus TPAB albumilt.*

*Tõlge: Ralf M. Palmiste*

Jätan oma viimased sõnad oma juhendajale, Martin Laasmaale, kelle kannatus minuga on olnud pühakutega võrreldav. Alates sellest, kui vähe ma tegelikult jõudsin teha esimesed kaks semestrit, minu küsimused, nii targad kui rumalad. Ta alati vastab mulle mõistvalt ja peatab mind kui hakkam pimesi rappa suunduma. Aitäh sulle, olen parem füüsik tänu sinu juhendamisele.

## 8 Annotatsioon

Töös on võetud eesmärgiks modelleerida kofeiini mõju roti ventrikulaarse kardiomüotsüüdi rakusisesele kaltsiumi dünaamikale, eelkõige sarkoplasmaatilise retiikuumi (SR) kaltsiumi vabanemisele ja täituvustasemele. Kofeiini kasutatakse laboratoorses praktikas SR-i kaltsiumi sisalduse hindamiseks. Kofeiin vabastab SR-ist kogu ladustatud kaltsiumi korraga, ning tekkiv naatrium-kaltsiumivaheti (NCX1) vahendatud vooluamplituud korreleerub SR-i eelneva täituvusastmega.

Hüpoteesiriti, et rüanodiiniretseptorite (RyR2) otsese sensibiliseerimise kirjeldamine kombineeritud kineetika- ja tasakaalumuutusena on piisav, et jäljendada eksperimentaalselt mõõdetud kofeiini transiente erinevate täituvustasemetega rakkudes.

Hüpoteesi testimiseks laiendati Terkildseni PHN-mudelit kolme lisaosaga: fluorestseeruva kaltsiumiindikaatori Fluo-4 seondumisdünaamika, kofeiini otsene toime RyR2 kineetikale ja tundlikkusele ning füsioloogiliste algväärtuste kohandamine. Mudel implementeeriti C keeles ning Pythonis sobitati mudel TRF meetodil seitsmele eraldatud roti ventrikulaarse kardiomüotsüüdi kofeiini transiendile, optimeerides kuut parameetrit ( $\alpha_{\text{caff}}$ ,  $\beta_{\text{caff}}$ ,  $s_{\text{NCX}}$ ,  $s_{\text{SERCA}}$ ,  $s_{\text{PMCA}}$ ,  $s_{\text{CaSR}}$ ) iga katse jaoks eraldi.

Leiti, et laiendatud mudel suudab edukalt kirjeldada kõigi seitsme katse kofeiini tõusu kineetikat, saavutades keskmise RMS-väärtuse  $0,081 \pm 0,024 F/F_0$  ühikutes. Kofeiini parameetrid  $\alpha_{\text{caff}}$  ja  $\beta_{\text{caff}}$  osutusid hästi identifitseeritavaks ning nende varieeruvus katsete vahel on bioloogiliselt tõlgendatav rakkudevaheliste erinevustena RyR2 kanalite kineetikas ja tundlikuses kofeiini lisandumisel.

## 9 Abstract

The aim of this master's thesis is to model the effect of caffeine on intracellular calcium dynamics in rat ventricular cardiomyocytes, with a particular focus on sarcoplasmic reticulum (SR) calcium release and SR calcium load. Caffeine is used in laboratory practice to assess SR calcium content. Caffeine induces a release of stored calcium from the SR, and the resulting sodium-calcium exchanger (NCX1) mediated current amplitude correlates with the preceding SR calcium load.

It was hypothesised that describing the direct sensitisation of ryanodine receptors (RyR2) as a combined kinetic and equilibrium change is sufficient to reproduce experimentally measured caffeine transients in cells with varying SR calcium loads.

To test this hypothesis, the Terkildsen PHN model was extended with three additions: the binding dynamics of the fluorescent calcium indicator Fluo-4, the direct effect of caffeine on RyR2 kinetics and sensitivity, and adjustment of physiological initial conditions. The model was implemented in C and fitted in Python using the TRF method to seven caffeine transients recorded from isolated rat ventricular cardiomyocytes, optimising six parameters ( $\alpha_{\text{caff}}$ ,  $\beta_{\text{caff}}$ ,  $s_{\text{NCX}}$ ,  $s_{\text{SERCA}}$ ,  $s_{\text{PMCA}}$ ,  $s_{\text{CaSR}}$ ) for each experiment individually.

It was found that the extended model is able to successfully describe the caffeine rise kinetics of all seven experiments, achieving a mean root mean square error of  $0.081 \pm 0.024 F/F_0$  units. The caffeine parameters  $\alpha_{\text{caff}}$  and  $\beta_{\text{caff}}$  proved to be identifiable. The variability between experiments is biologically interpretable as cell-to-cell differences in RyR2 channel kinetics and sensitivity upon caffeine application.

## 10 Lisad

### Lisa I: Lihtlitsents

Mina, Ralf M. Palmiste

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose “Kofeiini protokollilise matemaatilise modelleerimise südamelihasrakus”, mille juhendaja on Martin Laasmaa
  - 1.1. reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Tallinn, 18.05.2026

## Lisa II: Mudeli võrrandid ja parameetrid

Käesolevas lisas on esitatud Terkildseni PHN-mudel koos lisatud võrrandiga ning muudatus-tega. Tähistused:  $V$  – membraanpotentsiaal (mV),  $F$  – Faraday konstant,  $R$  – gaasikonstant,  $T$  – temperatuur,  $\xi = FV/(RT)$ ,  $\xi_{Ca} = 2\xi$ .

### II.1 Diferentsiaalvõrrandid

#### Membraanpotentsiaal

$$\frac{dV}{dt} = \frac{-(I_{Na} + I_t + I_{ss} + I_{K1} + I_f + I_B + I_{NaK} + I_{stim} + I_{CaB} + I_{NaCa} + I_{pCa} + I_{LCC})}{C_m} \quad (26)$$

#### rakusisesed ionkontsentratsioonid

$$\frac{d[Na^+]_i}{dt} = \frac{-(I_{Na} + I_{B,Na} + I_{f,Na} + 3I_{NaK} + 3I_{NaCa})}{V_{myo} F} \quad (27)$$

$$\frac{d[K^+]_i}{dt} = \frac{-(I_{stim} + I_{ss} + I_{B,K} + I_t + I_{K1} + I_{f,K} - 2I_{NaK})}{V_{myo} F} \quad (28)$$

$$\frac{d[Ca^{2+}]_i}{dt} = \beta_{total} \left( J_{RyR} - J_{SERCA} + J_{SR,leak} + J_{TRPN} - J_{membr} - \frac{d[FCa]}{dt} \right) \quad (29)$$

$$\frac{d[Ca^{2+}]_{SR}}{dt} = \frac{V_{myo}}{V_{SR}} (-J_{RyR} + J_{SERCA} - J_{SR,leak}) \quad (30)$$

$$\frac{d[TRPN]}{dt} = k_{on}[Ca^{2+}]_i([TRPN]_{max} - [TRPN]) - k_{off}[TRPN] \quad (31)$$

#### Naatriumkanali väravate muutujad

$$\frac{dm}{dt} = \frac{m_{\infty} - m}{\tau_m}, \quad \frac{dh}{dt} = \frac{h_{\infty} - h}{\tau_h}, \quad \frac{dj}{dt} = \frac{j_{\infty} - j}{\tau_j} \quad (32)$$

#### kaaliumikanali väravate muutujad

$$\frac{dr}{dt} = \frac{r_{\infty} - r}{\tau_r}, \quad \frac{ds}{dt} = \frac{s_{\infty} - s}{\tau_s}, \quad \frac{ds_{slow}}{dt} = \frac{s_{\infty} - s_{slow}}{\tau_{s,slow}} \quad (33)$$

$$\frac{dr_{ss}}{dt} = \frac{r_{ss,\infty} - r_{ss}}{\tau_{r_{ss}}}, \quad \frac{ds_{ss}}{dt} = \frac{s_{ss,\infty} - s_{ss}}{\tau_{s_{ss}}}, \quad \frac{dy}{dt} = \frac{y_{\infty} - y}{\tau_y} \quad (34)$$

#### Müofilamentide dünaamika

$$\frac{dz}{dt} = \alpha_{Tm}(1 - z) - \beta_{Tm}z \quad (35)$$

$$\frac{dQ_k}{dt} = A_k \dot{\lambda} - \alpha_k Q_k, \quad k = 1, 2, 3 \quad (36)$$

## CaRU taandatud seisundid

$$\frac{dz_1}{dt} = -(r_1 + r_2)z_1 + r_4z_2 + r_6z_3 \quad (37)$$

$$\frac{dz_2}{dt} = r_1z_1 - (r_4 + r_5)z_2 + r_7z_4 \quad (38)$$

$$\frac{dz_3}{dt} = r_2z_1 - (r_6 + r_3)z_3 + r_8z_4 \quad (39)$$

kus  $z_4 = 1 - z_1 - z_2 - z_3$ .

## Fluo-4 indikaator

$$\frac{d[\text{FCa}]}{dt} = k_{\text{on}}^{\text{FCa}}(F_{\text{tot}} - [\text{FCa}])([\text{Ca}^{2+}]_i) - k_{\text{off}}^{\text{FCa}}[\text{FCa}] \quad (40)$$

## II.2 Algebraised seosed

Originaalmudel C-implementatsioonis sisaldab 106 algebraist koos koodikordsustega:  $j_{\infty} = h_{\infty}$  ja  $s_{\text{slow},\infty} = s_{\infty}$ , mis on C-koodis eraldi kirjed, kuid matemaatiliselt identsed;  $\sigma$  on esitatud *inline*-kujul;  $\lambda_{\text{prev}} = \lambda = 1$  on implementeeritud abisuurused. Allpool on esitatud kõik matemaatiliselt unikaalsed seosed.

## Abitähistused

$$\xi = \frac{FV}{RT}, \quad \xi_{\text{Ca}} = 2\xi \quad (41)$$

## Nernsti potentsiaalid

$$E_{\text{Na}} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[\text{Na}^+]_o}{[\text{Na}^+]_i} \quad (42)$$

$$E_{\text{K}} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[\text{K}^+]_o}{[\text{K}^+]_i} \quad (43)$$

$$E_{\text{Ca}} = \frac{RT}{2F} \ln \frac{[\text{Ca}^{2+}]_o}{[\text{Ca}^{2+}]_i} \quad (44)$$

## Stimulatsioonivool

$$I_{\text{stim}} = \begin{cases} 0 & c_{\text{caff}} > 0.01 \text{ mM} \\ I_{\text{amp}} & (t \bmod T_{\text{stim}}) \in [t_0, t_0 + d_{\text{stim}}] \\ 0 & \text{muidu} \end{cases} \quad (45)$$

## Värava muutujate tasakaaluväärtused

$$m_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{(V+45)/(-6.5)}} \quad (46)$$

$$h_{\infty} = j_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{(V+76.1)/6.07}} \quad (47)$$

$$r_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{(V+10.6)/(-11.42)}} \quad (48)$$

$$s_{\infty} = s_{\text{slow},\infty} = \frac{1}{1 + e^{(V+45.3)/6.8841}} \quad (49)$$

$$r_{ss,\infty} = \frac{1}{1 + e^{(V+11.5)/(-11.82)}} \quad (50)$$

$$s_{ss,\infty} = \frac{1}{1 + e^{(V+87.5)/10.3}} \quad (51)$$

$$y_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{(V+138.6)/10.48}} \quad (52)$$

## Ajakonstantid

$$\tau_m = \frac{1.36 \times 10^{-3}}{0.32(V + 47.13)/(1 - e^{-0.1(V+47.13)}) + 0.08e^{-V/11}} \quad (53)$$

$$\tau_h = \begin{cases} 4.537 \times 10^{-4}(1 + e^{-(V+10.66)/11.1}) & V \geq -40 \\ 3.49 \times 10^{-3}/[0.135e^{-(V+80)/6.8} + 3.56e^{0.079V} + 3.1 \times 10^5 e^{0.35V}] & V < -40 \end{cases} \quad (54)$$

$$\tau_j = \begin{cases} 0.01163(1 + e^{-0.1(V+32)})/e^{-2.535 \times 10^{-7}V} & V \geq -40 \\ 3.49 \times 10^{-3}/[f_1(V) \cdot f_2(V) + f_3(V)] & V < -40 \end{cases} \quad (55)$$

$$\tau_r = \frac{1}{45.16e^{0.03577(V+50)} + 98.9e^{-0.1(V+38)}} \quad (56)$$

$$\tau_s = 0.55e^{-((V+70)/25)^2} + 0.049 \quad (57)$$

$$\tau_{s,\text{slow}} = 3.3e^{-((V+70)/30)^2} + 0.049 \quad (58)$$

$$\tau_{r,ss} = \frac{10}{45.16e^{0.03577(V+50)} + 98.9e^{-0.1(V+38)}} \quad (59)$$

$$\tau_y = \frac{1}{0.11885e^{(V+80)/28.37} + 0.5623e^{-(V+80)/14.19}}, \quad (60)$$

kus

$$\begin{aligned} f_1 &= (V + 37.78)/(1 + e^{0.311(V+79.23)}), \\ f_2 &= -127140e^{0.2444V} - 3.474 \times 10^{-5}e^{-0.04391V}, \\ f_3 &= 0.1212e^{-0.01052V}/(1 + e^{-0.1378(V+40.14)}). \end{aligned}$$

## Naatriumivool

$$I_{\text{Na}} = g_{\text{Na,endo}} m^3 h j (V - E_{\text{Na}}) \quad (61)$$

## Mööduvad kaaliumivoolud

$$I_t = g_{t,endo} r(a_{endo} s + b_{endo} s_{slow})(V - E_K) \quad (62)$$

$$I_{ss} = g_{ss} r_{ss} s_{ss}(V - E_K) \quad (63)$$

## Sissepoole suunatud kaaliumivool

$$I_{K1} = \frac{(48/(e^{(V+37)/25} + e^{-(V+37)/25}) + 10) \times 10^{-3}}{1 + e^{(V-E_K-76.77)/(-17)}} + \frac{g_{K1}(V - E_K - 1.73)}{(1 + e^{1.613\xi(V-E_K-1.73)})(1 + e^{([K^+]_o-0.9988)/(-0.124)})} \quad (64)$$

## Hüperpolarisatsiooni aktiveeritav vool

$$I_{f,Na} = g_f f_{Na} y(V - E_{Na}) \quad (65)$$

$$I_{f,K} = g_f f_K y(V - E_K) \quad (66)$$

$$I_f = I_{f,Na} + I_{f,K} \quad (67)$$

## Taustvoolud

$$I_{B,Na} = g_{B,Na}(V - E_{Na}) \quad (68)$$

$$I_{B,Ca} = g_{B,Ca}(V - E_{Ca,taust}) \quad (69)$$

$$I_{B,K} = g_{B,K}(V - E_K) \quad (70)$$

$$I_B = I_{B,Na} + I_{B,Ca} + I_{B,K} \quad (71)$$

## Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-vaheti NCX

$$J_{NaCa} = g_{NCX} \frac{e^{\eta\xi} [Na^+]_i^3 [Ca^{2+}]_o - e^{(\eta-1)\xi} [Na^+]_o^3 [Ca^{2+}]_i}{([Na^+]_o^3 + K_{m,Na}^3)([Ca^{2+}]_o + K_{m,Ca})(1 + k_{sat} e^{(\eta-1)\xi})} \quad (72)$$

$$I_{NaCa} = J_{NaCa} \cdot V_{myo}^{\mu L} \cdot F \quad (73)$$

## SERCA pump

$$J_{SERCA} = \frac{g_{SERCA} [Ca^{2+}]_i^2}{K_{SERCA}^2 + [Ca^{2+}]_i^2} \quad (74)$$

## Ca<sup>2+</sup>-pump PMCA

$$J_{pCa} = \frac{g_{pCa} [Ca^{2+}]_i}{K_{m,pCa} + [Ca^{2+}]_i} \quad (75)$$

$$I_{pCa} = J_{pCa} \cdot 2V_{myo}^{\mu L} F \quad (76)$$

## kaltsiumi taustvool ja teisendus

$$J_{CaB} = g_{CaB}(E_{Ca} - V) \quad (77)$$

$$I_{CaB} = -J_{CaB} \cdot 2V_{myo}^{\mu L} F \quad (78)$$

## SR-i kaltsiumi leke

$$J_{SR,leak} = g_{SRI}([Ca^{2+}]_{SR} - [Ca^{2+}]_i) \quad (79)$$

## Kalmoduliini puhver ja kombineeritud koefitsient

$$\beta_{CMDN} = \left(1 + \frac{k_{CMDN} B_{CMDN}}{(k_{CMDN} + [Ca^{2+}]_i)^2}\right)^{-1} \quad (80)$$

$$\beta_{total} = \left(\frac{1}{\beta_{CMDN}} + \frac{k_{on}^{FCa}(F_{tot} - [FCa])}{k_{off}^{FCa}}\right)^{-1} \quad (81)$$

## Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump

$$I_{NaK} = \frac{i_{NaK,max}}{1 + 0.1245e^{-0.1\xi} + 0.0365\sigma e^{-\xi}} \cdot \frac{[K^+]_o}{[K^+]_o + K_{m,K}} \cdot \frac{1}{1 + (K_{m,Na}/[Na^+]_i)^4}, \quad (82)$$

kus  $\sigma = (e^{[Na^+]_o/67.3} - 1)/7$ .

## Troponiin C seondumisdünaamika

$$[Ca^{2+}]_b = [TRPN]_{max} - [TRPN] \quad (83)$$

$$k_{off} = \max\left(k_{Ref,off} \left(1 - \frac{Tension}{\gamma_{TRPN} T_{ref}}\right), 0.1k_{Ref,off}\right) \quad (84)$$

$$J_{TRPN} = k_{on}[Ca^{2+}]_i[Ca^{2+}]_b - k_{off}[TRPN] \quad (85)$$

## Müofilamentide kontraktsioon

Sarkomeeripikkuse suhtarv ja filamentide kattumine:

$$\lambda = 1, \quad \dot{\lambda} = 0 \quad (86)$$

$$\text{filamentide kattuvus} = 1 + \beta_0(\lambda - 1) \quad (87)$$

Ca<sup>2+</sup> poolküllastus tropomüosiinile:

$$Ca_{50} = Ca_{50,ref}(1 + \beta_1(\lambda - 1)) \quad (88)$$

$$Ca_{TRPN,50} = \frac{Ca_{50}[TRPN]_{max}}{Ca_{50} + (k_{Ref,off}/k_{on})(1 - 0.5 \text{ overlap}/\gamma_{TRPN})} \quad (89)$$

Tropomüsiini aktivatsiooni- ja deaktivatsioonikineetika:

$$\alpha_{Tm} = \alpha_0 \left( \frac{[Ca^{2+}]_b}{Ca_{TRPN,50}} \right)^{n_{Hill}} \quad (90)$$

$$\beta_{Tm} = \alpha_{r1} + \frac{\alpha_{r2} z^{n_{Rel}-1}}{z^{n_{Rel}} + K_z^{n_{Rel}}} \quad (91)$$

Tropomüsiini tasakaaluolek ja isomeetriline pinge:

$$z_{max} = \frac{\alpha_0 / (Ca_{TRPN,50} / [TRPN]_{max})^{n_{Hill}} - K_2}{K_1 + \alpha_0 / (Ca_{TRPN,50} / [TRPN]_{max})^{n_{Hill}}} \quad (92)$$

$$T_{Base} = \frac{T_{ref} z}{z_{max}} \quad (93)$$

$$T_0 = T_{Base} \cdot \text{overlap} \quad (94)$$

$$Q = Q_1 + Q_2 + Q_3 \quad (95)$$

$$\text{Tension} = \begin{cases} T_0(1 + aQ)/(1 - Q) & Q < 0 \\ T_0(1 + (a + 2)Q)/(1 + Q) & Q \geq 0 \end{cases} \quad (96)$$

**CaRU — düaadiline  $Ca^{2+}$**

$$C_{cc} = [Ca^{2+}]_i \quad (97)$$

$$C_{co} = \frac{[Ca^{2+}]_i + (J_R/g_D)[Ca^{2+}]_{SR}}{1 + J_R/g_D} \quad (98)$$

$$C_{oc} = \begin{cases} \frac{[Ca^{2+}]_i + (J_L/g_D)[Ca^{2+}]_o \xi_{Ca} e^{-\xi_{Ca}} / (1 - e^{-\xi_{Ca}})}{1 + (J_L/g_D) \xi_{Ca} / (1 - e^{-\xi_{Ca}})} & |\xi_{Ca}| > 10^{-9} \\ ([Ca^{2+}]_i + (J_L/g_D)[Ca^{2+}]_o) / (1 + J_L/g_D) & \text{muidu} \end{cases} \quad (99)$$

$$C_{oo} = \begin{cases} \frac{[Ca^{2+}]_i + (J_R/g_D)[Ca^{2+}]_{SR} + (J_L/g_D)[Ca^{2+}]_o \xi_{Ca} e^{-\xi_{Ca}} / (1 - e^{-\xi_{Ca}})}{1 + J_R/g_D + (J_L/g_D) \xi_{Ca} / (1 - e^{-\xi_{Ca}})} & |\xi_{Ca}| > 10^{-5} \end{cases} \quad (100)$$

**CaRU — LCC üleminekukiirused**

$$e_{VL} = e^{(V-V_L)/\delta V_L} \quad (101)$$

$$\alpha_p = \frac{e_{VL}}{t_L(e_{VL} + 1)} \quad (102)$$

$$\varepsilon_{pcc} = \frac{[Ca^{2+}]_i(e_{VL} + a)}{\tau_L K_L(e_{VL} + 1)} \quad (103)$$

$$\varepsilon_m = \frac{b(e_{VL} + a)}{\tau_L(b e_{VL} + a)} \quad (104)$$

$$\varepsilon_{pco} = \frac{C_{co}(e_{VL} + a)}{\tau_L K_L(e_{VL} + 1)} \quad (105)$$

## CaRU — RyR2 üleminekukiirused, kofeiiniprotokoll

Efektiivne dissotsiatsioonikonstant ja kineetiline skaleerimistegur:

$$K_d^{\text{eff}} = \frac{K_{\text{RyR}}}{1 + \alpha_{\text{caff}} c_{\text{caff}}} \quad (106)$$

$$\xi_{\text{caff}} = 1 + \beta_{\text{caff}} c_{\text{caff}} \quad (107)$$

Avamiskiirused (pcc = suletud LCC, suletud → avatud RyR; poc = avatud LCC, avatud → avatud RyR):

$$\mu_{\text{pcc}}^{\text{eff}} = \xi_{\text{caff}} \cdot \frac{[\text{Ca}^{2+}]_i^2}{\tau_R([\text{Ca}^{2+}]_i^2 + (K_d^{\text{eff}})^2)} \quad (108)$$

$$\mu_{\text{poc}}^{\text{eff}} = \xi_{\text{caff}} \cdot \frac{C_{oc}^2}{\tau_R(C_{oc}^2 + (K_d^{\text{eff}})^2)} \quad (109)$$

Sulgemiskiirused:

$$\beta_{\text{pcc}}^{\text{eff}} = \frac{1}{\xi_{\text{caff}}} \cdot \frac{[\text{Ca}^{2+}]_i^2}{t_R([\text{Ca}^{2+}]_i^2 + (K_d^{\text{eff}})^2)} \quad (110)$$

$$\beta_{\text{poc}}^{\text{eff}} = \frac{1}{\xi_{\text{caff}}} \cdot \frac{C_{oc}^2}{t_R(C_{oc}^2 + (K_d^{\text{eff}})^2)} \quad (111)$$

Kofeiiniga mitte modifitseeritud sulgemiskiirused:

$$\mu_{\text{mcc}} = \frac{\theta_R d([\text{Ca}^{2+}]_i^2 + cK_{\text{RyR}}^2)}{\tau_R(d[\text{Ca}^{2+}]_i^2 + cK_{\text{RyR}}^2)} \quad (112)$$

$$\mu_{\text{moc}} = \frac{\theta_R d(C_{oc}^2 + cK_{\text{RyR}}^2)}{\tau_R(dC_{oc}^2 + cK_{\text{RyR}}^2)} \quad (113)$$

## CaRU — LCC inaktiveeritud seisundifraktsioonid

$$y_{ci} = \frac{\alpha_m}{\alpha_p + \alpha_m} \quad (114)$$

$$y_{oi} = \frac{\alpha_p}{\alpha_p + \alpha_m} \quad (115)$$

$$y_{ic} = \frac{\beta_m}{\beta_{\text{pcc}} + \beta_m} \quad (116)$$

$$y_{io} = \frac{\beta_{\text{poc}}}{\beta_{\text{poc}} + \beta_m} \quad (117)$$

## CaRU — nimetaja ja tasakaalu fraktsioonid

$$D = (\alpha_p + \alpha_m)[(\alpha_m + \beta_m + \beta_{\text{poc}})(\beta_m + \beta_{\text{pcc}}) + \alpha_p(\beta_m + \beta_{\text{poc}})] \quad (118)$$

$$y_{oc} = \frac{\alpha_p \beta_m (\alpha_p + \alpha_m + \beta_m + \beta_{pcc})}{D} \quad (119)$$

$$y_{co} = \frac{\alpha_m \beta_m (\alpha_m + \alpha_p + \beta_m + \beta_{poc})}{D} \quad (120)$$

$$y_{oo} = \frac{\alpha_p [\beta_{poc} (\alpha_p + \beta_m + \beta_{pcc}) + \beta_{pcc} \alpha_m]}{D} \quad (121)$$

$$y_{cc} = \frac{\alpha_m \beta_m (\alpha_m + \alpha_p + \beta_m + \beta_{poc})}{D} \quad (122)$$

$$y_{ii} = 1 - y_{oc} - y_{co} - y_{oo} - y_{cc} - y_{ci} - y_{ic} - y_{oi} - y_{io} \quad (123)$$

### CaRU — taandatud seisundite üleminekukiirused

$$r_1 = y_{oc} \mu_{poc}^{eff} + y_{cc} \mu_{pcc}^{eff} \quad (124)$$

$$r_2 = \frac{\alpha_m \varepsilon_{pco} + \alpha_p \varepsilon_{pcc}}{\alpha_p + \alpha_m} \quad (125)$$

$$r_3 = \frac{\beta_m \mu_{mcc}}{\beta_m + \beta_{pcc}} \quad (126)$$

$$r_4 = \mu_{moc} \quad (127)$$

$$r_5 = \frac{\alpha_p \mu_{poc}^{eff} + \alpha_m \mu_{moc}}{\alpha_p + \alpha_m} \quad (128)$$

$$r_6 = \varepsilon_m \quad (129)$$

$$r_7 = \frac{\alpha_m \varepsilon_{pcc}}{\alpha_p + \alpha_m} \quad (130)$$

$$r_8 = \mu_{mcc} \quad (131)$$

### CaRU — LCC ja RyR2 fluksid

RyR2 fluksid (cc ja co konfiguratsioonis):

$$J_{R,co} = \frac{J_R ([Ca^{2+}]_{SR} - [Ca^{2+}]_i)}{1 + J_R/g_D} \quad (132)$$

$$J_{R,oo} = \begin{cases} \frac{J_R \left( ([Ca^{2+}]_{SR} - [Ca^{2+}]_i) + \frac{(J_L/g_D) \xi_{Ca}}{1 - e^{-\xi_{Ca}}} ([Ca^{2+}]_{SR} - [Ca^{2+}]_o e^{-\xi_{Ca}}) \right)}{1 + J_R/g_D + (J_L/g_D) \xi_{Ca} / (1 - e^{-\xi_{Ca}})} & |\xi_{Ca}| > 10^{-5} \end{cases} \quad (133)$$

LCC fluksid (oc ja oo konfiguratsioonis):

$$J_{L,oc} = \begin{cases} \frac{J_L \xi_{Ca} ([Ca^{2+}]_o e^{-\xi_{Ca}} - [Ca^{2+}]_i) / (1 - e^{-\xi_{Ca}})}{1 + (J_L/g_D) \xi_{Ca} / (1 - e^{-\xi_{Ca}})} & |\xi_{Ca}| > 10^{-5} \end{cases} \quad (134)$$

$$J_{L,oo} = \begin{cases} \frac{J_L \xi_{Ca} ([Ca^{2+}]_o e^{-\xi_{Ca}} - [Ca^{2+}]_i) / (1 - e^{-\xi_{Ca}})}{1 + (J_L/g_D) \xi_{Ca} / (1 - e^{-\xi_{Ca}})} & |\xi_{Ca}| > 10^{-5} \end{cases} \quad (135)$$

## RyR2 koondvool

$$J_{R1} = y_{oo}J_{R,oo} + y_{co}J_{R,co} \quad (136)$$

$$J_{R3} = \frac{J_{R,co}\beta_{pcc}}{\beta_m + \beta_{pcc}} \quad (137)$$

$$J_{RyR} = \frac{N}{V_{myo}}(z_1J_{R1} + z_3J_{R3}) \quad (138)$$

$$I_{RyR} = 1.5 \cdot J_{RyR} \quad (139)$$

## LCC koondvool

$$J_{L1} = y_{oo}J_{L,oo} + y_{oc}J_{L,oc} \quad (140)$$

$$J_{L2} = \frac{J_{L,oc}\alpha_p}{\alpha_p + \alpha_m} \quad (141)$$

$$J_{LCC} = \frac{N}{V_{myo}}(z_1J_{L1} + z_2J_{L2}) \quad (142)$$

$$I_{LCC} = -1.5 \cdot J_{LCC} \cdot 2V_{myo}^{\mu L}F \quad (143)$$

## II.3 Parameetrite tabel

**Tabel 4:** Mudeli parameetrite vaikeväärtused. Tärniga (\*) märgitud parameetrid on sobitamisel vabad

Sümbol	Kirjeldus	Väärtus	Ühik
<i>Füüsikalised konstandid</i>			
$R$	Gaasikonstant	8314.5	$\text{mJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$
$T$	Temperatuur	295	K
$F$	Faraday konstant	96487	$\text{C mol}^{-1}$
$C_m$	Membraani mahtuvus	0.0001	$\mu\text{F}$
<i>Raku geomeetria</i>			
$V_{myo}$	Tsütosoolne ruumala	25850	$\mu\text{m}^3$
$V_{SR}$	SR ruumala	2098	$\mu\text{m}^3$
<i>Stimulatsioon</i>			
$T_{stim}$	Periood	1000	ms
$d_{stim}$	Kestvus	10	ms
$I_{amp}$	Amplituut	$-6 \times 10^{-4}$	$\mu\text{A}$
$t_0$	Pulsi alguse nihe perioodis	100	ms
<i>Välised ioonkontsentratsioonid</i>			
$[\text{K}^+]_o$	Rakuväline $\text{K}^+$	5.4	mM
$[\text{Na}^+]_o$	Rakuväline $\text{Na}^+$	140	mM
$[\text{Ca}^{2+}]_o$	Rakuväline $\text{Ca}^{2+}$	1.2	mM
<i><math>I_{Na}</math></i>			
$g_{Na}$	Maksimaalne juhtivus (epik.)	0.8	$\mu\text{S}$
$g_{Na,endo}$	Maksimaalne juhtivus (endok.)	1.064	$\mu\text{S}$
<i><math>I_t, I_{ss}</math></i>			
$g_t$	$I_t$ juhtivus (epik.)	0.035	$\mu\text{S}$
$g_{t,endo}$	$I_t$ juhtivus (endok.)	0.01626	$\mu\text{S}$

Tabel 4 — jätk

Sümbol	Kirjeldus	Väärtus	Ühik
$a_{\text{endo}}$	s-komponent	0.583	—
$b_{\text{endo}}$	$s_{\text{slow}}$ -komponent	0.417	—
$g_{ss}$	$I_{ss}$ juhtivus	0.007	$\mu\text{S}$
$\tau_{s_{ss}}$	$s_{ss}$ ajakonstant	2.1	s
$I_{K1}$			
$g_{K1}$	Juhtivus	0.024	$\mu\text{S}$
$I_f$			
$g_f$	Juhtivus	0.00145	$\mu\text{S}$
$f_{\text{Na}}$	$\text{Na}^+$ osakaal	0.2	—
$f_K$	$\text{K}^+$ osakaal	0.8	—
<b>Värvate muutujate tasakaaluväärtused (<math>V_{1/2}</math>: pool-aktivatsioonipinge; <math>k</math>: kalle)</b>			
$V_{1/2,m}; k_m$	$m_{\infty}$	-45; -6.5	mV
$V_{1/2,h}; k_h$	$h_{\infty} = j_{\infty}$	-76.1; 6.07	mV
$V_{1/2,r}; k_r$	$r_{\infty}$	-10.6; -11.42	mV
$V_{1/2,s}; k_s$	$s_{\infty} = s_{\text{slow},\infty}$	-45.3; 6.8841	mV
$V_{1/2,r_{ss}}; k_{r_{ss}}$	$r_{ss,\infty}$	-11.5; -11.82	mV
$V_{1/2,s_{ss}}; k_{s_{ss}}$	$s_{ss,\infty}$	-87.5; 10.3	mV
$V_{1/2,y}; k_y$	$y_{\infty}$	-138.6; 10.48	mV
<b>Värvmuutujate ajakonstantide koefitsiendid (järjekord vastab A.2 valemitele)</b>			
$\tau_m$	1.36 $\times 10^{-3}$ s; 0.32 $\text{mV}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; 47.13 mV; 0.1 $\text{mV}^{-1}$ ; 0.08 $\text{s}^{-1}$ ; 11 mV		
$\tau_h, V \geq -40$	4.537 $\times 10^{-4}$ s; 10.66 mV; 11.1 mV		
$\tau_h, V < -40$	3.49 $\times 10^{-3}$ s; 0.135; 80 mV; 6.8 mV; 3.56; 0.079 $\text{mV}^{-1}$ ; 3.1 $\times 10^5$ ; 0.35 $\text{mV}^{-1}$		
$\tau_j, V \geq -40$	0.01163 s; 32 mV; 0.1 $\text{mV}^{-1}$ ; 2.535 $\times 10^{-7}$ $\text{mV}^{-1}$		
$\tau_j, V < -40 (f_1)$	3.49 $\times 10^{-3}$ s; 37.78 mV; 79.23 mV; 0.311 $\text{mV}^{-1}$		
$\tau_j, V < -40 (f_2)$	127140; 0.2444 $\text{mV}^{-1}$ ; 3.474 $\times 10^{-5}$ ; 0.04391 $\text{mV}^{-1}$		
$\tau_j, V < -40 (f_3)$	0.1212; 0.01052 $\text{mV}^{-1}$ ; 0.1378 $\text{mV}^{-1}$ ; 40.14 mV		
$\tau_r; \tau_{r_{ss}} = 10\tau_r$	45.16 $\text{s}^{-1}$ ; 0.03577 $\text{mV}^{-1}$ ; 50 mV; 98.9 $\text{s}^{-1}$ ; 0.1 $\text{mV}^{-1}$ ; 38 mV		
$\tau_s$	0.55 s; 70 mV; 25 mV; 0.049 s		
$\tau_{s,\text{slow}}$	3.3 s; 70 mV; 30 mV; 0.049 s		
$\tau_y$	0.11885 $\text{s}^{-1}$ ; 80 mV; 28.37 mV; 0.5623 $\text{s}^{-1}$ ; 14.19 mV		
<b>Taustvoolud</b>			
$g_{B,\text{Na}}$	$\text{Na}^+$ taustvool	$8.015 \times 10^{-5}$	$\mu\text{S}$
$g_{B,\text{Ca}}$	$\text{Ca}^{2+}$ taustvool	$3.24 \times 10^{-5}$	$\mu\text{S}$
$g_{B,K}$	$\text{K}^+$ taustvool	$1.38 \times 10^{-4}$	$\mu\text{S}$
$E_{\text{Ca,taust}}$	Taustvoolu $\text{Ca}^{2+}$ pot.	65	mV
$g_{\text{CaB}}$	$\text{Ca}^{2+}$ taustioonvool	$2.6875 \times 10^{-8}$	$\text{mM mV}^{-1} \text{ms}^{-1}$
<b><math>\text{Na}^+/\text{K}^+</math> pump</b>			
$i_{\text{NaK,max}}$	Maksimaalne vool	$9.5 \times 10^{-5}$	$\mu\text{A}$
$K_{m,K}$	$\text{K}^+$ poolküllastus	1.5	mM
$K_{m,\text{Na}}$	$\text{Na}^+$ poolküllastus	10	mM
<b>NCX</b>			
$g_{\text{NCX}}^*$	Maksimaalne vool	0.0385	$\text{mM ms}^{-1}$
$K_{m,\text{Na}}^{\text{NCX}}$	$\text{Na}^+$ poolküllastus	87.5	mM
$K_{m,\text{Ca}}^{\text{NCX}}$	$\text{Ca}^{2+}$ poolküllastus	1.38	mM
$\eta$	Pindesõltuvus	0.35	—
$k_{\text{sat}}$	Küllastustegur	0.1	—

Tabel 4 — jätk

Sümbol	Kirjeldus	Väärtus	Ühik
<b>SERCA</b>			
$g_{SERCA}^*$	Maksimaalne vool	$4.5 \times 10^{-4}$	mM ms <sup>-1</sup>
$K_{SERCA}$	poolküllastus	$5 \times 10^{-4}$	mM
<b>PMCA</b>			
$g_{pCa}^*$	Maksimaalne vool	$3.5 \times 10^{-6}$	mM ms <sup>-1</sup>
$K_{m,pCa}$	poolküllastus	$5 \times 10^{-4}$	mM
<b>SR leke</b>			
$g_{SRI}$	Lekkejuhtivus	$1.8951 \times 10^{-5}$	ms <sup>-1</sup>
<b>Algväärtused</b>			
$[Ca^{2+}]_{SR,0}^*$	SR Ca <sup>2+</sup> algkontsentratsioon	0.7	mM
<b>Kalmoduliin</b>			
$k_{CMDN}$	poolküllastus	$2.382 \times 10^{-3}$	mM
$B_{CMDN}$	Kogumaht	0.05	mM
<b>Troponiin C</b>			
$[TRPN]_{max}$	Kogumaht	0.07	mM
$k_{on}$	Seondumiskonstant	100	mM <sup>-1</sup> ms <sup>-1</sup>
$k_{Ref,off}$	Lahtiseondumiskonstant	0.2	ms <sup>-1</sup>
$\gamma_{TRPN}$	Kooperatiivsuse eksponent	2	—
<b>Müofilamentide kontraktsioon</b>			
$T_{ref}$	Maksimaalne isomeetiline pinge	56.2	N mm <sup>-2</sup>
$\alpha_0$	Aktivatsioonikonstant	0.008	ms <sup>-1</sup>
$\alpha_{r1}$	Deaktivatsiooni kiirus 1	0.002	ms <sup>-1</sup>
$\alpha_{r2}$	Deaktivatsiooni kiirus 2	0.00175	ms <sup>-1</sup>
$n_{Rel}$	RyR2 kooperatiivsus	3	—
$n_{Hill}$	Hill'i eksponent	3	—
$K_z$	Tropomüosiini poolküllastus	0.15	—
$Ca_{50,ref}$	Ref. poolküllastus	0.00105	mM
$z_p$	Ref. tropomüosiini olek	0.85	—
$\beta_0$	Sarkomeeri pikkuse sõltuvus (pinge)	4.9	—
$\beta_1$	Sarkomeeri pikkuse sõltuvus (Ca <sub>50</sub> )	-4	—
$a$	Ristsidemete asümmeetria	0.35	—
$A_1, A_2, A_3$	Ristsidemete amplituudid	-29, 138, 129	—
$\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$	Ristsidemete kiirused	0.03, 0.13, 0.625	ms <sup>-1</sup>
<b>CaRU — LCC</b>			
$V_L$	Pool-aktivatsioonipinge	-2	mV
$\delta V_L$	Aktivatsioonikalle	7	mV
$\phi_L$	Skaleerimistegur	2.35	—
$t_L$	LCC avamise ajakonstant	1	ms
$\tau_L$	LCC sulgemise ajakonstant	650	ms
$K_L$	LCC Ca <sup>2+</sup> tundlikkus	$2.2 \times 10^{-4}$	mM
$a, b, c, d$	LCC lekkeparameetrid	0.0625, 14, 0.01, 100	—
<b>CaRU — RyR2</b>			
$K_{RyR}$	Ca <sup>2+</sup> tundlikkus	0.041	mM
$\tau_R$	Avamise ajakonstant	2.43	ms
$t_R$	Sulgemise ajakonstant	$1.17 t_L$	ms
$\phi_R$	Skaleerimistegur	0.05	—

Tabel 4 — jätk

Sümbol	Kirjeldus	Väärtus	Ühik
$\theta_R$	Küllastustegur	0.012	—
<i>CaRU — düaadiline ruum</i>			
$g_D$	Difusioonikonstant	0.065	$\mu\text{m}^3 \text{ms}^{-1}$
$J_R$	RyR2 juhtivus	0.02	$\mu\text{m}^3 \text{ms}^{-1}$
$J_L$	LCC juhtivus	$9.13 \times 10^{-4}$	$\mu\text{m}^3 \text{ms}^{-1}$
$N$	CaRU koguarv	50000	—
<i>Fluo-4</i>			
$k_{\text{on}}^{\text{FCa}}$	Seondumiskonstant	100	$\text{mM}^{-1} \text{ms}^{-1}$
$k_{\text{off}}^{\text{FCa}}$	Lahtiseondumiskonstant	0.11	$\text{ms}^{-1}$
$F_{\text{tot}}$	Kogumaht	0.025	mM
<i>Kofeiini protokoll</i>			
$c_{\text{caff}}$	Kontsentratsioon	0 (10 kofeiiniga)	mM
$\alpha_{\text{caff}}^*$	$\text{Ca}^{2+}$ tundlikkuse nihe	6.1	$\text{mM}^{-1}$
$\beta_{\text{caff}}^*$	Kineetiline skaleerimistegur	10.0	$\text{mM}^{-1}$