

Südamelihasaraku kaltsiumi dünaamika matemaatiline modelleerimine kreatiini puudulikes hiirtes

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Ralf M. Palmiste

Üliõpilaskood: 206283YAFB

Juhendaja: Martin Laasmaa, nooremprofessor, Tallinna Tehnikaülikool

Õppekava: Rakendusfüüsika

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
20.05.2024

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.
Juhendaja: Martin Laasmaa
20.05.2024

Sisukord

1 Sissejuhatus	4
2 Kirjanduse ülevaade	6
2.1 Süda	6
2.1.1 Südame ehitus	6
2.1.2 Erinevused inimese ja hiire südamel	7
2.2 Südamelihaskud	8
2.2.1 Südamelihasku ehitus	8
2.2.2 Lähemalt L-tüüpi kaltsiumikanalitest	9
2.3 Kreatiini roll südamelihases	10
2.4 Südame elektrofüsioloogia	10
2.4.1 Kardiomyotsüütide elektrofüsioloogia	10
2.4.2 Aktsioonipotentsiaal	11
2.4.3 Südame elektro-mehaaniline sidestus	12
2.4.4 Südame elektrofüsioloogia uurimismeetodid	13
2.5 Elektrofüsioloogia modelleerimine	14
2.5.1 Miks üldse kasutada matemaatilisi mudeleid?	14
2.5.2 Ioonide liikumise kirjeldamine	14
2.5.3 Raku elektrofüsioloogia kui vooluahel	15
2.6 Südame mudelite ajaloo	15
2.6.1 Hodgkin ja Huxley elektrofüsioloogia mudel	16
2.6.2 McAllister, Noble ja Tsien	17
2.6.3 DiFrancesco ja Nobel	17
2.7 Bondarenko hiire vatsakeste müotsüütide aktsioonipotentsiaali arvutimudel	18

3	Metoodika	19
3.1	Kasutatud eksperimentaalsed andmed	19
3.1.1	Eksperimentide metoodika	19
3.2	Töös adapteeritud matemaatiline mudel	20
3.2.1	Mudeli optimeerimine vähimruutudega	20
3.3	Programmeerimiskeel ja mudeli kättesaadavus	21
3.4	Statistika	22
4	Tulemused	23
4.1	Normaalsuse kontroll	23
4.2	ANOVA tulemused	23
4.3	Kirjeldav statistika	24
4.4	Teiste muutujate analüüs	26
5	Arutelu	27
6	Tänuavaldus	30
7	Annotatsioon	36
8	Abstract	37
9	Lisad	38

1 Sissejuhatus

Südant on uuritud nii religioosetel kui ka meditsiinilistel põhjustel juba aastatuhandeid. Siiski, moderne südame elektrofüsioloogia uurimine sai alguse alles 20. sajandil, kui Willem Einthoven ehitas EKG masina, täiendades Augustus Walleri esmakordseid EKG uuringuid [1].

Südame uurimine on olulisel kohal tänasel päeval, sest WHO rapordi järgi suri 2020. aastal maailmas kõige rohkem inimesi just isheemiliste südamehaiguste tagajärjel. Eestis on samuti surmade esikohal isheemilised südamehaigused ja teisel kohal hüpertoonilised südamehaigused [2]. Tihti saavad alguse saatuslikud haigused südame väärkäitumisest, mis tulenevad mitmetest faktoritest nagu geneetika, elustiil ja keskkond. Südame väärkäitumine ei põhjusta ainult vereringkonna ja südamega kaasnevaid probleeme, sest tänaseks on suudetud leida korrelatsioon südame väärkäitumise ja teiste haiguste ja seisundite vahel nagu näiteks insuldid [3]. Võttes kõike seda arvesse on äärmiselt oluline uurida südame väärkäitumist just elektrofüsioloogias, et ennetada südame probleemide teket ja mõista patoloogiate taga olevaid mehhanisme.

Uurimisvaldkond on seetõttu väga aktiivne. Ainuüksi viimase aastaga on lisatud National Library of Medicine andmebaasi ligikaudu 150 000 erinevat artiklit südant puudutavatel teemadel [4]. Siiski tooks autor tähelepanu sellele, et leidub väheseid artikleid, mis keskenduksid kreatiini puudulikkusele ja selle mõjudele südames. Kuigi kreatiini mõjusid lihaskonnale on uuritud juba 20. sajandi esimesest poolest alates, on alles viimase kümnendi jooksul hakatud lähemalt uurima kreatiini mõjusid südame elektrofüsioloogiale just raku tasandil.

Kreatiini rolli uurimine südames on oluline, sest kreatiinkinaasi süsteem hõlbustab energia ülekandmist mitokondrite ja südame peamiste ATPaaside vahel. On leitud, et kreatiini puudulikel hiirtel, kellel puudub kreatiini ja homoarginiini sünteesimiseks vajalik arginiin-glütsiinamidinotransferaas (AGAT), on vähenenud südame kontraktiilsus [5]. Vähenenud kontraktiilsusega kaasneb ka muutunud kaltsiumkäitumine, mille tagajärjel tihtipeale tekivad arütmiaid ja südamepuudulikus [6]. Antud hetkel ei ole veel saavutatud täieliku selgust kus müokardis asub oluline muutus kaltsiumi käitumises ja mis parameetrid omavad olulist rolli. Siiski, on leitud matemaatilise modelleerimise teel ja eksperimentaalsete andmetel alusel mõned kandidaadid, mis võiksid seletada muutunud kaltsiumkäitumist. Nendeks on kaltsiumi difusiooni muutus tsütosoolist diaadilisse ruumi, sarkoendoplasmilise retiikulumi kaltsium ATPaasi (SERCA) omastamise kiiruse vähenemine ja L-tüüpi kaltsiumkanalite vähenenud juhtivus [5].

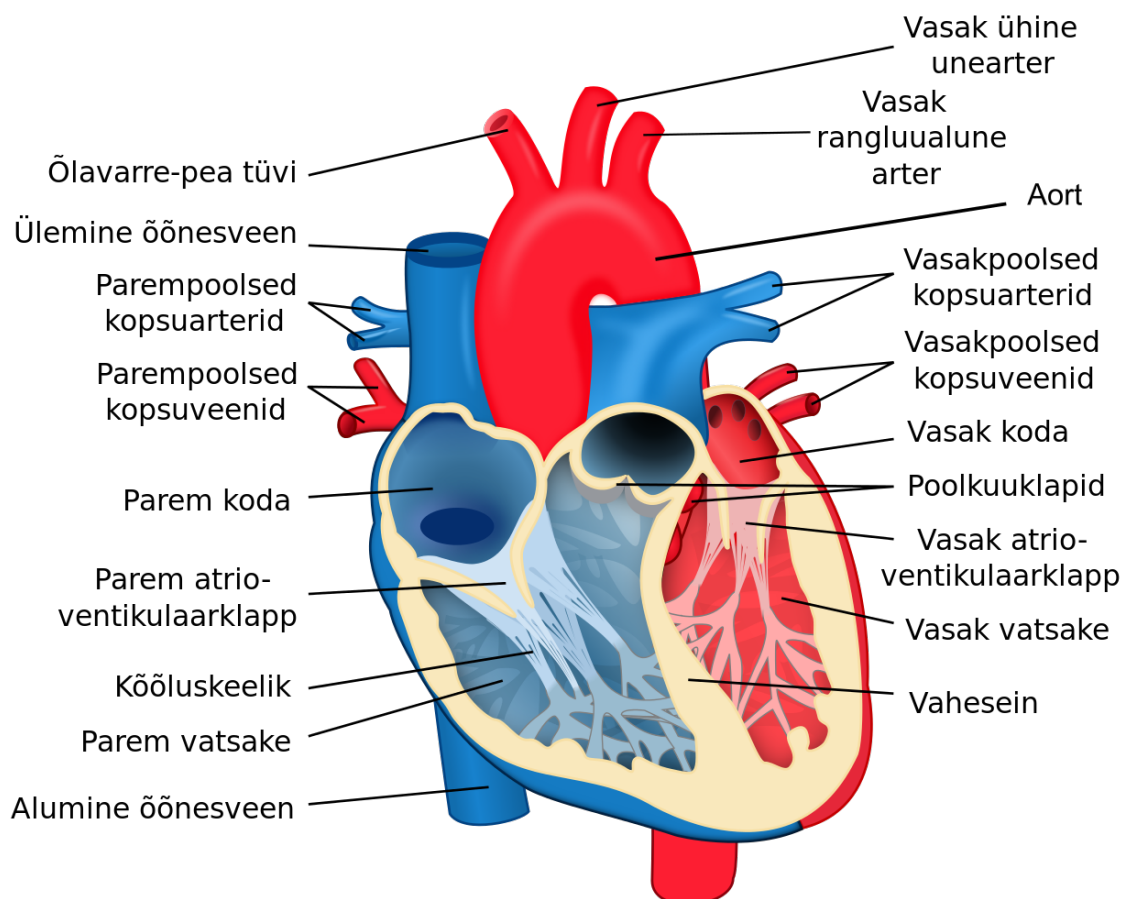
Kuna bioloogilised süsteemid on kurikuulsad oma kompleksuse poolelt on hädavajalik rakendada matemaatilist modelleerimist antud kandidaatide uurimiseks. Selleks, et seletada muutunud kaltsiumkäitumist on uurimustöös püstitatud eesmärk adapteerida Bondarenko hiire ventrikulaarsete müotsüütide aktsioonipotentsiaali arvutimudel, et teha kindlaks, kas kaltsiumi difusioon erineb metsiktüüpi (WT), knockout (KO, ehk AGAT geeni puudulik) ja kreatiiniga toidetud KO (KO+Cr) hiire vahel.

Autor peab oma tööd uudseks, sest töö arendab edasi väikest aspekti hiljuti avaldatud artiklist [5] ning ei ole näinud teisi sarnaseid töid, mis keskenduks just kaltsiumi difusioonile tsütosoolist diadilisse ruumi ning seda mõjutavatele parameetritele.

2 Kirjanduse ülevaade

2.1 Süda

Südame peamine tööülesanne organismis seisneb pideva vereringe säilitamises, et läbi vere transportida toitained ja hapniku. Samuti on südame eesmärk säilitada konstantne vereringe, et transportida jääk-, mürk- ja muid aineid maksa ja neerudesse, et neid kehast väljutada[7].



Joonis 1: Südame diagramm. Südame ehituse lihtsustatud skeem [8].

2.1.1 Südame ehitus

Süda paikneb inimestel rindkere keskjoonest veidi vasakul pool ning seda kaitseb rinnakorv. Ei ole ka ebatavaline kui süda paikneb paremal pool keskjoont ning see ei pärsi elukvaliteeti. Süda on eraldatud lihaselise vaheseinaga paremaks ja vasakuks pooleks. Need pooled omakorda jagunevad veel kaheks kambriks: kojaks ja vatsakeseks [9].

Parem vatsake ja parem koda on ühendatud koja-vatsaksuudmega. Vatsakese ülaosas paikneb kopsutüve suue, mille kaudu veri saabub kopsutüvesse ja sealt edasi paisatakse veri kopsuarteritesse. Vasakusse kotta suubuvad kaks kopsuveeni, mis toovad sinna kopsudest

hapniku rikast verd mida transporditakse edasi kehasse. Vasaku vatsakese ja koja ühendus on analoogne. Vasakust vatsakesest viib aordisuue aorti. Vasaku vatsakese seinad on märkimisväärselt paksemad kui paremal vatsakesel ning seetõttu on ka jõudlus suurem. See on oluline, sest vasak vatsake vastutab hapnikurikka vere transpordi eest kogu kehas, parem vatsake aga süsihappegaasirikka vere transpordi eest kopsudesse, kus toimub hapniku ja CO₂ vahetus [10].

Selleks, et veri liiguks ainult ühes suunas on kodade ja vatsakeste vahel hõlmased südameklapid. Nende tööpõhimõtet saab võrrelda ühele poole avaneva uksega. Koja kontraktsiooniga (süstoolne faas) avaneb klapp ning veri liigub vatsakesse. Vatsaku kontraktsiooniga sulgub klapp ning veri suundub südamest välja. Selleks, et veri ei voolaks tagasi südamesse lihase lõõgastumisel (diastoolne faas) on vatsakeste ja välja minevate veresoonte vahel poolkuuklapid, mis avanevad ainult kokkutõmbumisel [9, 10].

Südant ennast ümbritseb sidekoest südamepaun. Südamepauna õõs on täidetud südamepauna vedelikuga, mis vähendab hõõrdumist fibroose perikardiumi ja epikardiumi vahel. Seda membraanide vahelist ruumi nimetatakse perikardiliseks õõnuseks [11].

2.1.2 Erinevused inimese ja hiire südamele

Inimesed ja uurimisalused hiired kuuluvad samasse liigiklassi ja seetõttu ei ole alusetu kasutada hiiresüdame uuringutest saadud teadmisi ka inimeste puhul. Siiski leidub olulisi erinevusi inimeste ja hiire südame vahel, mida tuleb arvestada:

- inimsüda kaalub ligikaudu 250-300g, hiiresüda ligikaudu 0.2g;
- terve inimese süda lööb keskmiselt 60-70 korda minutis, hiirel ligikaudu 500-600 korda;
- inimsüda sarnaneb püramiidile, millel on üks lamedam pool ja hiiresüda sarnaneb elliptoidile;
- inimsüda kujuneb välja lootel kauem kui hiirelootel [12].

Väidet, et hiire südame uuringute tulemusi saab rakendada inimestele, toetab Andy Wesels ja David Sedmera artikkel, mis keskendub inimeste ja hiire loote südame arengule [12].

Antud artikli kokkuvõttes toodi välja, et inimeste ja hiire südames on väikesed erinevused südame sisepinnal ning struktuurides. Peamine erinevus hiire ja inimeste südames on õõnesveeni arengus. Inimestel taandub õõnesveen Marshalli ligamendiks, mis ei oma olulist rolli südame talituses. Hiirtel aga säilib õõnesveen ning on oluliseks osaks südamest. Juhul kui õõnesveen inimestel ei taandu on tegemist südame väärarenguga, mis võib põhjustada erinevaid patoloogiaid, näiteks arütmiaid [13, 12]. Sarnaste järeldusteni on jõudnud ka Anita Krishnan, kes samuti keskendus hiire ja inimsüdame arengule [14].

2.2 Südamelihaskud

Südamelihas ise koosneb südamelihase rakkudest ehk kardiomüotsüütidest [15]. Südamelihas, mida nimetatakse ka müokardiks, on üks kolmest peamisest inimesekehas leiduvast lihasekategorias, mille hulka kuuluvad silelihas ja skeletilihas. Südamelihas, nagu ka skeletilihas, koosneb sarkomeeridest, mis võimaldavad lihase kokkutõmmet. Erinevalt skeletilihasest on südamelihas tahtmatu kontrolli all [16]. Teisisõnu, ei ole vaja saada ajust signaali, et toimuks lihaste kontraktsioon.

Sõltuvalt valdkonnast käsitletakse südamerakke sarnaselt, aga erinevate nüansidega. Raku bioloogia kontekstis on kardiomüotsüüt kontraktsioonivõimeline, ergastuv südamerakk, millel on keskne tuum ja spetsiifilised sarkomeeri valgu isovormid, mis eristavad seda teistest lihaskudest, mis tõmbuvad rütmiliselt kokku ilma pausi tegemata [17].

Kardioloogias defineeritakse kardiomüotsüüte kui rakke, mis vastutavad südame kokkutõmbumise eest, kasutades selleks keerukaid kontraktiilseid valkude ja ionitransporterite võrgustikke, et tõhusalt teostada kontraktsiooni-relaksatsioonitsükli [18].

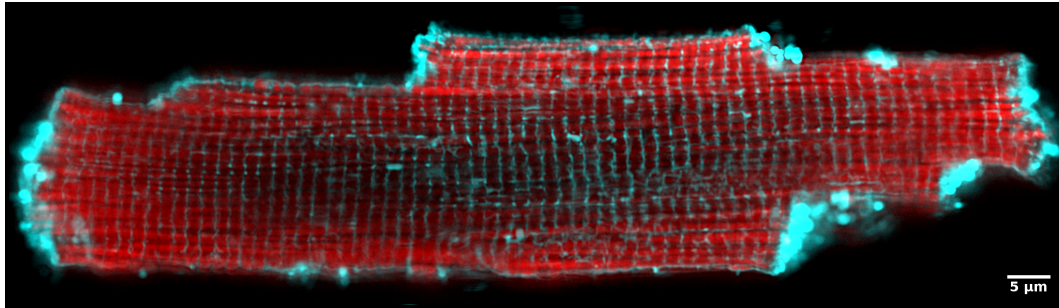
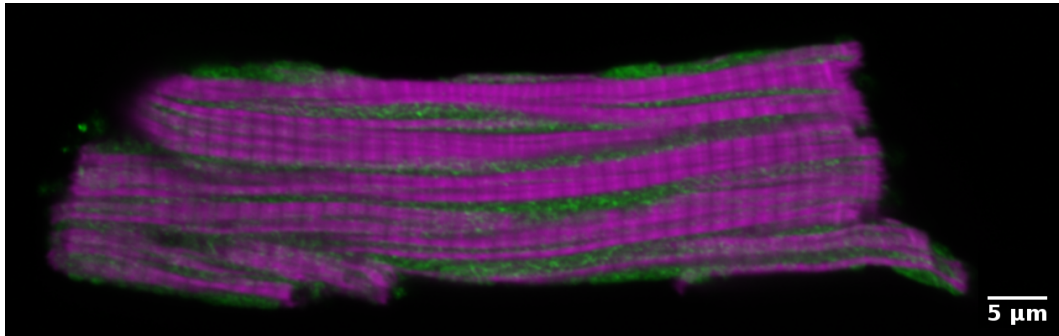
Antud töö kontekstis on oluline meeles pidada, et kardiomüotsüüt 1) asub südames, 2) vastutab südame kontraktsiooni eest ja 3) omab erinevaid ionikanaleid [19, 16].

2.2.1 Südamelihasku ehitus

kardiomüotsüütidest moodustub lihase koosseis, mis vastutab vereringe toimimise eest. Südamelihas saavutab selle kontraktsiooni ja relaksatsiooni teel [20]. Selleks, et mõista kuidas see protsess välja näeb raku tasandil, tuleb ära kirjeldada kardiomüotsüüdi struktuur.

Eraldatud südamerakk on oma kujult torujas ning on keskmiselt 100 – 200 μm pikk ning läbimõõt vahemikus 10 – 20 μm . Rakku ümbritseb lipiidsest kaksikkihist rakumembraan ehk sarkolemma, mis on barjääriks rakuvälisele ja -sisesele keskkonnale (joonis 2A). Täiskasvanud imetajate südamelihaskude üheks oluliseks tunnuseks on veel see, et sarkolemma osana on rakk varustatud pinnalt sissetungivate membraanitorukestega ehk T-tuubulitega. Sarkolemma sarnaselt sisaldavad endas mitmeid valkude komplekse nagu näiteks pingetundlikke ionikanaleid, ionivahetiteid ja -transportereid, mis võimaldavad ionide liikumist raku seda ümbritsevast rakuvälisest keskkonnast [21].

Kontraktsiooni ehk mehaanilise töö teevad rakus ära sarkomeerid. Sarkomeerid on $\sim 1.8 \mu\text{m}$ pikad (loomaliigiti sarkomeeride pikkus erineb) ja on järjestatud raku pikkisihis. Nad moodustavad raku pikkuseid ahelaid, mida nimetatakse müofibrillideks, illustreeritud joonisel 2B. Sarkomeerid ise koosnevad valgufilamendist, kus vaheldumisi on õhuke aktiin ja paks müosiinifilament. Lihaskontraktsiooni kirjeldab libisevate filamentide teooria, mille kohaselt tekib aktiivne jõud, kui aktiinifilamendid libisevad müosiinifilamentidest mööda, mille tulemusel toimub üksiku sarkomeeri kontraktsioon [22]. Südamelihase sarkomeerid ja nendest koosnevad müofilamendid moodustavad umbes 50 – 60% kogu raku ruumalast [23].

A**B**

Joonis 2: Konfokaalmikroskoobi kujutised süramelihaskudest. Pilt **A** visualiseeritud sinisega sarkolemma ja T-tuubulid ning punasega mitokondrid. Pildil **B** on lillaka värviga märgistatud aktiini filamendid, mis on sarkomeeride koostisosa ning rohelisega on markeeritud mitokondrid. Pilt illustreerib ilmekat seda, kui suure osa südamelihaskudest moodustavad sakromeerid ja mitokondrid. Pildid pärinevad Taltech küberneetika instituuti süsteemibioloogia laboratooriumi pildivaramust.

Kardiomüotsüüt vajab ka pidevalt energiat, et teha lakkamatult mehaanilist tööd. Selleks on rakud varustatud suure hulga mitokondritega ehk nn raku jõujaamadega, mis kasutavad peamiselt rasvhappeid, et sünteesida tööks kasutatavat "kütust" – ATP-d. Mitokondrid on südamelihaskudes paigutatud piki rakku müofilamentide vahele ning moodustavad umbes 30 – 40% kogu raku ruumalast [23]. Sealt pärineb valdav osa, pea 80% südamelihasku tööks vajaminevast ATP-st [24].

2.2.2 Lähemalt L-tüüpi kaltsiumikanalitest

L-tüüpi kaltsiumikanalid leidub nii kardiomüotsüütides kui ka teistes ergastatavates rakkudes, näiteks neuronites. Esimest korda kirjeldati L-tüüpi kaltsiumikanaleid perifeersetes neuronites ja südame rakkudes [25]. Mis muudab LTCC-d komplekseteks on see, et nendes leidub 10 erinevat α_1 alamühikut, aga vaid 4 (Cav1.1-Cav1.4) neist moodustavad L-tüüpi kaltsiumikanalite poore [26]. Südamerakkudes leidub põhiliselt Cav1.2 ja Cav1.3 α_1 alamühikuid ning ligikaudu 80% L-tüüpi kaltsiumikanalite pooridest südamerakkudes moodustavad Cav1.2 alamühikud ja vähesemal määral Cav1.3 ning Cav1.1 [26].

LTCC põhiline roll on olla kaltsiumioonide vahendaja rakusisese ja rakuvälise keskkonna vahel [5]. Teisisõnu on kanal vägagi olulisel südame elektrofüsioloogias ja südame lihase korrektse kontraktsioonis. Seetõttu on ta adaptatsioonis põhjalikult ära kirjeldatud.

2.3 Kreatiini roll südamelihases

Kreatiin on ühend, mis koosneb kolmest aminohappest ning on kontsentreeritud lihastesse ja aju. Suuremaosa kreatiinist saadakse kätte süües mereande, kala ja punast liha [27].

Täiendavalt sünteesivad kehas maks, neerud ja kõhunääre päevas 1g jagu kreatiini [28], mis läbi vereringe jõuab rakkudeni. Rakud, näiteks kardiomüotsüüdid, on varustatud plasmamembraani kreatiini transporteritega, mille abil jõuab kreatiin rakuvälisest keskkonnast raku [29]. Rakkudes on kreatiini peamiseks rolliks peetud energia homöostaasi tagamine [30, 31].

Kreatiini roll energia homöostaasi hoidmiseks peitub järgnevas. Kreatiin katalüseeritakse fosfokreatiiniks läbi rakus oleva ensüümi – kreatiin kineaasi – kasutades selleks ATP-d ($\text{ATP} + \text{kreatiin} \leftrightarrow \text{ADP} + \text{fosfokreatiin} + \text{H}^+$) [23].

Juhul, kui rakus on ATP tase kõrge, näiteks raku puhkeolekus, võimaldab antud protsess talletada energiat fosfokreatiini näol. Kuna antud protsess on kahesuunaline ehk pöörduv, siis ATP defitsiidi ehk kõrge energia vajaduse korral saab rakk kasutada fosfokreatiini varusid ATP tootmiseks [32, 31]. Seeläbi hõlbustades energia ülekandmist ja puhverdamist mitokondrite ja ATPaaside vahel [32].

2.4 Südame elektrofüsioloogia

Südame elektrofüsioloogia on eraldi haru elektrofüsioloogiast, mis keskendub südame ja kardiomüotsüütide elektrilistele toimingutele. Südame uurimine on olnud läbi aegade kesksel kohal erinevatel põhjustel. Üks esimesi südame EKG-sid tehti 1895. aastal ning selleks oli vaja 600 naela kaaluvat masinat ja viite operaatorit – antud masina ehitas Willem Einthoven [33]. Seda julgub autor pidada oma parimate teadmiste juures südame elektrofüsioloogia modernse uurimise alguseks.

2.4.1 Kardiomüotsüütide elektrofüsioloogia

Südame elektriline aktiivsus on määratud südameraku membraanipotentsiaaliga. Potentsiaal, ehk pinge erinevus rakusisese ja rakuvälise keskkonna vahel, saab eksisteerida ainult tänu raku ümbritseva sarkolemma selektiivsusele [21, 34]. Tavaliselt on puhkeolekus rakusiseses ruumis rohkem negatiivseid kui positiivseid ioone ja seega on rakusisene ruum negatiivse potentsiaaliga võrreldes rakuvälise ruumiga. Potentsiaali vahe on ligikaudu -85 kuni -90 mV enamiku südamerakkude puhul, kuid osades allikates on kasutatud ka teisi pinge erinevusi. [34, 35].

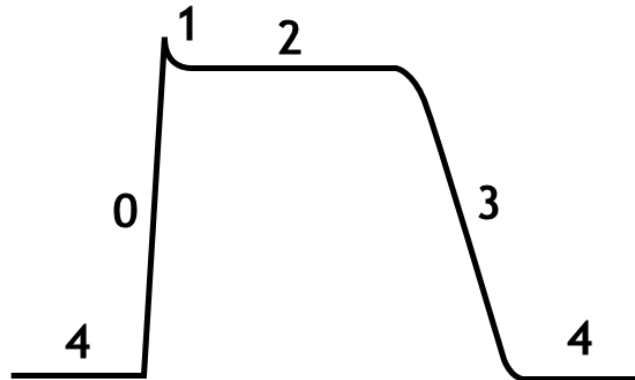
Selleks, et süda saaks pumbata verd, toimub üksikute müotsüütide kontraktsioon, mida koordineerib müotsüütide rakumembraanide (sarkolemma) elektrilise depolarisatsiooni levikulaalne. Selle koordineeritud kontraktsiooni häirimine kahjustab südame võimet verd pumbata

[36]. Selliseid häireid tuntakse kui arrütmiatena, mis võivad põhjustada pikemas perspektiivis kahju südame vereringlusele ja mõned arütmia tüübid võivad põhjustada ka südame atakke ja seiskumisi. Välistatud ei ole ka aju ning hingamiseldite kahjustused [37].

2.4.2 Aktsioonipotentsiaal

Aktsioonipotentsiaal on lühiajaline raku membraanipotentsiaali muutus, mille käigus membraanipotentsiaal tõuseb kiirelt ehk depolariseerub ning seejärel langeb tagasi raku algsele tasemele (saavutab puhkepotentsiaali) ehk repolariseerub. Selline protsess leiab aset näiteks neuronites ja südamelihaskudedes [35].

Südames on põhiliseks rütmi määrajaks sinoatriaalses sõlmes leiduvad rakud. Antud rakudel puudub puhkepotentsiaal, vaid genereerivad pidevalt aktsioonipotentsiaali. Südames toimub depolarisatsiooni ja repolarisatsiooni protsess aeglasemalt kui teistes rakkudes. Muutused membraanipotentsiaalis eri faasides on tingitud peamiselt kaltsiumi ja kaaliumi liikumisest läbi membraani, kasutades selleks ionikanaleid, mis avanevad ja sulguvad erinevatel aegadel aktsioonipotentsiaali jooksul. Kui kanal on avatud, suureneb ionide elektriline juhtivus läbi vastavate ionikanalite. Kanalite sulgumisel väheneb selle ionide juhtivus. Senikaua kui ionid liiguvad läbi avatud kanalite, tekitavad need elektrivoolu, mis muudab membraanipotentsiaali [35].



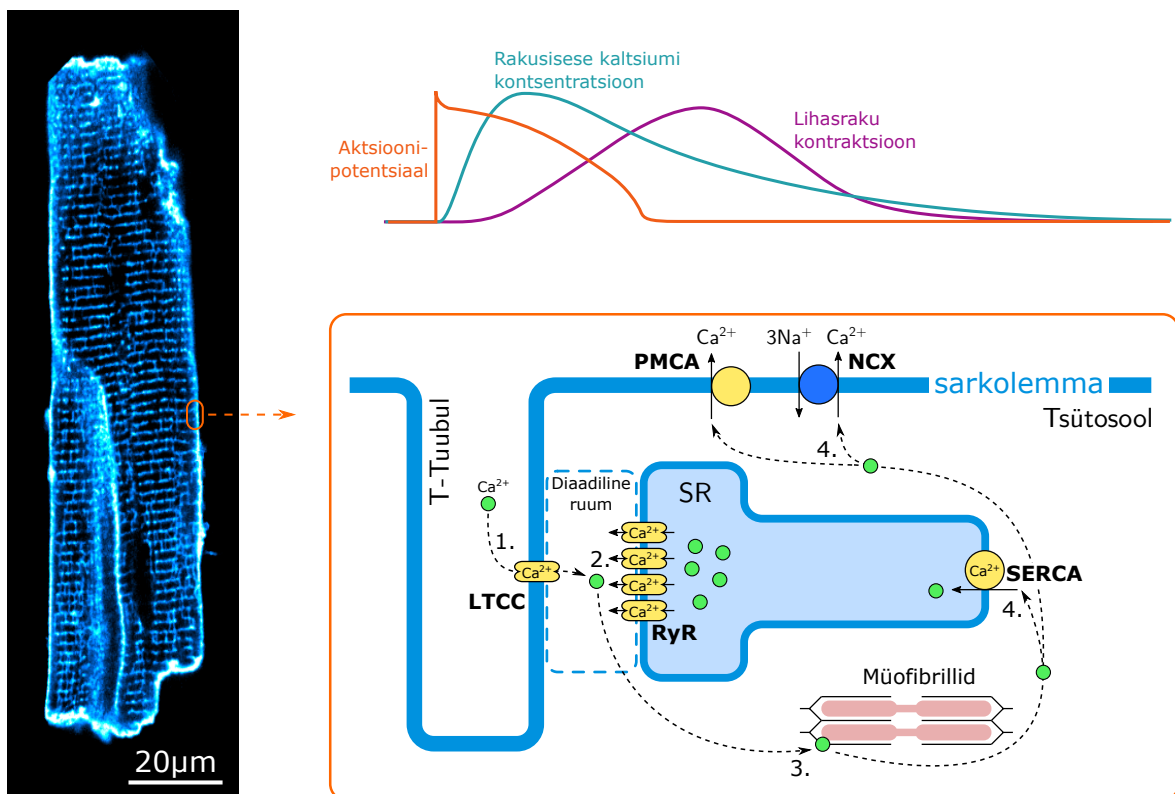
Joonis 3: Aktsioonipotentsiaal. Visuaalne tugi kirjeldamiseks aktsioonipotentsiaali erinevaid faase [38].

Kui membraani depolariseerub üle teatud piiri, siis avanevad esmalt pingetundlikud naatriumkanalid ning naatrium hakkab liikuda raku kontsentratsiooni gradiendi tõttu. Naatriumi, kui positiivsete ionide vool raku depolariseerib membraanipotentsiaali veelgi, mille tagajärjel avanevad T-tüüpi kaltsiumikanalid ja depolarisatsioon jätkub (0 faas, joonis 3). Depolarisatsiooni käigus kasvab membraanipotentsiaal, mis põhjustab L-tüüpi kaltsiumkanalite (LTCC) avanemise ja naatrium kanalite inaktivatsiooni ning toimub väikene langus välja minevate kaalium- ja kloorioonide tõttu (1. faas, joonis 3). Depolarisatsiooni 2. faasis toimub sissepoole kaltsiumioonide vool läbi LTCC, mis on tasakaalus välja minevate kaaliumioonide vooluga, mida vahendavad rektifitseerivad kaaliumikanalid (2. faas, joonis 3) [35]. 3. faasis sulguvad LTCC-d ja kaaliumkanalid püsivad avatud, mille tõttu toimub raku väljapoolne vool, mis põh-

justab negatiivse membraanipotentsiaali, ehk repolarisatsiooni (3. faas, joonis 3). 4. faasis on lõppenud repolariseerimine ning on saavutatud puhkepotentsiaal ning protsess saab korduda (4. faas, joonis 3). [35]

2.4.3 Südame elektro-mehaaniline sidestus

Südame elektrofüsioloogias võib pidada kõige tähtsamaks just elektro-mehaanilist sidestust (ECC, i.k. *excitation-contraction coupling*). Tegemist on mehhanismiga, illustreeritud ülemise parempoolse graafikuga joonisel 4, mis seob omahavel raku elektrilise ergastuse ning raku kontraktsiooni läbi kaltsiumi tsütosoolse kontsentratsiooni muutuste [36]. Ainult selle mehhanismi abil saab toimida vereringe. Südame ECC ning sellele koheselt järgnev relaksatsioon toimub inimese südames, puhkeasendis, ligikaudu 60-100 korda minutis, ehk olenevalt südamelöökidest arvust minutis.



Joonis 4: Elektro-mehaaniline sidestus. Üleval paremal on näidatud skemaatiline illustatsioon elektro-mehaanilisest sidestusest, mis seob omavahel aktsioonipotentsiaali, kaltsiumi kontsentratsiooni muutuse ja kontraktsiooni. Vasak paneel näitab ühe südameraku konfokaalset kujutist, millel on värvitud sarkolemma koos raku sissetungivate membraanitorukestega ehk T-tuubulitega. Parema alumine paneel kirjeldab ECC sündmuste ja makroskoopilisel tasemel järgnevate etappide kaupa: 1. sarkolemma depolarisatsiooni aktsioonipotentsiaali toimel, mis käivitab pingetundliku L-tüüpi kaltsiumikanali (LTCC) avanemise; 2. suurenenud diaadilise kaltsiumi tase aktiveerib RyR-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), naatriumkaltsiumivaheti (NCX) ja plasmamembraani kaltsiumi ATPaasi (PMCA) poolt.

ECC on kirjeldatud alljärgnevalt ning skemaatiliselt kujutatud joonisel 4. Aktsioonipotentsiaal liigub mööda sarkolemmat ja läbi T-tuubulite ning tänu sellele toimub rakumembraani de-

polarisatsioon. Selle peale reageerivad pingetundlikud L-tüüpi kaltsiumikanalid, mis avanevad ning kaltsium siseneb rakku (joonis 4, etapp 1) [35]. Kaltsiumi sissevool tõstab rakusisest kaltsiumi kontsentratsiooni, mille tagajärjel avanevad rüanodiinireseptroid (RyRd) sarkoplasmaatilise-retiikulumi (SR, rakusisene organell kaltsiumi talletamiseks) pinnal (joonis 4, etapp 2). See tõstab oluliselt rakusise kaltsiumi kontsentratsiooni [35]. Sellele järgnevalt seondub vaba kaltsium troponiin-C'ga. Sidustumisel tekivad muutused troponiin-I kompleksides, mille tagajärjel paljastub aktiinini molekulil koht, kus võib seonduda müosiini ATPaasiga müosiini peaosa (joonis 4, etapp 3). Sidustumise tagajärjel hüdrolyseerub ATP, mis annab energiat aktiin-müosiin-kompleksis toimuva konformatsioonimuutuse jaoks. Tulemuseks on liikumine müosiinipeade ja aktiini vahel, nii et aktiin- ja müosiinifilamendid teineteisest mööda libisevad, lühendades sarkomeeri pikkust. Protsessi tsüklid toimuvad nii kaua, kuni tsütosoolne kaltsium püsib kõrgeks kontsentratsiooniks [35]. Kuna kaltsiumi sissevool rakku on peatunud ning toimub aktiivne kaltsiumi transport tagasi SR'i läbi sarkoplasmaatilise/endoplasmaatilise retikulumi kaltsiumi ATPaasi (SERCA), naatrium-kaltsiumivaheti (NCX) ja plasmamembraani kaltsiumi ATPaasi (PMCA) poolt hakkab kaltsium seonduma lahtri troponiin-C'st ning südamelihaskrakk saab lõõgastuda (joonis 4, etapp 4). Tsükli lõpus seondub müosiini pea külge uus ATP, mis tõrjub ADP välja ja algne sarkomeeri pikkus taastub [35].

2.4.4 Südame elektrofüsioloogia uurimismeetodid

Südame elektrofüsioloogia uurimiseks leidub mitmeid meetodeid. Meetod millega inimesed tihedamini kokku puutuvad on elektrofüsioloogiline südame uuring. Tegemist on diagnostilise protseduuriga, millega hinnatakse südame elektrilist talitlust ja aktiivsust. Protseduuriga saab määrata südame rütmihäirete teket, olemasolu ning intensiivsust ja määrata sobiv ravi. Uuringut teostatakse kateetrite abil, mis viiakse läbi reieveeni südame õõntesse. Sellele järgnevalt kiirendatakse ja aeglustatakse südame tegevust ning registreeritakse südame elektriline aktiivsus [39].

Antud protseduur uurib makroskoopilisel tasemel südame elektrofüsioloogilist käitumist. Antud töö, aga keskendub üksikute lihaskrakkude elektrofüsioloogia uurimisele. Selleks, et uurida üksikuid rakke kasutatakse *patch clamp* tehnikat, mida kutsutakse eesti keeles membraanilapikese meetodiks. Meetodi leiutas Kenneth Cole 1940. aastatel. Kenneth Cole'i meetodi kuulsaim rakendus on Hodgkin ja Huxley poolt, kes kasutasid seda oma teed rajavates katsetes, kus määrati kindlaks kalmaari aksoni aktsioonipotentsiaali iooniline alus.

Membraani lapikese meetodit täiustasid 1976. aastal Neher ja Sakmann. Neher ja Sakmann rakendasid seda tehnikat esmakordselt pico-amperioonvoolude registreerimiseks läbi üksikute kanalite rakumembraanides. Varasemalt mõõdeti sarnaseid üksikkanali sündmusi taastatud lipiidikihis. Läbimurde eest said Neher ja Sakmann 1992. aastal Nobeli Preemia. Nende poolt täiendatud meetodi mehaaniline aspekt on võrdlemisi lihtne. Mehaaniliselt surutakse 1 µm läbimõõduga klaasist mikropipeti ots õrnalt vastu rakumembraani. Isoleeritud membraanilapp, mis sulgeb pipeti suu, pannakse seejärel rakuväliselt küljelt läbi pipeti kindla pinge

või voolu alla, nii, et membraanilapp on isoleeritud ülejäänud rakumembraanist [40].

2.5 Elektrofüsioloogia modelleerimine

2.5.1 Miks üldse kasutada matemaatilisi mudeleid?

Kuna raku elektrofüsioloogia sõltub naatriumi, kaaliumi, kaltsiumi ja teiste ionide liikumisest läbi poolläbilaskvate raku- ja rakusiseste membraanide [41] oleks vaja teha mitmeid kordumõõtmisi iga huvipakkuva kanali, voolu ja kompleksi jaoks. Ehk siis, teha korduvaid membraani lapikese mõõtmisi ei ole praktiliselt võimalik. Täiendavalt on süsteem piisavalt kompleksne, et uurides erinevaid raku aspekte eraldiseisvalt ei annaks korralikku pilti, sest antud kanalite ja voolude käitumine ei ole üksteisest eraldatud elavas organismis. Selle tõttu võetakse kasutusele õigustatud lihtsustustega matemaatilised mudelid.

Samuti on tegemist mitmekülgsete bioloogiliste protsessidega, kus ei ole võimalik ennustada süsteemi ja uuritava parameetri või parameetrite käitumist, kui antud süsteeme skaleerida. Skaleerimise all mõeldakse üleminekuid raku tasandilt kõrgematele tasanditele nagu näiteks organi tasemele, sest süsteemis esinevad uued kompleksed käitumismustrid eneseorganiseeruvusest ja väliste faktorite mõju kasvab [42, 43].

Probleemiks võib olla ka eksperimendi andmemassiividest sobivate andmete välja kaevamine ja tõlgendamine. Nende probleemide lihtsustamiseks ja lahendamiseks on samuti mõistlik kasutusele võtta komplekse süsteemi lihtsustatud mudel.

Mainida tuleb seda, et tihtipeale on kasulik rakendada nii kontseptuaalseid kui ka matemaatilise mudeleid koos, et vähendada mõlema mudeli puudujääke ja leida sügavamaid teadmisi käsitletaval teemal. Samuti on soovituslik sobivusel kasutada erinevatel skaaladel leiduvaid mudeleid nii valideerimiseks kui ka uute käitumiste leidmiseks [42].

2.5.2 Ioonide liikumise kirjeldamine

Elektrofüsioloogia matemaatilises modelleerimises on oluline kirjeldadaioonvoolusid. Kuna rakkudes liiguvad ioonid läbiioonikanalite mööda elektrokeemilisi gradiente - ehk ioonide liikumist mõjutavad nii difusioon kui ka elektrivälja jõud, siis tuleb nende kirjeldamiseks leida sobiv valem. On teada, et kui ioonide difusioon ühes suunas on võrdne ja vastupidine elektriväljast tingitud liikumiskiirusega, siis on saavutatud tasakaal. See juhtub siis, kui transmembraanne pinge on võrdne Nernsti tasakaalupotentsiaaliga. Antud suhte tuletas Nobeli preemia laureaat Walther Nernst 19. sajandi lõpus (1). Samust valemit kasutatakse ära ka ioonide liikumise kirjeldamiseks ka matemaatilises modelleerimises.

$$E_x = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{[x_0]}{[x_i]} \right) \quad (1)$$

Kus E_x on Nernsti tasakaalupotentsiaal, R on ideaalse gaasi konstant, T temperatuur Kelvinites, z on iooni valents, F on Faraday konstant, x_0 on rakuvälise ionide arv ja x_i on rakusiseste ionide arv. Selle valemi abil on võimalik jälgida rakusiseseid ja -väliseid ionikonsentratsioone [42].

Nernsti valem ei ole aga eksimatu ja ka selle tõttu ei ole ka matemaatilised mudelid eksimatud.

- Kui kontsentratsioonid on väga suured, muutub Nernsti võrrand (1) ebatäpseks. Sellisel juhul, kui reageerivate ainete kontsentratsioonid muutuvad väga suureks, tuleb potentsiaalide määramiseks teha katseid.
- Väga lahjendatud lahuste puhul võib prognoositav potentsiaal ulatuda lõpmatuseni, mis ei vasta tegelikele tingimustele.
- Võrrandit (1) ei saa kasutada, kui raku läbib vool, sest vool muudab ionide aktiivsust (teisiti öeldes efektiivset kontsentratsiooni) [44].

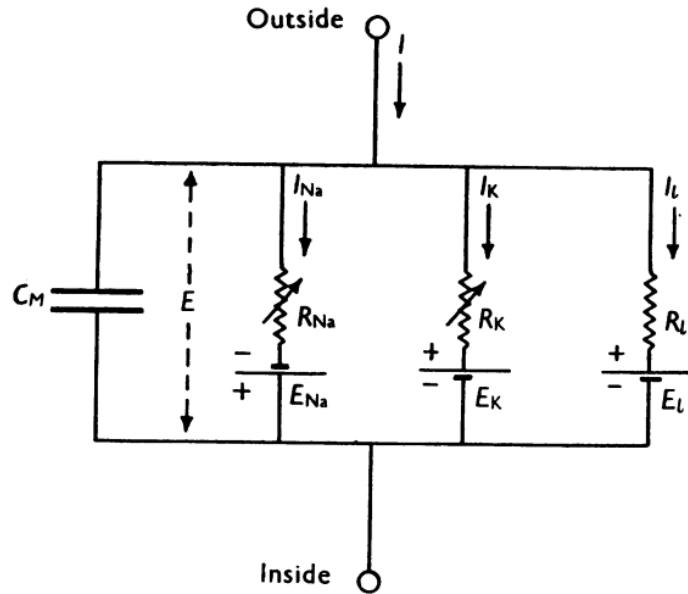
2.5.3 Raku elektrofüsioloogia kui vooluahel

Mudelite lihtsustamiseks on leitud vägagi lihtne, kuid hästi õigustatud meetod. Nimelt, rakumembraanide elektrilist käitumist saab käsitleda elektrialhelana. Esimene selle-laadne käsitlus, millest autor on teadlik, tuleneb Hodgkin ja Huxley artiklist, kus uuriti hiidkalmaaride aksione [45]. Antud artikli eksperimentaalsete tulemuste arutelus püstitati kirjeldus sellest kuidas kujutada rakumembraani elektrilist käitumist elektrialhelana (joonis 5). Artiklit ümber sõnastades, voolu saab läbi membraani kanda kas, membraani mahtuvuse laadimise teel või läbi ionide liikumise läbi takistite, mis asetsevad paralleelselt kondensaatoriga [45]. Kogu vool on jagatudioonvooludeks ja lekkevooluks. Lekkevoolu alla lähevad naatriumist ja kaltsiumist erinevad ioonid. Ioonivoolu iga komponent on määratud liikumapaneva jõuga, mida saab mõõta elektrilise potentsiaali erinevusena ja läbilaskvuskoeffitsiendiga, mille mõõtmeks on juhtivus [45].

2.6 Südame mudelite ajaloost

Südame kirjeldamiseks eksisteerib erinevaid mudeleid ja nende rakendamine sõltub eesmärgist ja mudelis tehtud eeldustest. Selle töö kontekstis jäetakse välja õppe-eesmärgil loodud anatoomiliselt korrektsed mudelid, 3-mõõtmelised arvutikujutiste mudelid ja teistel eesmärkidel loodud mudelid, sest antud kontekstis ei saa neid rakendada. Töös jäetakse välja ka inimsüdame ja teiste loomade elektrofüsioloogia mudelid, sest katseid tehti hiirtesüdameitel ja seetõttu on mõistlik jääda vastava mudeli juurde.

Autori adapteeritud mudeli mõistmiseks on tehtud ülevaade elektrofüsioloogiliste mudelite ajaloost, selleks, et mõista tehtud mudeli valikut.



Joonis 5: Närviraku membraan kui elektriabel. Membraani kujutav elektriline vooluahel. $R_{Na} = 1/g_{Na}$; $R_K = 1/g_K$; $R_L = 1/g_L$. Kus naatriumi ja kaaliumi ioonvoole läbi membraani modelleerivad takistid R_{Na} ja R_K , mille takistused varieeruvad ajas ja vastavalt membraanipotentsiaalile. Teised komponendid on ajas konstantsed. Võetud Hodgkin ja Huxley originaalartiklist. [45].

2.6.1 Hodgkin ja Huxley elektrofüsioloogia mudel

Töös on eespool mainitud, et südamerakke saab modelleerida kui elektriabelaid elektrofüsioloogia kontekstis. Antud formulatsiooni peale, et elektrofüsioloogilisi protsesse saaks kirjeldada elektriabelatena, tulid Hodgkin ja Huxley oma 1952. aastal avaldatud artiklis [45]. Eespool aga jäeti välja mudeli matemaatiline kirjeldus ning Hodgkin ja Huxley eeldused ja õigustused antud mudeli rakendamiseks. Kindlasti ei saa jätta välja nende mudeli poolt tehtud avastusi ja nende tehtud töö poolt püstitatud küsimusi ja arengusuundasid.

Eespool sõnastati ümber artiklit, et voolu saab läbi membraani kanda kas siis membraani mahtuvuse laadimise teel või siis ioonide liikumise teel läbi takistite, mis asetsevad paralleelselt kondensaatoriga [45]. Seega, saab membraanivoolule anda järgneva matemaatilise kuju:

$$I = C_M \frac{dV}{dt} + I_i, \quad (2)$$

kus I on kogu membraani voolutihedus, I_i on ioonvoolu tihedus, V on membraanipotentsiaali nihkumine puhkepotentsiaalst (negatiivne depolarisatsioon). C_M on membraani mahtuvus pindalaühiku kohta (eeldatavalt konstantne) ja t on aeg [45]. Kokkuleppeliselt tähistasid Hodgkin ja Huxley positiivsete ioonide rakust välja liikumist positiivse elektivooluna.

Sarnaselt on koostatud membraani voolutihedus ka Bondarenko et al. hiire vatsakeste müotsüütide aktsioonipotentsiaali arvutimudelil [46]. Antud valem on kõige lihtsam kirjeldus, mida saab kasutada. Valem annab membraani mahtuvuse, mis on sõltumatu V suurusest ja

märgist ning aja kulgemise mõju on vähene [47].

Tõendid selle kohta, et mahtuvusvool jaioonivool on paralleelsed võrrandis (2), on mõõdetudioonivoolude ja arvatatudioonivoolude ühtivus [45]. Mis on saadud võrrandi (2) nõrkus on membraani dielektrilisi kadudega mitte arvestamine [45, 48]. Kuna kaod on võrdlemisi tühised siis võib antud juhul nõrkust ignoreerida.

Tänu nende uudsele lähenemisele elektrofüsioloogias, ehitasid Hodgkin ja Huxley eduka närvirakkude elektrofüsioloogia mudeli ning autor julgeb väita, et see on olnud inspiratsiooniks paljudele teistele mudelitele ja seda õigustatult.

2.6.2 McAllister, Noble ja Tsien

Autori parimate teadmiste juures on esimeseks südame elektrofüsioloogia mudeliks, mis kasutab Hodgkin ja Huxley formuleeritud võrrandit (2) McAllisteri, Noblei ja Tsieni artiklist pärit mudel, tihti kutsud ka M.N.T mudeliks. Nende loodud mudel sai täiendavaid modifikatsioone tänu eksperimentaalsete meetodite arengule, mis ei olnud kättesaadavad Hodgkin ja Huxley jaoks 1952. aastal [49, 45].

Sõltumata uutest uurimismeetoditest ja teadmistest on mudeli puudused suured. Esiteks, McAllister et al. mudel suudab kirjeldada vaid membraani aktsioonipotensiaale. Teiseks, mudel ehitati mitmete eksperimentaalsete andmete alusel ja seetõttu ei saanud autorid olla kindlad, et eksperimendi läbiviimise erinevused ei mõjuta mudelit. Mis tegi mudeli arendamise veelgi problemaatiliseks oli see, et kohati olid andmed kas poolikud või ebaadekvaatsed [49].

Puudujääkidest ja probleemidest sõltumata, õigustasid autorid mudeli loomet sellega, et nad olid lähenemas tol hetkel olevale eksperimentidest saadavate teadmiste piirini voolukomponentide kineetika ja suuruste valdkonnas. Seetõttu löid nad enda mudeli, et eksperimentides genereeritud keerukaid andmeid saaks esitada kvantitatiivselt ja kasutuskõlblikult [49]. McAllister et al. mudel leidis kasutust teiste mudelite loomes, millest kõige olulisem oli DiFrancesco ja Nobleiioonpumpasid ja kontsentratsiooni muutusi sisaldav südame elektrilise aktiivsuse mudel [50].

2.6.3 DiFrancesco ja Nobel

Viimane ajalooliselt oluline mudel, mis on väärt mainimist, on DiFrancesco ja Nobeli mudel, mis sisaldas endasioonipumpasid ja kontsentratsioonimuutusi. Mudelis on kaltsiumioonide ammendumine ja akumuleerumine rakuvälises ruumis esitatud kas osaliste diferentsiaalvõrranditega difusiooni jaoks silindrilistes või sfäärilistes preparaatides, milles rakuvälise kontsentratsioon rakkudevahelises ruumis on ühtlane [50]. Selle abil suudeti teha suuri samme mõistmaks kaltsiumdünaamikat. Nimelt, suutsid DiFrancesco ja Nobel näidata, et aeglasemad kaltsium- või kaltsium-aktiveeritud voolud, nagu naatrium-kaltsium-vahetusvool või kaltsium-kontrollitud voolud või palju aeglasem kaltsium-kanal peavad täitma dünaami-

list rolli. Varasemalt omistati seda ühte tüüpi kaltsiumikanali kineetikale. See mudeli omadus omakorda tähendab, et repolarisatsiooniprotsess peab olema seotud inotroopse seisundiga, mida näitavad ka eksperimentaalsed tulemused [50]. Selle tõttu oli mudel omal ajal revolutsiooniline ning on olnud alus sellele järgnevatele mudelite, mida on näha ka Bondarenko enda mudelis [50, 46].

2.7 Bondarenko hiire vatsakeste müotsüütide aktsioonipotentsiaali arvutimudel

Mudel avaldati esimest korda teadusatriklis 2004. aasta 13. mail [46]. Mudel keskendub spetsiifiliselt hiire vatsakeste müotsüütide aktsioonipotentsiaali modelleerimisele. Mudeli ehitamiseks toetuti membraanilapikese eksperimentaalsetele andmetele. Kus oli võimalik, rakendati Markovi mudeleid ionikanalite molekulaarse struktuuri ja funktsiooni kujutamiseks. Komponentide voolude oletatavate molekulaarsete aluste määramine võimaldab antud mudelit kasutada geneetiliselt muundatud transgeensete hiire südamerakkude käitumise simuleerimiseks ning on ka üheks põhi põhjuseks, miks seda adapteeritakse antud töös. Seda, et mudelit saab rakendada geneetiliselt muundatud hiirte uurimiseks on olnud selle mudeli suurim läbimurre. Mudeli teiseks tähtsamaks osaks on detailne rakusisene kaltsiumi dünaamika kirjeldus, ilma milleta ei saaks töös püstitatud hüpoteesi adekvaatselt testida [46].

Bondarenko võttis oma mudeli loomes palju üle eelkäijatest, kaasa arvatud nende puudused. Põhi puudus mudeli juure on see, et need ehitatakse membraani pinge ja voolu katseandmete alusel, kuid need samused katsed ei ole alati täielikud või ei pärine samalt loomaliigilt [46]. Teisisõnu, puudub kindel standard, mille järgi oleks kõik mudelid loodud. Bondarenko on oma mudelis probleemi mitigeerimiseks teinud lisanduvaid mõõtmisi, et vähendada eripärasid kaalium- ja naatriumvoolude käitumises. Bondarenko kasutas samuti oma mudeli loomaks oma varasemalt loodud kaltsiumi gradiendi mudelit, mis samuti vähendab eriallike kasutamise probleemi. Lisaks sellele on mudelis kasutatud ka Jafri, Rice ja Winslow poolt tehtud võrrandeid [46, 51, 52].

Kogu Bondarenko mudel põhineb siis 40 tavalisel diferentsiaalvõrrandist koosneval komplektil, mis on lahendatud neljanda järgu Runge-Kutta meetodiga, mille ajasamm on 0,0001 ms. Kokku on mudelis 112 võrrandit, mis kirjeldavad ära hiire vatsakeste müotsüütide aktsioonipotentsiaali [46].

3 Metoodika

3.1 Kasutatud eksperimentaalsed andmed

Töö raames on autor kasutanud katsete andmeid, mis olid talle tagatud juhendaja poolt. Siiski, on oluline mainida kuidas isoleeriti hiirte südamerakud ja kuidas neid uuriti.

Töös kasutatud andmed on pärit AGAT-knockout artikli eksperimentidest [5]. Originaalselt uuritakse artiklis arginiiniglütsiinamidiinotransferaasi-puudulikke hiiri. Eksperimendi kontrollgrupis ei tehtud väliseid geneetilisi modifikatsioone. Antud hiirtel, nii metsiktüüpi (WT, kontrollgrupp), geneetiliselt muundatud (KO) kui ka kreatiiniga toidetud KO (KO+Cr), olid südamest isoleeritud rakud adregeeniliselt stimuleeritud isoprenaliiniga ja osad stimuleeritud ilma isoprenaliiniga. Uurimisel on võetud ainult adregeeniliselt isoprenaliiniga stimuleeritud rakud kuna mõõdetavad voolud isoprenaliini korral on suuremad [5] ning erinevused on selgemini eristatavad.

Katseandmed, mida antud töös kasutati olid, mõõdeti kasutades membraanilapikese meetodit, kus kontrolliti membraanipotentsiaali ning mõõdeti voolu läbi L-tüüpi kaltsiumi kanalite vastavalt potentsiaali muutmisele -80 mV 'lt 0 mV 'le ja tagasi. Teiste, membraani läbivate voolude tõkestamiseks olid kasutusel farmakoloogilised võtted. Naatriumi vool oli inhibeeritud tetrodotoksiiniga ja kaaliumi voolu tõkestamiseks asendati raku välises kui ka mikropipeti lahuses kaalium tseesiumiga. Samuti, enne mõõtmiste tegemist tühjendati raku SR kaltsiumist kasutades kofeiini. Katseandmed olid mõõdetud 0.0001 ms ajasammuga ning normeeritud raku mahtuvusega. Tüüpiline mõõdetud LTCC kaltsium vool on näidatud joonisel 6 sinisega.

3.1.1 Eksperimentide metoodika

Hiired olid hoitud kohalikus vivaariumis ning neile oli tagatud pidev ligipääs veele ja toidule, 22-23 kraadises keskkonnas 12 tunnise pimedavalge tsükli. KO grupp oli eraldatud WT grupist, et vältida kreatiini tarbimist läbi kaprofaagia. Kuna KO hiired olid kõhnemad, aga aktiivsed, hoiti KO hiiri gruppides. KO hiirtele tagati märgtoitu ja soojenduslamp ühel pool puuri, et hiired saaksid end termoreguleerida vastavalt vajadusele. Kõigile hiirtele tagati samat tüüpi toitu, ainsaks erinevuseks oli KO+Cr grupp. Antud grupi toidus oli lisa kreatiini (5 g/kg kohta) [5]. Kõik KO+Cr ning WT hiired, kes andsid oma elu eksperimendi jaoks, olid vanuses 6.5 kuni 16.5 kuud. KO grupi hiired olid vanuses 6.5-7.5 kuud vanad enne oma elu andmist [5].

Loomade genotüüpimiseks viidi läbi polümeraasi ahelreaktsiooni vastavalt artiklis leiduval protokollile. Täiendavalt värviti osa kaltsiumist fluorestseeruva värviga, et oleks võimalik läbi viia kaltsiumikäitumise uurimine fluorestsents mikroskoopia abil ning sellega on antud mudelis arvestatud [5].

3.2 Töös adapteeritud matemaatiline mudel

Töös tehtud adapttsioonis on mudelis ainult 32 võrrandit. Kuna adapteeritav mudel on loodud aktsioonipotentsiaali (AP) modelleerimiseks, siis arvutatakse Bondarenko mudelis membraanipotentsiaali muut. Käesolevas adapttsioonis oli juba katseandmetes ette antud membraanipotentsiaali muut. Seega tuli mudelis teha vastavad muudatused, et mudel arvutaks LTCC voolu, vastavalt eksperimentides kasutatud potentsiaalidele. Selleks toodi sisse mudeli optimeerimiseks ka membraanipotentsiaali valem optimeeritava vahemiku jaoks (Lisa 1, võrrand L4). Teisisõnu, adapttsioonis ei otsita AP muutusi vaid LTCC voolu. Selle tõttu jäeti adapttsioonis välja kõik võrrandid, mis ei mõjuta LTCC voolu. Selle tõttu ei leidu adapttsioonis naatrium ioonkanalite ega kaaliumkanalite võrrandeid välja arvatud naatrium-kaltsium ionvahetajat kirjeldav võrrand (Lisa 1, võrrand L26). Võrrandite välja jätmisel oli ka teine praktiline põhjus, milleks oli arvutusaja vähendamine.

Katsetes kasutati ka fluorestseeruvat indikaatorvärvi rakusisese kaltsiumi kontsentratsiooni muutuste registreerimiseks. Kuna antud värviga seondub kaltsiumiga, ehk käitub kui kaltsiumi puhvrina, siis tuli lisada mudelisse vastav võrrand (Lisa 1, võrrand L32).

Kuna eksperimentides olid välja lülitatud kanalid, mis vastutasid kaltsiumi vabanemise fluktuatsioonide (J_{rel}) eest, siis muudeti ka adapteeritud võrrandeid nii, et (J_{rel}) oli võrdsustatud nulliga.

Mudelit adapteerides muudeti ka mõnede ühendite kontsentratsioone, et need vastaksid Laasmaa poolt läbi viidud eksperimentidele ja seetõttu erievad Bondarenko poolt kajastatud kontsentratsioonidest mõnel kohal. [5, 46].

Kõik kasutatud mudeli võrrandid ja parameetri väärtused on välja toodud Lisas 1.

3.2.1 Mudeli optimeerimine vähimruutudega

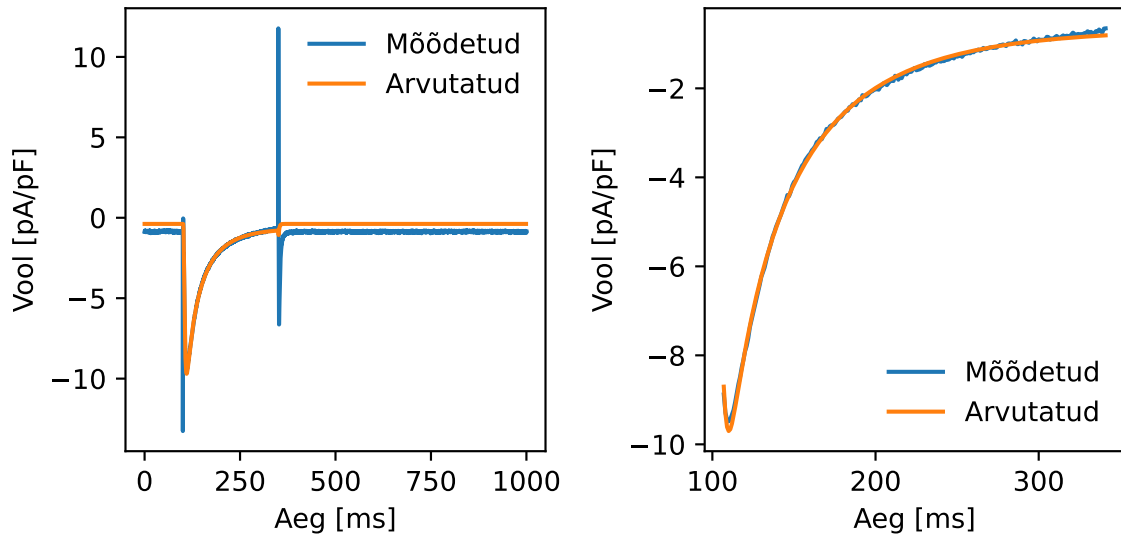
Adapteeritud mudelil viidi iga eksperimendi jaoks läbi optimisatsioon, et leida uuritavate parameetrite reaaleluliselt ligilähedased väärtused. See on oluline, sest antud parameetreid otseselt uurida ei ole kahjuks lihtsasti teostatav ja seetõttu on modelleerimine ainus realistlik moodus saada kätte otsitavad väärtused.

Selleks, et mudelit optimeerida, pidi mudel suutma võimalikult ligilähedaselt modelleerida eksperimentaalses teel saadud südame aktsiooni-potentsiaalis olevaid voolusid. Antud ülesande täitmiseks rakendati optimeerimiseks vähimruutude meetodit.

Meetod valiti autori poolt juhendaja soovitusel, sest tegemist on lihtsa optimeerimismeetodiga, mida rakendatakse laiadlaselt ja sellele on ehitatud Pythonis ulatuslik teek, `scipy`, kust imporditi sisse `least_squares` meetod [53].

Katseandmeid lähendades mudeliga olid otsitavateks parameetriteks võetud; Esiteks, kalt-

siumi difusiooni ajakonstant tsütosoolist diaadilisse ruumi τ_{xfer} . Teiseks, kaltsiumi poolt põhjustatud LTCC inaktivatsiooni pool-küllastumise konstant, $K_{pc, half}$. Kolmandaks, L-tüüpi kaltsiumkanali pöördumispotentsiaal, E_{CaL} . Neljandaks, eksperimendi moonutusfaktor, τ_{RC} . Viies ja viimane kohandatud parameeter oli Spetsiifiline maksimaalne juhtivus L-tüüpi kaltsiumkanalil, g_{CaL} . Optimiseerimise käigus kohandati loetletud parameetreid kuni soovitud tolerantsini (suurusjärgus 10^{-8}). Optimiseerimise lõpus genereeriti graafik, mis siis võrdles mudeli tulemust eksperimentaalse vooluga. Näide katseandetest ja optimiseerimise tulemustest on toodud joonisel 6.



Joonis 6: Voolu vähimruutude optimiseerimine. Vähimruutude optimiseerimise näide, kus lähendati mudelit, et sobitada eksperimentis mõõdetud vooluga (sinine) mudeli voolu (oranž). Joonise vasakul pool on terve eksperimendi mõõdetud voolu graafik koos mudeli optimiseeritud vooluga. Paremal pool on ainult optimiseeriseks valitud ajalõik.

Kuna katsetes kasutati RC-ahela manuaalset kompenseerimist, mis ei ole võimeline täielikult kompenseerima voolu fluktuatsioone, tuli lisada moonutus mudeli poolt arvatud LTCC voolule. Seetõttu oli ka moonutusfaktor τ_{RC} valitud üheks otsitavaks parameetriks vähimruutude meetodiga.

Saadud optimiseeritud parameetrid salvestati vastavalt eksperimendi identifikaatori järgi eraldi .csv failidesse. Järgnevalt koguti kõikide eraldatud eksperimentide failid kokku ühte csv faili ning jätkati saadud tulemuste statistilise olulisuse ning kirjeldava statistika uurimisega.

3.3 Programmeerimiskeel ja mudeli kättesaadavus

Töös adapteeriti Bondarenko hiire vatsakeste müotsüütide toimimispotentsiaali arvutimudelit Pythoni 3. versioonis ning programmeerimiseks kasutati Spyder IDE [54, 53] ja kõik töös rakendatud skriptid ja versioonid on laetud üles GitHub'i. Python [53] valiti oma lihtsuse ja mugavuse tõttu ning loodud skriptid laeti üles GitHubi, et autoril ja juhendajal oleks lihtne hoida silma peal tehtud muudatustel ja tõstata vajadusel probleeme. Teiseks oli soov teha

kood lihtsasti rakendatavaks ja loa küsimisel jagatavaks huvitatud osapooltele.

3.4 Statistika

Antud töös kasutati gruppide vaheliseks statistilise erinevuse hindamiseks dispersioonanalüüsi. Dispersioonanalüüsiga, saab võrrelda enam kui kahte gruppi nende keskväärtuste põhjal. Dispersioonanalüüsi kõige lihtsam mudel on *One-Way ANOVA* ehk ühesuunaline ANOVA, mis eeldab vähemalt kahe tunnuse olemasolu: kategoorilise- ja arvtunnuse [55, 56].

Antud töös kasutati JASP tarkvara statistika tegemiseks kuna tegemist on laialt levinud vabalt kättesaadava tarkvaraga. Autor valis selle programmi just eelneval põhjusel ja ka tarkvara lihtsuse ja kiiruse tõttu [57].

Selleks, et teha dispersioonanalüüsi peavad järgnevad tingimused olema täidetud:

- sõltuv muutuja peab olema mõlemas grupis normaalselt jaotunud;
- võrreldavad grupid peavad olema üksteisest sõltumatud;
- dispersioonid võrreldavates gruppides peavad olema ligikaudu võrdsed;
- sõltuv tunnus peab olema arvtunnus [55, 58, 59].

Eksperimendi andmed on sõltumatult ning kõik mõõdetud arvtunnused on sõltumatud ja iga mõõtmine vastab ülimalt ühele hiirele. Kategoorilised tunnused on samuti sõltumatud ning on tehtud eeldus, et dispersioonid võrreldavates gruppides on ligikaudu võrdsed.

Täiendavalt kontrolliti kõigi optimiseeritud parameetrite normaalsust ning selleks rakendati Shapiro-Wilks testi ja andmeid kontrolliti ka visuaalselt Q-Q joonisega. Rakendatud testimismeetodi avaldasid Šapiro ja Wilk 1965. aastal [60] ning valiti selle tõttu, et see on üldlevinud andmete normaalsuse kinnitamise test.

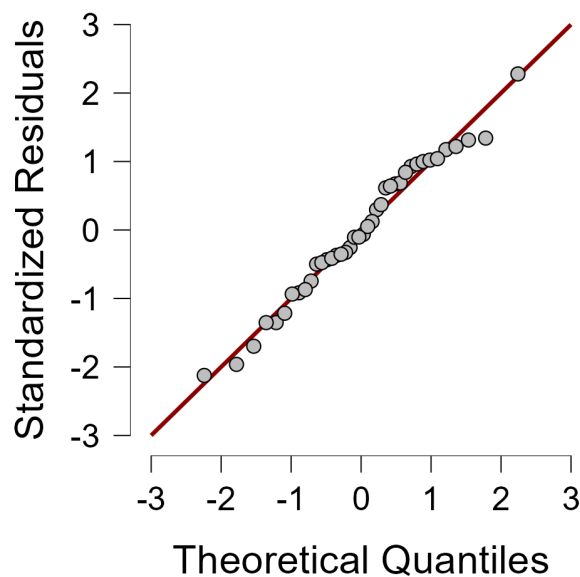
Q-Q joonis, ehk kvantiil-kvantiil joonis, on visuaalne tööriist mille abil saab kiiresti visuaalselt hinnata kas antud andmed tulevad gaussi- või eksponentsiaaljaotusest. Juhul kui meie andmed moodustavad ligikaudu 45 kraadise nurgaga sirge, siis võib olla kindel, et andmed on jaotunud normaaljaotusele vastavalt [61].

4 Tulemused

Antud töö eesmärgiks oli saada vastus küsimusele, kas kaltsiumi liikumine südameiasrakus diaadilisest ruumist raku tsütosooli on muutunud WT ja KO grupi vahel ning kas KO hiirte kreatiiniga toitmine avaldab efekti? Selleks kasutati katseandmete lähendamist matemaatilise mudeliga, mis võimaldab määrata kaltsiumi liikumist tsütosoolist diaadilisse ruumist kirjeldavat ajakonstanti, τ_{xfer} . Alljärgnevalt on välja toodud τ_{xfer} parameetri väärtuste statistiline analüüs erinevate fenotüüpide ja sugude vahel.

4.1 Normaalsuse kontroll

Parameetri τ_{xfer} normaalsuse kinnitamiseks joonistati JASP tarkvaraga QQ-graafik, mis on ka välja toodud joonisel 7 [57]. Jooniselt on näha, et andmepunktid moodustavad ligikaudselt sirge ning võib olla kindel, et andmed jaotunud normaalselt. Seda kinnitas ka tehtud Shapiro-Wilksi test, mille tulemuseks saadi p-väärtuseks 0.975, mis jääb märkimisväärselt kaugelt kriitilisest piirist.



Joonis 7: Parameetri τ_{xfer} QQ-graafik

4.2 ANOVA tulemused

Dispersioonanalüüsis, nagu eelnevalt mainiti, oli valitud arvtunnuseks τ_{xfer} , kategoorilisteks tunnusteks valiti sugu ja fenotüüp. Uurimise all olid ainult β -adrenergiliselt isoprenaliiniga stimuleeritud südamerakud. ANOVA läbiviimisel valiti soovituslikult 2. tüüpi summeerimine ning JASP tarkvara rakendades saadi järgnevad tulemused [57].

Tabelis oleva ühesuunalise ANOVA tulemused näitavad testis olevate faktorite mõjusust. On näha, et mitte ükski antud faktoritest ja faktorite vahelistest interaktsioonidest ei too esile sta-

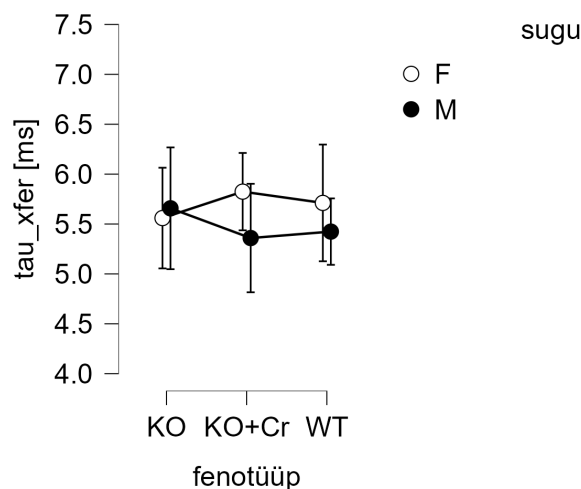
Tabel 1: Kaltsiumi liikumise diaatilisesest ruumist tsütosooli kirjeldava ajakonstandi, τ_{xfer} , ANOVA tulemused, Va - Vabadusastmed

Mudel	Ruutude summa	Va	Ruutkeskmine	F	p
Sugu	0.616	1	0.616	0.368	0.548
Fenotüüp	0.024	2	0.012	0.007	0.993
Sugu * Fenotüüp	0.516	2	0.258	0.154	0.858
Resiidid	56.899	34	1.673		

tistiliselt olulist erinevust. Ehk siis, p-väärtused ei ole ületanud 0.05 olulisusenivood, mis on bioloogias üldlevinud olulisusnivoo. Teisisõnu, ei saa aktsepteerida null-hüpoteesi, et kaltsiumi difusioon KO hiirtes on rohkem takistatud kui WT hiirtes ühesuunalise ANOVA alusel.

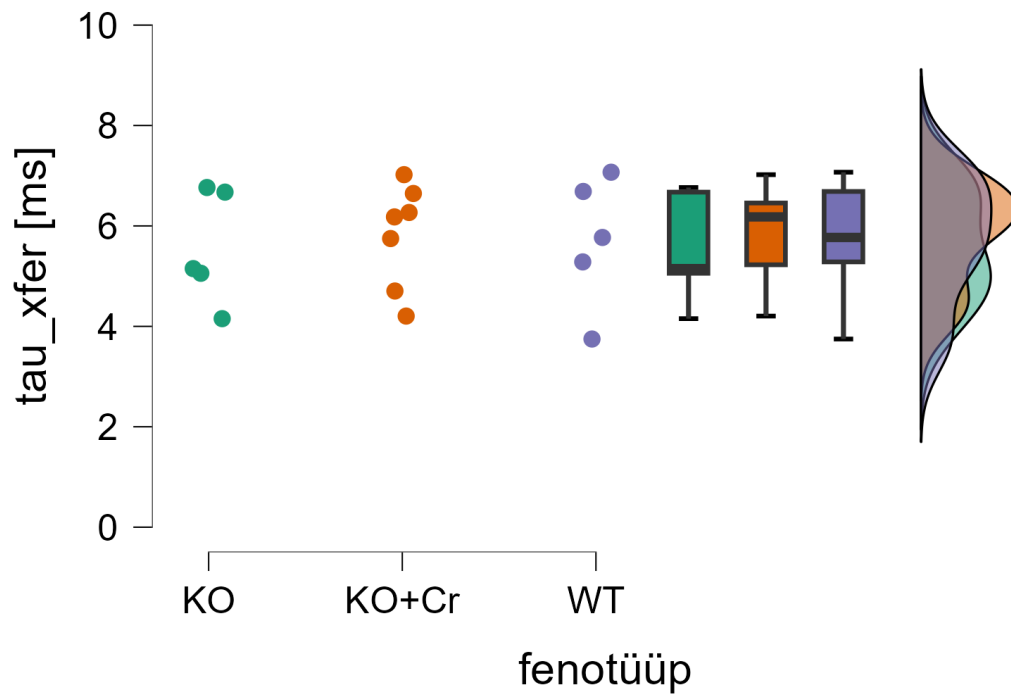
4.3 Kirjeldav statistika

Tulemuste paremaks mõistmiseks koostati ka kirjeldava statistika joonised. Joonisel 8 on välja toodud KO, KO+Cr ja WT gruppide τ_{xfer} võrdlus, millest saab välja lugeda seda, et visuaalselt olulist erinevust ei esine gruppide ega sugude vahel. Suured standardvead on graafikul omapärased bioloogias ning suur viga tuleneb sellest, et on mitmeid faktoreid mis võivad tulemusi mõjutada, aga neid faktoreid ühtsena hoida ei ole lihtsalt teostatav.

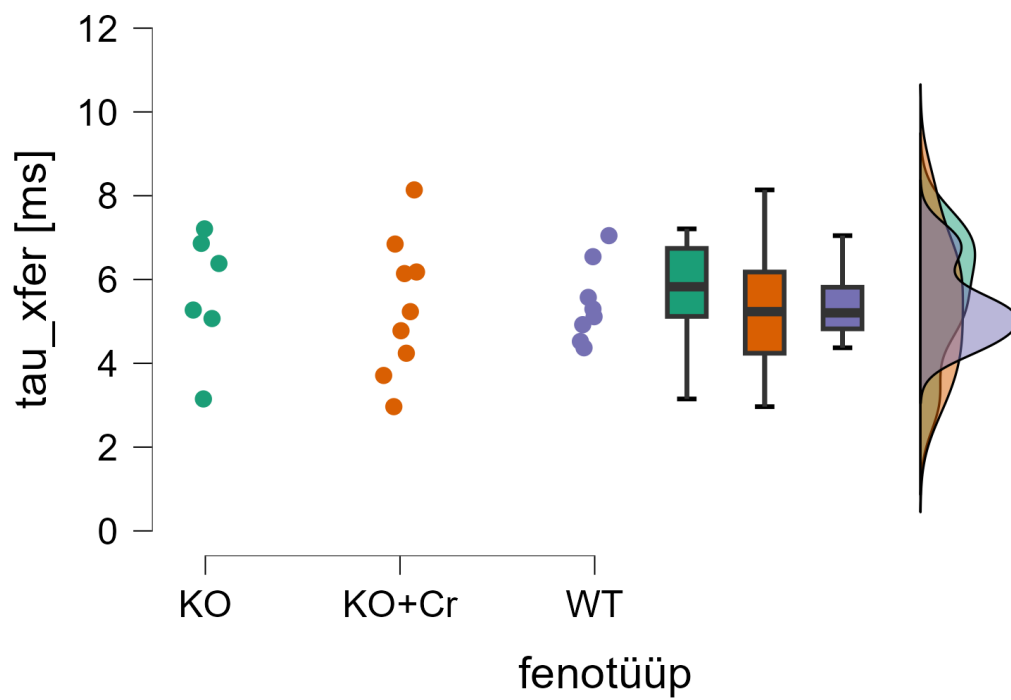


Joonis 8: Parameetri τ_{xfer} gruppide ja sugude (F— emased, M — isased) vaheline võrdlus, keskväärtused koos standardveaga kuvatud.

Joonisel 9 on *raincloud* graafik emastest hiirtest, kus punktide jaotuses ei ole näha suuresti erinevaid andmepunkte, mis erineks oluliselt teistest vaatlustest. Täiendavalt on joonisel ka jaotustihedus joonistatud, kuid väheste andmepunktide tõttu ei saa neid lugeda täpseteks. Joonisel 10 on samuti näha *raincloud* graafikut isaste hiirtele.



Joonis 9: Parameetri τ_{xfer} emaste hiirte *raincloud* joonis.



Joonis 10: Parameetri τ_{xfer} isaste hiirte *raincloud* joonis.

4.4 Teiste muutujate analüüs

Mudeli optimeerimise teel leitud τ_{xfer} väärtuste puhul ei leitud statistiliselt olulist erinevust gruppide vahel. Kuna mudelis said ka LTCC parameetrid optimeeritud sai boonusena uuritud ka LTCC parameetrid. LTCC parameetreid uuriti samade meetoditega nagu parameetrit τ_{xfer} . Uurides tekkis esialgne lootus, et muutunud parameetritel E_{CaL} leidub statistiliselt oluline erinevus, kuid kirjeldava statistika lähemal uurimisel ei saanud see kinnitust. Teiste parameetrite nagu $K_{pc,half}$ ja g_{CaL} lähemal uurimisel ei leitud ka nendel parameetritel gruppide vahelisi statistiliselt olulisi erinevusi. eksperimendi moonutusfaktori τ_{RC} uurimisel ei leitud ka mingit olulist erinevust gruppide vahel, mis oleks võinud viidata RC-ahela manuaalses kompenseerimises tehtud vigadele antud töös.

5 Arutelu

Töös kasutatud mudel on adaptatsioon Bondarenko et al. 2004. aastal koostatud hiire vatsakeste müotsüütide aktsioonipotentsiaali arvutimudel, et uurida kreatiini puudulike hiirte kaltsiumi difusiooni diadilisse ruumi tsütosoolist. Töö alguses püstitati hüpotees, et τ_{xfer} erineb oluliselt WT, KO ja KO+Cr hiirte vahel. Juhul kui antud hüpotees osutuks tõeseks, saaks öelda, et kreatiini puudulikus omab kaltsiumi difusioonis tsütosoolist diadilisse ruumi olulist rolli. Teisisõnu, τ_{xfer} omaks rolli muutunud kaltsiumi vooludes ja südame käitumises kreatiinipuudulike hiirte südames. Töös kasutati hüpoteesi uurimiseks mudelit ja mudelit optimeeriti vähimruutudega. Saadud tulemuste analüüsi järgselt tuli hüpotees ümber lükata. Sellele järgnevalt uuriti ka teisi parameetreid, mida eespool optimeeriti, juhul kui mõni teine parameeter näitab olulist erinevust muutunud kaltsiumvoolude puhul. Seda aga ei juhtunud.

Nimelt, töös adapteeritud mudel ja selles sisalduv huvipakkuv parameeter τ_{xfer} , ei omanud ühesuunalise ANOVA järgi statistiliselt olulist erinevust uuritavate gruppide vahel. Tulemust toetasid ka kirjeldava statistika joonised, kus ei tuvastatud statistiliselt olulisi kõrvalekaldeid.

Täiendavalt uuriti teiste huvipakkuvate parameetrite statistilist olulisust ühesuunalise ANOVA-ga. Samuti tuli tõdeda, et parameetrid E_{CaL} , $K_{pc, half}$, g_{CaL} ja τ_{RC} , ei oma statistiliselt olulist rolli.

Bondarenko mudelil on olemas puudused nagu kõigil teistel mudelitel ning neid tuleb kindlasti meeles pidada kui antud mudelit rakendada teadustöös.

Esimene kitsaskoht on see, et mudel koostati 2004. aastal ning loodi tolle aja parimate teadmiste juures. Tänapäevaks on kindlasti teadmised ja mõõtmised edasi arenenud, aga mudel on siiski võrdlemisi uus ja autor ei ole hetkel teadlik teistest laialdaselt kasutuses olevatest arvutimudelitest, mida oleks saanud adapteerida [46].

Teine kitsaskoht on see, et mudeli loomises on kasutatud erinevate eksperimentide membraani lapiksese eksperimentide andmeid. See on probleemne, sest nii ei saa olla kindel, et kõik mõõtmiste andmed on samad, sest eksperimentide meetodid erinevad ja keskkonna tingimused erinevad märkimisväärselt. Kohati olid andmed puudulikud ning sellistel juhtudel kasutati teiste sarnaste loomaliikide pingeklambri eksperimentide andmeid, et säilitada parim ühtsus mudelis [46].

Lisaks, on mudelis mõningaid nõrkusi. Nimelt, mudelis kaltsiumvoog läbi SERCA (J_{up}) tagasi SR-i ei võta arvesta SR-i kaltsiumi kontsentratsiooni ning sõltub ainult tsütosoolsest kaltsiumi kontsentratsioonist. See tähendab, et SERCA võib pumbata kaltsiumit tagasi SR-i lõpmatult, mis ei ole füsioloogiliselt võimalik. Probleemi lahendamiseks on mudelis see viidud tasakaalu läbi SR-i kaltsiumi lekke vooga (J_{leak}) (Lisa 1, võrrand L20), et hoida SR-i kaltsiumi kontsentratsioon füsioloogilisel tasemel. Mis on veel probleemne on see, et J_{up} võrrandis (Lisa 1, võrrand L21) ei ole arvestatud SR-i ja kaltsiumvoolu muutustega ning selle tõttu võib J_{up} tõmmata negatiivseks rakusisese kaltsiumi kontsentratsiooni. See on muidugi võimatu, sest

negatiivse kaltsiumi kontsentratsiooni olemasolu ei ole võimalik ja samuti keelab seda osmoos. Sellest sõltumata on antud mudel sobiv antud töös püstitatud hüpoteesi testimiseks, juhul kui hoida esialgsed parameetrid mõistlikud.

Mudeli adapteerimise järgselt optimeeriti mudelit iga eksperimendi jaoks vähimruutude meetodiga. Vähimruutude meetod valiti lihtsuse ja juba olemasoleva Scipy teegi tõttu, mis tegi programmeerimise lihtsaks. Siiski, võib püstitada küsimuse kas antud meetod on piisavalt täpne ja kas antud töös valitud tolerants on piisav? Üldiselt on tegemist subjektiivse valikuga, kuid põhiline täpsuse piiraja oli arvutusaeg. Kuna optimisatsioon viidi läbi mitmeid kordi ning ühe eksperimendi optimeerimine võis võtta ligikaudu 5 minutit, siis ei hakatud suurendama optimeerimise tolerantsi ega kasutama arvutuslikult intensiivsemaid meetodeid.

Siiski, mudeli optimeerimine vähimruutudega andis vägagi häid tulemusi ning parameetrite optimisatsioonidega sai jääda rahule.

Mis jäi uurimata on see, et kas ühesuunalise ANOVA puhul tehtud eeldus, et dispersioon on gruppide vahel võrreldav on tõene. See on üks võimalik koht, kus tuleks teha täiendav kontroll, et olla kindel, et tehtud test oli õiglane. Samuti, eksisteerib 3 erinevat summeerimise meetodit ANOVA-s. Autor uuris eri allikatest, milline neist oleks kõige õigem kasutada ja otsustas, et kõige paremini ANOVA mudelite testimiseks sobib teist tüüpi summeerimine. Siiski, oleks väärt uurida ANOVA tulemusi ka esimest ja kolmandat tüüpi summeerimisega.

Autor spekulatsioonid ka seda, et gruppide suurused olid võrreldavad ning piisavad analüüsi tegemiseks. Kindlasti tuleks kasuks suurendada gruppide arvu, aga selleks oleks vaja investeerida märkimisväärne kogus ressursse hiirte kasvatamisse. Kui suurendada gruppe tekib ka eetilise küsimus – kui palju on vaja ohverdada elusid, et teha antud eksperimenti?

Arvestades võimalike vea- ja paranduskohti, saab siiski teha järelduse, et kreatiini puudulikes hiirtes ei ole olulisi muutusi kaltsiumi difusioonis tsütosoolist diaadilisse ruumi, mis seletaks muutunud kaltsiumkäitumist AGAT-KO hiirtes. Täiendavalt ei vastuta ka teised parameetrid, mis on seotud tsütosooli ja diaadilise ruumi kaltsiumdünaamikaga, muutunud kaltsiumkäitumist rakus. See viitab sellele, et südamerakus vastutab rakus muutunud kaltsiumdünaamika eest mõni muu raku kompleks või piirkond. Kuna töös testiti ühte kolmest võimalikust kandidaadist, mis olid võetud Laasmaa et al. 2021. artiklist [5], siis on soovituslik lähemalt uurida SR ja SERCA rolli ja nendega seotud parameetreid, mis aitaks seletada muutunud kaltsiumdünaamikat AGAT-KO hiirtes.

Teisena saab järeldada seda, et kreatiini suplemine ei oma tähtsust kaltsiumi difusioonis tsütosoolist diaadilisse ruumi. Seega, kreatiini suplemine peab mõjutama teisi faktoreid ja parameetreid, mis seletaks miks kreatiini suplemine taastab normaalse kaltsiumdünaamika AGAT+KO hiirtes.

Juhul kui mõni teistest hetkel olevatest kandidaatidest ja vastavatest parameetritest osutub oluliseks kirjeldamiseks muutunud kaltsiumikäitumist, siis oleme sammu lähemal seletamiseks kuidas kreatiini suplemine aitab hoida ära südame väärkäitumist. Sellisel juhul on

võimalik vähendada surmavate arütmiate ja teiste seotud tüsistuste teket võrdlemisi odavalt. Seda toetab fakt, et üheks suuremaks surmapõhjuseks maailmas on südame ja vereringkonna haigused/probleemid. Juhul kui saab hoida ära väiksemagi koguse surmasid, on olnud tehtud uuringud edukad ja olulised ja läbi selle saab kasutada niigi väikeseid meditsiini ressursse paremini.

Kuigi töös püstitatud hüpotees lükati ümber ning leiti, et kreatiini puudulikus ei põhjusta muutusi kaltsiumi liikumises diaadilisest ruumist tsütosooli, siis antud töös saadud tulemus viib meid lähemale mõistmaks, millised parameetrid ja asukohad südamerakus on mõjutatud kreatiini puudulikkusest ja kreatiini suplemendimisest. Läbi selle jõuame lähemale ravile, millega saab ära hoida geneetilise rikke tõttu tekkinud tõsiseid tüsistusi ja surma.

6 Tänuavaldus

Autor soovib tänada Marko Vendelini, et äratas minus taas soovi ja huvi tegeleda biofüüsika, bioloogia ja piiratud koguses ka keemiaga, et IB's õpitud teadmised ei läheks raisku. Autor samuti kartis, et ammu õpitud teadmised Pythonis, mis ei olnud toleks hetkeks leidnud pidevat ning konkreetset rakendust, ei ole piisavad, aga kõik hirmud kadusid kui öeldi, et kusagilt tuleb ikkagist alustada. Seda kuuldes oli töö autor kindel, et antud teema sobib talle, et enast proovile panda ja anda enda parim panus. Ilma Marko Vendelinita ei oleks antud tööd autor teinud.

Kuid tsentraalsel kohal on autori jaoks ikkagist tema juhendaja Martin Laasmaa, kes igal sammul toetas autorit headle suunitlustega ning aitas jälgida konkreetset plaani. Täiendavalt tuli üllatuseks see, et mudelis oli vaja teha tugevat tööd diferentsiaalvõrranditega, millega enesekindlust nappis, kuid Martin Laasmaa ei lasknud mul isegi hetkeks kõhelda autori oskustes ja alguses palus iseseisvalt pusida nende lahendamise, siis õpetas selgeks õigel viisil lahendamise. Teekonnal aitas ta parandada mitmeid vigu ning näitas kuidas teha asju paremini, jagades minuga oma kogemusi läbi mille sai mudel ja töö kõvasti paremaks. Ükski õppetund ei ole veel raisku läinud. Peamine, mida saab kaasa võtta on julgus uskuda endasse, et autor astuks julgeid samme teaduses ja professionaalses elus.

Samuti tahan tänada Dmitri Kartofelevi, kellega läbisin oma praktika ning sain ka praktilised teadmised Pythonist, et teekonda alustada. Lisaks, olen tänulik ka Kert Tammele, kes andis head nõu erinevate võimalike mudeli puuduste kohta. Muidugi ei saa välja jätta ka kõiki minu tudengiteel kohatud professoreid ja teadureid, kes proovisid mind harida oma parimate oskuste juures.

Viimase asjana tänab autor oma pere. Tänan oma vanemaid, kes mõistmata miks ma füüsikat õpin või miks ma sellise lõputöö otsustasin teha, toetasid mind tingimusteta minu teekonnal. Tänan oma lähedasi sõpru, kes aitasid mul distsipliini hoida ja oma kasse, kes sundisid mind tegema pai ja mängu pause, et säilitada rahu ja kindel siht.

Viited

- [1] S.Š. Barold, "Willem einthoven and the birth of clinical electrocardiography a hundred years ago," *Cardiac electrophysiology review*, vol. 7, pp. 99–104, 2003.
- [2] W. analüütikud. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>, 2020. Viimati kasutatud: 02.05.2024.
- [3] A. Arboix, "Cardiovascular risk factors for acute stroke: Risk profiles in the different subtypes of ischemic stroke," *World Journal of Clinical Cases: WJCC*, vol. 3, no. 5, p. 418, 2015.
- [4] N. kollektiiv, "Nih - pmc - heart." <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>. Viimati kasutatud: 20.04.2024.
- [5] M. Laasmaa, J. Branovets, K. Barsunova, N. Karro, C. A. Lygate, R. Birkedal, and M. Vendelin, "Altered calcium handling in cardiomyocytes from arginine-glycine amidinotransferase-knockout mice is rescued by creatine," *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 320, no. 2, pp. H805–H825, 2021.
- [6] M. Kawai and J.-P. Jin, "Mechanisms of frank-starling law of the heart and stretch activation in striated muscles may have a common molecular origin," *Journal of muscle research and cell motility*, vol. 42, no. 2, pp. 355–366, 2021.
- [7] A. Lorents, "Anatoomia ja füsioloogia." <https://www.hariduskeskus.ee/opiobjektid/anatoomia/?S> Viimati kasutatud: 02.04.2024.
- [8] J. Rebane. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Heart_diagram-et.svg, 2013. Viimati kasutatud: 16.05.2024.
- [9] L.-L. Nõmme and S.Šchnuri, "Süda." <https://elundkonnad.weebly.com/suumlda.html>, pole saadaval. Viimati kasutatud: 02.04.2024.
- [10] J. Uibu, "Süda." <https://lepo.it.da.ut.ee/jaanusu/syda.html>, 2003. Viimati kasutatud: 02.04.2024.
- [11] M. L. Entman, S. W. Jacob, M. F. Oliver, J. Higgins, G. Lotha, J. M. Cunningham, R. Pallardy, K. Rogers, and M.Šampaolo, "Human cardiovascular system," *Encyclopædia Britannica*, 2020.
- [12] A. Wessels and D.Šedmera, "Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man," *Physiological genomics*, vol. 15, no. 3, pp. 165–176, 2003.
- [13] A. Azizova, O.Önder, S. Arslan, S. Ardali, and T. Hazirolan, "Persistent left superior vena cava: clinical importance and differential diagnoses," *Insights into imaging*, vol. 11, pp. 1–19, 2020.

- [14] A. Krishnan, R.Šamtani, P. Dhanantwari, E. Lee, S. Yamada, K.Šhiota, M. T. Donofrio, L. Leatherbury, and C. W. Lo, “A detailed comparison of mouse and human cardiac development,” *Pediatric research*, vol. 76, no. 6, pp. 500–507, 2014.
- [15] B. Young, J. W. Heath, *et al.*, “Functional histology,” *A text and colour atlas*, p. 277, 2000.
- [16] R. Ripa, T. George, K. R. Shumway, and Y.Šattar, “Physiology, cardiac muscle,” *StatPearls*, 2021.
- [17] T. D. Pollard, W. C. Earnshaw, J. Lippincott-Schwartz, and G. Johnson, *Cell Biology E-Book: Cell Biology E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2022.
- [18] D.Žipes, P. Libby, and R. Bonow, *Braunwald’sHeart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. Elsevier Saunders. Philadelphia, 2005.
- [19] B. Keepers, J. Liu, and L. Qian, “What’s in a cardiomyocyte—and how do we make one through reprogramming?,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, vol. 1867, no. 3, p. 118464, 2020.
- [20] H. L. Sweeney and D. W. Hammers, “Muscle contraction,” *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 10, no. 2, p. a023200, 2018.
- [21] A.Šaxton, M. A. Tariq, and B. Bordoni, “Anatomy, thorax, cardiac muscle,” in *StatPearls [Internet]*, StatPearls Publishing, 2023.
- [22] P. J. Mansfield and D. A. Neumann, *Essentials of kinesiology for the physical therapist assistant e-book*. Elsevier Health Sciences, 2018.
- [23] R. Birkedal, M. Laasmaa, J. Branovets, and M. Vendelin, “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*, vol. 377, no. 1864, p. 20210321, 2022.
- [24] D. A. Brown, J. B. Perry, M. E. Allen, H. N. Sabbah, B. L. Stauffer, S. R. Shaikh, J. G. F. Cleland, W.Š. Colucci, J. Butler, A. A. Voors, S. D. Anker, B. Pitt, B. Pieske, G. Filippatos, S. J. Greene, and M. Gheorghiade, “Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure,” *Nature Reviews Cardiology*, vol. 14, pp. 238–250, 2017.
- [25] R. W. Tsien, P. T. Ellinor, and W. A. Horne, “Molecular diversity of voltage-dependent ca^{2+} channels,” *Trends in pharmacological sciences*, vol. 12, pp. 349–354, 1991.
- [26] J.Štriessnig, A. Pinggera, G. Kaur, G. Bock, and P. Tuluc, “L-type ca^{2+} channels in heart and brain,” *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, vol. 3, no. 2, pp. 15–38, 2014.
- [27] R. B. Kreider, D.Š. Kalman, J. Antonio, T. N. Ziegenfuss, R. Wildman, R. Collins, D. G. Candow, S. M. Kleiner, A. L. Almada, and H. L. Lopez, “International society of sports nutrition position stand: safety and efficacy of creatine supplementation in exercise,

- sport, and medicine,” *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, vol. 14, no. 1, p. 18, 2017.
- [28] M. C. Staff, “Creatine.” <https://www.mayoclinic.org/drugs-supplements-creatine/art-20347591>, 2023. Viimati kasutatud: 20.04.2024.
- [29] D. L. Christie, “Functional insights into the creatine transporter,” *Sub-cellular biochemistry*, vol. 46, pp. 99–118, 2007.
- [30] S. P. Bessman and P. J. Geiger, “Transport of energy in muscle: The phosphorylcreatine shuttle,” *Science*, vol. 211, no. 4481, pp. 448–452, 1981.
- [31] T. Wallimann, T. Šchlösser, and H. M. Eppenberger, “Function of m-line-bound creatine kinase as intramyofibrillar atp regenerator at the receiving end of the phosphorylcreatine shuttle in muscle.,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 259, no. 8, pp. 5238–5246, 1984.
- [32] J. Branovets, *Energetics and Calcium Handling in Hearts from Creatine-Deficient Mice*. TalTech Kirjastus, 2022.
- [33] G. Quer, E. D. Muse, E. J. Topol, and S. R. Steinhubl, “Long data from the electrocardiogram,” *The Lancet*, vol. 393, no. 10187, pp. 21–89, 2019.
- [34] A. E. Buxton, K. E. Ellison, M. M. Kirk, and G. F. Michaud, “Introduction to cardiac electrophysiology, the electrocardiogram, and cardiac arrhythmias,” *Article posted on website* Retrieved October, 2005.
- [35] A. J. Pappano and W. G. Wier, *Cardiovascular Physiology E-Book: Mosby Physiology Monograph Series*. Elsevier Health Sciences, 2012.
- [36] M. Š. Jafri, “Models of excitation–contraction coupling in cardiac ventricular myocytes,” *Bioinformatics and Drug Discovery*, pp. 309–335, 2012.
- [37] N. teadlased, “Arrhythmias - what is an arrhythmia.” <https://www.nhlbi.nih.gov/health/arrhythmias>, 2022. Viimati kasutatud: 20.04.2024.
- [38] AmazonW3. https://s3.amazonaws.com/static.wd7.us/f/fd/Action_potential.png, 2024. Viimati kasutatud: 15.05.2024.
- [39] https://www.regionaalhaigla.ee/sites/default/files/documents/Sudamesisene_elekterfus_ioloogiline_uuring_ja_rutmihairete_kateeterablatsioon.pdf, 2022. Viimati kasutatud: 06.04.2024.
- [40] L. J. DeFelice, *Electrical properties of cells: patch clamp for biologists*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [41] R. Plonsey, R. C. Barr, and A. Bioelectricity, “Quantitative approach,” *Cham, Switzerland: Springer*, 2007.

- [42] J. Mayourian, E. A. Sobie, and K. D. Costa, “An introduction to computational modeling of cardiac electrophysiology and arrhythmogenicity,” *Experimental Models of Cardiovascular Diseases: Methods and Protocols*, pp. 17–35, 2018.
- [43] J. H. Yang and J. J. Saucerman, “Computational models reduce complexity and accelerate insight into cardiac signaling networks,” *Circulation research*, vol. 108, no. 1, pp. 85–97, 2011.
- [44] C. Vollbrecht, “Nernst equation.” <https://chemistrytalk.org/nernst-equation/>, 2023. Viimati kasutatud: 07.04.2024.
- [45] A. L. Hodgkin and A. F. Huxley, “A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve,” *The Journal of physiology*, vol. 117, no. 4, p. 500, 1952.
- [46] V. E. Bondarenko, G. P. Sziget, G. C. Bett, S.-J. Kim, and R. L. Rasmusson, “Computer model of action potential of mouse ventricular myocytes,” *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 287, no. 3, pp. H1378–H1403, 2004.
- [47] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, and B. Katz, “Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of loligo,” *The Journal of physiology*, vol. 116, no. 4, p. 424, 1952.
- [48] T. E. of Encyclopaedia, “Dielectric loss.” <https://www.britannica.com/science/dielectric-loss>, 2016. Viimati kasutatud: 11.04.2024.
- [49] R. E. McAllister, D. Noble, and R. Tsien, “Reconstruction of the electrical activity of cardiac purkinje fibres.,” *The Journal of physiology*, vol. 251, no. 1, pp. 1–59, 1975.
- [50] D. Di Francesco and D. Noble, “A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes,” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, vol. 307, no. 1133, pp. 353–398, 1985.
- [51] V. E. Bondarenko, G. C. Bett, and R. L. Rasmusson, “A model of graded calcium release and I-type Ca^{2+} channel inactivation in cardiac muscle,” *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 286, no. 3, pp. H1154–H1169, 2004.
- [52] M.Š. Jafri, J. J. Rice, and R. L. Winslow, “Cardiac Ca^{2+} dynamics: the roles of ryanodine receptor adaptation and sarcoplasmic reticulum load,” *Biophysical journal*, vol. 74, no. 3, pp. 1149–1168, 1998.
- [53] G. Van Rossum and F. L. Drake, *Python 3 Reference Manual*. Scotts Valley, CA: CreateSpace, 2009.
- [54] P. Raybaut, “Spyder-documentation,” *Available online at: pythonhosted.org*, 2009.
- [55] K. Niglas. <http://www.cs.tlu.ee/katrin/wp/wp-content/uploads/2013/11/dispersioon.pdf>, 2013. Viimati kasutatud: 07.04.2024.

- [56] M. Pihlak, *KLASSIKALINE JA MITTEPARAMEETRILINE STATISTIKA*. TTÜ KIRJASTUS, 2018.
- [57] JASP Team, “JASP (Version 0.18.3)[Computer software].” <https://jasp-stats.org/>, 2024.
- [58] A.Šalomão, “Ühekordne anova: Mõistmine, läbiviimine ja esitamine.” <https://mindthegraph.com/blog/et/uhesuunaline-anova/>, 2023. Viimati kasutatud: 07.04.2024.
- [59] Ø. Langsrud, “Anova for unbalanced data: Use type ii instead of type iii sums of squares,” *Statistics and computing*, vol. 13, no. 2, pp. 163–167, 2003.
- [60] S.Š. Shapiro and M. B. Wilk, “An analysis of variance test for normality (complete samples),” *Biometrika*, vol. 52, no. 3-4, pp. 591–611, 1965.
- [61] C. Ford, “Understanding qq plots.” <https://library.virginia.edu/data/articles/understanding-q-q-plots>, 2015. Viimati kasutatud: 24.04.2024.

7 Annotatsioon

Töös on võetud eesmärgiks uurida kaltsiumi dünaamikat ja kaltsiumvoole arginiini-glütsiini amidinotransferaasi-nokaut (AGAT-KO) ja kreatiini suplementeeritud hiirtes (KO+Cr). Kontrollgrupiks võeti ilma geneetilise modifikatsioonidega hiired (WT). Hüpotiseeriti, et eristuvat kaltsiumi käitumist uuritavate hiiregruppide vahel seletaks kõige paremini kaltsiumi difusioon tsütosoolist diaadilisse ruumi.

Difusiooni kirjeldamiseks on ajakonstant τ_{xfer} . Küsimusele vastuse leidmine aitab kindlaks teha, kas AGAT-KO hiirtes on kreatiini puudulikus kaltsiumi difusioonis tsütosoolist diaadilisse ruumi olulisel kohal. Teisisõnu, kas τ_{xfer} oleks keskses rollis muutunud kaltsiumi vooludes ja südame käitumises kreatiinipuudulikes hiirtes. Täiendavalt uuriti ka osasid L-tüüpi kaltsiumkanalite käitumist mõjutavaid parameetreid, et näha kas katseandmetest leitud muutused kaltsiumkäitumises on nendest põhjustatud.

Hüpoteesi testimiseks adapteeriti Bondarenko et al. hiire vatsakeste müotsüütide aktsiooni-potentsiaali arvutimudel. Huvipakkuvaid parameetreid adapteeriti Pythonis ning optimeeriti vähimruutude meetoditega iga läbi viidud eksperimendi jaoks. Saadud eksperimentide optimeeritud parameetrite väärtusi võrreldi KO, KO+Cr ja WT gruppide vahel, et leida statistiliselt olulisusi erinevusi rakendades ühesuunalist ANOVA-t.

Antud töös leiti, et kaltsiumi difusiooni ajakonstandil τ_{xfer} puudus statistiliselt oluline erinevus gruppide vahel. Samamoodi ei leitud statistiliselt olulist erivust ka teiste parameetrite puhul.

8 Abstract

The aim of this thesis is to study calcium dynamics and calcium fluxes in arginine-glycine amidinotransferase knockout (AGAT-KO) and creatine-supplemented (KO+Cr) mice. Mice without genetic modifications (WT) were used as a control group. It was hypothesized that the altered calcium diffusion from the cytosol to the diadic space, described by the time constant τ_{xfer} , would best explain the altered calcium behavior between groups. Finding the answer to this question will help determine whether creatine-deficiency in AGAT-KO mice plays an important role in altered calcium dynamics.

In other words, would τ_{xfer} play a key role in altered calcium fluxes and cardiac behavior in the hearts of creatine-deficient mice. In addition, a selection of parameters influencing the behaviour of L-type calcium channels were also investigated to see if they were responsible for the changes in calcium behaviour found in the experimental data.

To test the hypothesis, a computer model of the action potential of mouse ventricular myocytes was adapted from Bondarenko et al. Parameters of interest in the model were adapted in Python and optimized using the least squares method for each individual experiment. The optimized parameter values of the resulting optimization were compared between KO, Ko+Cr, and WT groups to find statistically significant differences using a One-Way ANOVA.

In the present thesis, it was found that there was no statistically significant difference in the calcium diffusion time constant τ_{xfer} . Similarly, no statistically significant difference was found between groups for the other parameters of interest.

9 Lisad

Lisa 1. Mudeli võrrandid ja muutujad

Valemid ilmuvad koodis olnud järjekorras.

$$FCa_0 = \frac{k_{on}F_{tot}Ca_{i0}}{k_{on}Ca_{i0} + k_{off}} \quad (L1)$$

$$LTRPNCa_0 = \frac{k_{ltrpn}^+ Ca_{i0} LTRPN_{tot}}{k_{ltrpn}^+ Ca_{i0} + k_{ltrpn}^-} \quad (L2)$$

$$HTRPNCa_0 = \frac{k_{htrpn}^+ Ca_{i0} HTRPN_{tot}}{k_{htrpn}^+ Ca_{i0} + k_{htrpn}^-} \quad (L3)$$

$$V(t) = \begin{cases} 0, & \text{kui } 100 \leq t \leq 350 \\ -80, & \text{mujal} \end{cases} \quad (L4)$$

$$Kpcf = 13.0[1 - e^{-(V+14.5)^2/100.0}] \quad (L5)$$

$$\alpha = \frac{0.4e^{(V+12.0)/10.0}[1 + 0.7e^{-(V+40.0)^2/10.0} - 0.75e^{-(V+20.0)^2/400.0}]}{1 + 0.12e^{(V+12.0)/10.0}} \quad (L6)$$

$$\beta = 0.05e^{-(v+12.0)/13.0} \quad (L7)$$

$$\gamma = \frac{K_{pc,max}[Ca^{2+}]_{ss}}{K_{pc,half} + [Ca^{2+}]_{ss}} \quad (L8)$$

$$C_1 = 1 - (O + C_2 + C_3 + C_4 + I_1 + I_2 + I_3) \quad (L9)$$

$$\frac{dC_2}{dt} = 4\alpha C_1 - \beta C_2 + 2\beta C_3 - 3\alpha C_2 \quad (L10)$$

$$\frac{dC_3}{dt} = 3\alpha C_2 - 2\beta C_3 + 3\beta C_4 - 2\alpha C_3 \quad (L11)$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_4}{dt} = 2\alpha C_3 - 3\beta C_4 + 4\beta O - \alpha C_4 + 0.01(4K_{pcb}\beta I_1 - \alpha\gamma C_4) + \\ 0.002(4\beta I_2 - K_{pcf}C_4) + 4\beta K_{pcb}I_3 - \gamma K_{pcf}C_4 \end{aligned} \quad (L12)$$

$$\frac{dI_1}{dt} = \gamma O - K_{pcb}I_1 + 0.001(\alpha I_3 - K_{pcf}I_1) + 0.01(\alpha\gamma C_4 - 4\beta K_{pcb}I_1) \quad (\text{L13})$$

$$\frac{dI_2}{dt} = 0.001(K_{pcf}O - \alpha I_2) + K_{pcb}I_3 - \gamma I_2 + 0.002(K_{pcf}C_4 - 4\beta I_2) \quad (\text{L14})$$

$$\frac{dI_3}{dt} = 0.001(K_{pcf}I_1 - \alpha I_3) + \gamma I_2 - K_{pcb}I_3 + \gamma K_{pcf}C_4 - 4\beta K_{pcb}I_3 \quad (\text{L15})$$

$$\frac{dO}{dt} = \alpha C_4 - 4\beta O + K_{pcb}I_1 - \gamma O + 0.001(\alpha I_2 - K_{pcf}O) \quad (\text{L16})$$

$$B_i = \left\{ 1 + \frac{[CMDN]_{tot} K_m^{CMDN}}{(K_m^{CMDN} + [Ca^{2+}]_i)^2} \right\}^{-1} \quad (\text{L17})$$

$$B_{ss} = \left\{ 1 + \frac{[CMDN]_{tot} K_m^{CMDN}}{(K_m^{CMDN} + [Ca^{2+}]_{ss})^2} \right\}^{-1} \quad (\text{L18})$$

$$J_{xfer} = \frac{[Ca^{2+}]_{ss} - [Ca^{2+}]_i}{\tau_{xfer}} \quad (\text{L19})$$

$$J_{leak} = \nu_2([Ca^{2+}]_{NSR} - [Ca^{2+}]_i) \quad (\text{L20})$$

$$J_{up} = \nu_3 \frac{[Ca^{2+}]_i^2}{K_{m,up}^2 + [Ca^{2+}]_i^2} \quad (\text{L21})$$

$$J_{FCa} = k_{on}(F_{tot} - F_{Ca})C_{a_i} - k_{off}F_{Ca} \quad (\text{L22})$$

$$\frac{d[LTRPNCa]}{dt} = k_{ltrpn}^+[Ca^{2+}]_i([LTRPN]_{tot} - [LTRPNCa]) - k_{ltrpn}^-[LTRPNCa] \quad (\text{L23})$$

$$\frac{d[HTRPNCa]}{dt} = k_{htrpn}^+[Ca^{2+}]_i([HTRPN]_{tot} - [HTRPNCa]) - k_{htrpn}^-[HTRPNCa] \quad (\text{L24})$$

$$I_{CaL} = g_{CaL}O(V - E_{Ca,L}) \quad (\text{L25})$$

$$I_{NaCa} = k_{NaCa} \frac{1}{K_{m,Na}^3 + [Na^+]_0^3} \frac{1}{K_{m,Ca} + [Ca^{2+}]_0} \frac{1}{1 + k_{sat}e^{(\eta-1)VF/RT}} \times \\ [e^{\eta VF/RT} [Na^+]_i^3 [Ca^{2+}]_0 - e^{(\eta-1)VF/RT} [Na^+]_0^3 [Ca^{2+}]_i] \quad (\text{L26})$$

$$I_{p(Ca)} = I_{p(Ca)}^{max} \frac{[Ca^{2+}]_i^2}{K_{m,p(Ca)}^2 + [Ca^{2+}]_i^2} \quad (L27)$$

$$E_{CaN} = \frac{RT}{2F} \ln \left(\frac{[Ca^{2+}]_0}{[Ca^{2+}]_i} \right) \quad (L28)$$

$$I_{Cab} = G_{Cab}(V - E_{CaN}) \quad (L29)$$

$$\frac{dCa_i}{dt} = B_i \left\{ J_{leak} + J_{xfer} - J_{up} - J_{trpm} - J_{FCa} - \frac{A_{cap}C_m}{2V_{myo}F} (I_{Cab} - 2I_{NaCa} + I_{p(Ca)}) \right\} \quad (L30)$$

$$\frac{d[Ca^{2+}]_{ss}}{dt} = B_{ss} \left\{ -J_{xfer} \frac{V_{myo}}{V_{ss}} - I_{CaL} \frac{A_{cap}C_m}{2V_{ss}F} \right\} \quad (L31)$$

$$\frac{dFCa}{dt} = J_{FCa} \quad (L32)$$

Tabel 2: Mudelis kasutatud parameetrite väärtused koos ühikute ja lühikirjeldusega.

Parameeter	Väärtus ja ühik	Kirjeldus
R	$8.314 J/(molK)$	Ideaalse gaasi konstant
F	$96.485 C/mmol$	Faraday konstant
T	$298 K$	Toatemperatuur
A_{cap}	$1.534 \cdot 10^{-4} cm^2$	Mahutav membraanipindala
C_{mem}	$1.0 \mu F/cm^2$	Membraani erimahtuvus
V_{myo}	$25.84 \cdot 10^{-6} \mu L$	Müoplasma ruumala
$V_{mem_{rest}}$	$-80.0 mV$	Puhkepotentsiaal
Na_i	$14237.1 \mu M$	Müoplasmi naatriumi kontsentratsioon
Na_o	$150000 \mu M$	Naatriumi rakuväline kontsentratsioon
η	0.35	Dimensioonita abi muutuja, mis kontrollib naatrium-kaltsium ionide vahetuse sõltuvust
$k_{m_{Na}}$	$87500 \mu M$	Naatriumi pool küllastumise konstant naatrium-kaalium ionide vahetusel
k_{sat}	0.1	Dimensioonita naatrium-kaalium ionide vahetuse küllastumise faktor väga negatiivsete potentsiaalide puhul
$k_{m_{Ca}}$	$1380 \mu M$	Kaltsiumi pool küllastumise konstant naatrium-kaltsium ionide vahetusel
k_{NaCa}	$292.8 pA/pF$	skaleerimisfaktor naatrium/kaalium ionide vahetusel
$I_{max,pCa}$	$1.0 pA/pF$	Maksimaalne kaltsiumi pumba vool
k_{mpCa}	$0.5 \mu M$	Kaltsiumi pool küllastumise konstant kaltsiumpumba voolule
Ca_{i0}	$0.11079 \mu M$	Kaltsiumi kontsentratsioon tsütoplasmas, hoitakse fikseerituna
$LTRPN_{tot}$	$70.0 \mu M$	Kogu madala sidususega müoplasmliline troponiini kontsentratsioon
$HTRPN_{tot}$	$140.0 \mu M$	Kogu kõrge sidususega müoplasmliline troponiini kontsentratsioon
k_{htrpn}^+	$0.0237 (\mu M)^{-1}/ms$	Kaltsiumioonide sidestumise konstant kõrge sidestuvuse troponiiniga
k_{htrpn}^-	$3.2 \cdot 10^{-4} ms$	Kaltsiumioonide vabanemise konstant kõrge sidestuvuse troponiinile
k_{ltrpn}^+	$0.327 (\mu M)^{-1}/ms$	Kaltsiumioonide sidestumise konstant madala sidestuvuse troponiiniga
k_{ltrpn}^-	$0.196 ms$	Kaltsiumioonide vabanemise konstant madala sidestuvuse troponiinile
$CMDN_{tot}$	$50 \mu M$	Kogu müoplasmlise kalmoduliini kontsentratsioon
$K_{m_{CMDN}}$	$0.238 \mu M$	Kaltsiumi pool küllastumise konstant kalmoduliinil
$CSQN_{tot}$	$15000.0 \mu M$	Kogu SR (sarkoplasmlise) kaltsestriini kontsentratsioon
$K_{m_{CSQN}}$	$800.0 \mu M$	Kaltsiumi pool küllastumise konstant kaltsestriinil
ν_1	$4.5 1/ms$	RyR (ryanodiini retseptori) kaltsiumkanali maksimaalne kaltsiumi läbilaskvus, kaltsiumi lekkimiskiiruse konstant
ν_2	$1.74 \cdot 10^{-5} 1/ms$	NSR (nisiiniresistentne valk)
ν_3	$0.45 \mu M/ms$	SR kaltsium-ATPaasi maksimaalne pumpamiskiirus

Km_{up}	$0.5 \mu M$	Pool küllastumise konstant sarkoplasmilise kaltsium-ATPaasi pumbale
Ca_{NSR}	$1299.50 \mu M$	NSR kaltsiumi kontsentratsioon
τ_{xfer}	$8.0 ms$	Ajakonstant kaltsiumi difusioonile tsütosoolist diaadilise ruumi
$K_{pc,max}$	$0.23324 1/ms$	L-tüüpi kaltsiumkanali maksimaalne ajakonstant kaltsiumi põhjustatud inaktivisatsioonile
$K_{pc,half}$	$20.0 \mu M$	L-tüüpi kaltsiumkanali pool-küllastumise konstant kaltsiumi põhjustatud inaktivisatsioonile
K_{pcb}	$0.0005 1/ms$	Pingest sõltumatu inaktivisatsiooni ajakonstant
G_{Cab}	$0.000367 mS/uF$	Maksimaalne kaltsiumi taustvoolu juhtivus
Ca_o	$1130.0 \mu M$	Raku väline kaltsium
g_{CaL}	$0.1729 mS/uF$	Spetsiifiline maksimaalne juhtivus L-tüüpi kaltsiumkanalil
E_{CaL}	$43.0 mV$	L-tüüpi kaltsiumkanali pöördumispotentsiaal
V_{ss}	$1.485 \cdot 10^{-9} \mu L$	Diaadilise ruumi ruumala
V_{NSR}	$2.098 \cdot 10^{-6} \mu l$	Sarkoplasmilise võrgustiku ruumala
τ_{tr}	$20 ms$	Ajakonstant kaltsiumi kandumisele NSR-st JSR-i (ühenduvasse Sarkoplasmilisse retiikulumi)
V_{JSR}	$0.12 \cdot 10^{-6} \mu l$	JSR ruumala
Ca_{JSR}	$1299.50 \mu M$	JSR-i kaltsiumi kontsentratsioon
F_{tot}	$25 \mu M$	Kogu Fluo-4 värvitud kaltsiumi kontsentratsioon
k_{on}	$0.1 1/(\mu M \cdot ms)$	Fluo-4 reaktsiooni konstant
k_{off}	$0.11 1/ms$	Fluo-4 reaktsiooni konstant nr. 2

Lisa 2. Teiste muutujate tabelid ja joonised

Tabel 3: LTCC pöördpotentsiaali, E_{CaL} , ANOVA tulemused, Va tähistab vabadusastmeid. Optimeerimise tulemused näidatud joonisel 13.

Mudel	Ruutude summa	Va	Ruutkeskmine	F	p
Sugu	56.824	1	56.824	0.976	0.330
Fenotüüp	521.792	2	260.896	4.479	0.019
Sugu * Fenotüüp	420.596	2	210.298	3.610	0.038
Resiidid	1980.398	34	58.247		

Tabel 4: Katseliselt mõõdetud voolu nihke parameetri, τ_{RC} , ANOVA tulemused, Va tähistab vabadusastmeid. Optimeerimise tulemused näidatud joonisel 16.

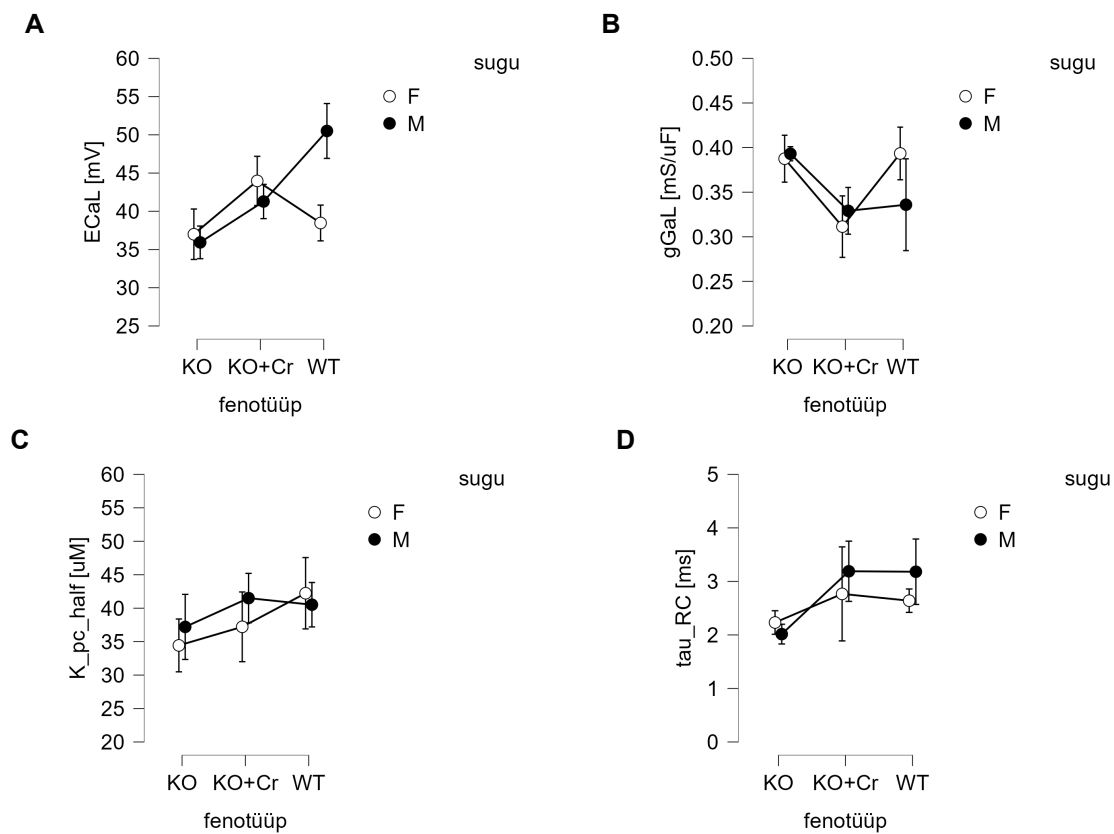
Mudel	Ruutude summa	Va	Ruutkeskmine	F	p
Sugu	0.769	1	0.769	0.331	0.569
Fenotüüp	5.976	2	2.988	1.285	0.290
Sugu * Fenotüüp	0.963	2	0.482	0.207	0.814
Resiidid	79.066	34	2.325		

Tabel 5: LTCC kaltsiumi poolt põhjustatud inaktiivsatsiooni pool-küllastumise konstandi, $K_{pc, half}$, ANOVA tulemused, Va tähistab vabadusastmeid. Optimeerimise tulemused näidatud joonisel 15.

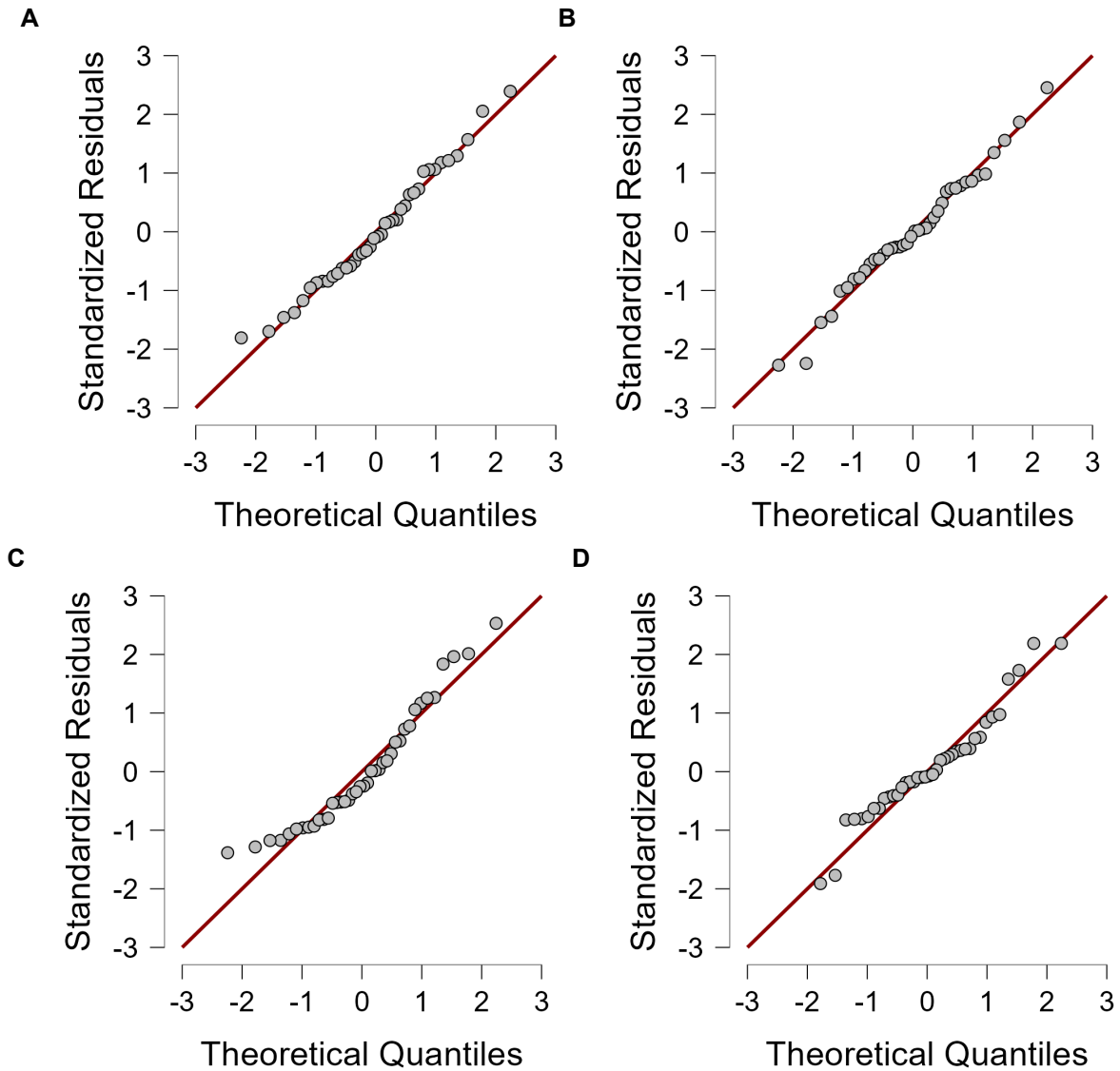
Mudel	Ruutude summa	Va	Ruutkeskmine	F	p
Sugu	37.707	1	37.707	0.296	0.590
Fenotüüp	162.076	2	81.038	0.636	0.536
Sugu * Fenotüüp	64.741	2	32.370	0.254	0.777
Resiidid	4333.396	34	127.453		

Tabel 6: LTCC maksimaalse juhtivuse, g_{CaL} , ANOVA tulemused, Va tähistab vabadusastmeid. Optimeerimise tulemused näidatud joonisel 14.

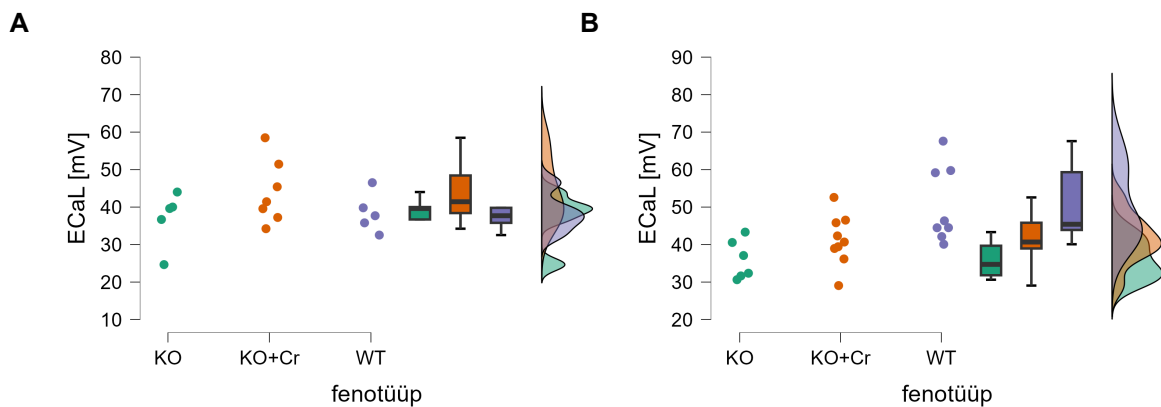
Mudel	Ruutude summa	Va	Ruutkeskmine	F	p
Sugu	8.670×10^{-4}	1	8.670×10^{-4}	0.105	0.748
Fenotüüp	0.032	2	0.016	1.924	0.162
Sugu * Fenotüüp	0.011	2	0.005	0.643	0.532
Resiidid	0.281	34	0.008		



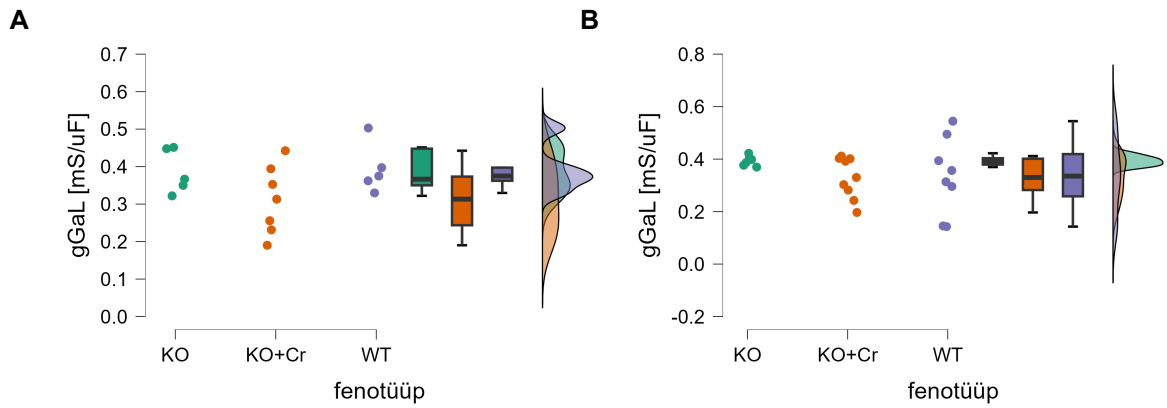
Joonis 11: Gruppide võrdlused sugude vahel. Välja toodud KO, KO+Cr ja WT gruppide mudeli optimeerimise tulemuste keskmised koos standardhälbega parameetrite vahel koos standardveaga. Võrdlus on tehtud gruppides sugude vahel. Vastavalt on alamjoonistes välja toodud (A) E_{CaL} , (B) g_{CaL} , (C) K_{pc_half} ja (D) τ_{RC} . Alamjoonisel (A) tundub olevat oluline erinevus, mida uuriti lähemalt ning kinnitati, et tegemist ei ole statistiliselt olulise tulemusega.



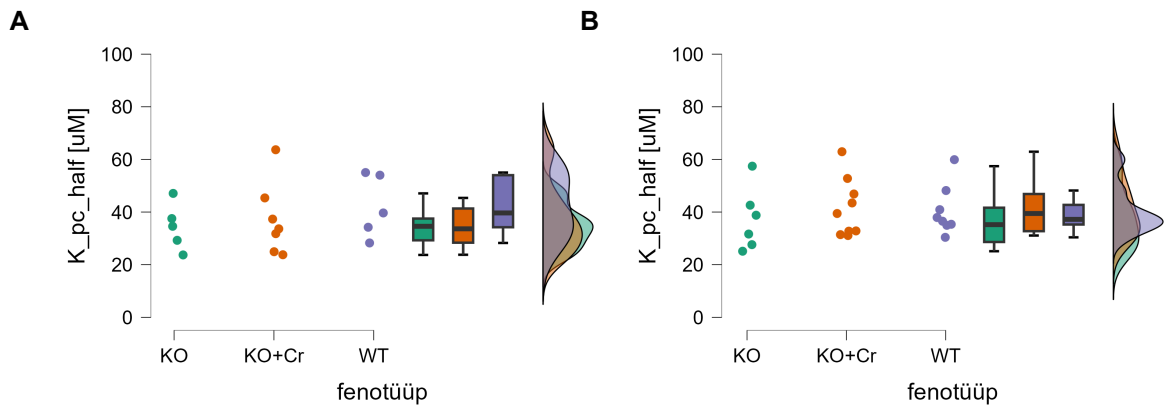
Joonis 2. Parameetrite kvantiil-kvantiil joonised, vastavalt (A) E_{CaL} , (B) g_{CaL} , (C) $K_{pc, half}$ ja (D) τ_{RC} . Joonistel langevad standardiseeritud resiigid kokku kvantiilidega ehk tuleb vastu võtta hüpotees, et andmed on normaalselt jaotunud



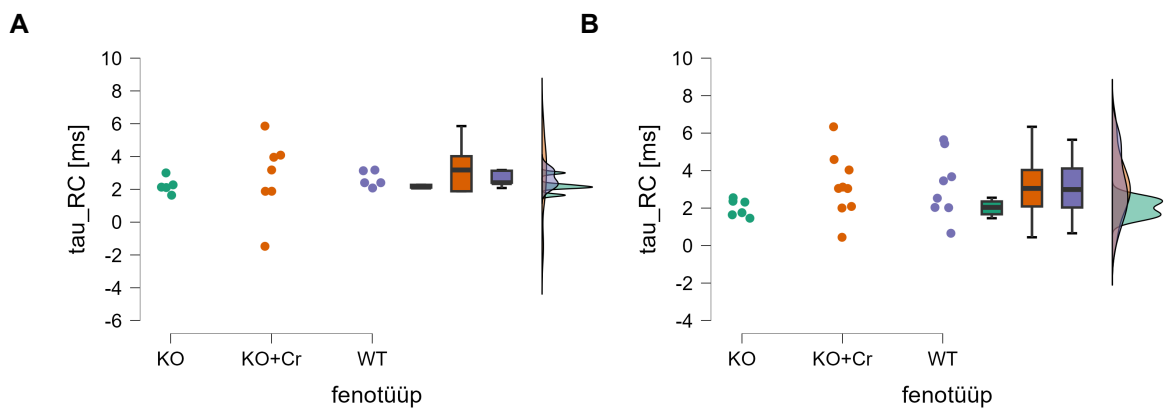
Joonis 13: LTCC pöördpotentsiaali, E_{CaL} , mudeliga optimeerimise tulemused. Iga katse optimeerimise tulemus on näidatud eraldi punktina ning sood on toodud välja erinevatel joonistel, vastavalt emased (A) ja isased (B).



Joonis 14: LTCC maksimaalne juhtivus, G_{GaL} , mudeliga optimeerimise tulemused. Iga katse optimeerimise tulemus on näidatud eraldi punktina ning sood on toodud välja erinevatel joonistel, vastavalt emased (**A**) ja isased (**B**).



Joonis 15: Kaltsiumi poolt põhjustatud LTCC inaktivatsiooni pool-küllastumise konstant, $K_{pc, half}$, mudeliga optimeerimise tulemused. Iga katse optimeerimise tulemus on näidatud eraldi punktina ning sood on toodud välja erinevatel joonistel, vastavalt emased (**A**) ja isased (**B**).



Joonis 16: Katseliselt mõõdetud voolu nihke parameetri, τ_{RC} , mudeliga optimeerimise tulemused. Iga katse optimeerimise tulemus on näidatud eraldi punktina ning sood on toodud välja erinevatel joonistel, vastavalt emased (**A**) ja isased (**B**).