



Univerza v Mariboru

*Fakulteta za naravoslovje in
matematiko*

VISKOELASTIČNI MODEL IZOMETRIČNE KONTRAKCIJE GLADKIH MIŠIČ

Diplomski seminar na bolonjskem študijskem programu 1. stopnje Fizika

Tadej Emeršič

Mentor: doc. dr. Aleš Fajmut

Maribor, 2012

EMERŠIČ, T.: Viskoelastični model izometrične kontrakcije gladkih mišic
Diplomski seminar, Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Oddelek
za fiziko, 2012.

POVZETEK

V seminarju obravnavamo mehanizme razvoja sile v gladki mišični celici dihalnih poti ob holinergični stimulaciji. Pri tem obravnavamo od kalcija odvisen razvoj sile, ki upošteva podroben opis od kalcija in kalmodulina odvisne aktivacije encima kinaze lahkkih verig miozina in aktivnost fosfataze lahkkih verig miozina. Obstoječi model nadgradimo z elementi, ki opisujejo viskoelastične lastnosti gladkih mišičnih celic arterij. Modelni rezultati napovejo zakasnitve v razvoju sile, kar je bolj v skladu z meritvami kot pri predhodnih modelih.

Ključne besede: viskoelastični model, izometrična kontrakcija, gladka mišična celica, holinergična stimulacija, prečni mostički, kalcij, kalmodulin, kinaza lahkkih verig miozina

ABSTRACT

In this work we study mechanisms of stress development in an airway smooth muscle cell upon the cholinergic stimulation. In this case, the stress development is calcium dependent and includes activation of the calcium - calmodulin dependent myosin light chain kinase and activation of a myosin light chain phosphatase. The existing model is upgraded by the viscoelastic elements, that describe viscoelastic properties of smooth muscle cells of arteries. The model predicts a delay in the development of stress which gives better agreement with experimental results than the previous models.

Key words: viscoelastic model, isometric contraction, smooth muscle cell, cholinergic stimulation, cross bridge, calcium, calmodulin, myosin light chain kinase

KAZALO

1 UVOD.....	4
2 PASIVNI VISKOELASTIČNI MEHANSKI MODELI	5
2.1 MAXWELLOV MODEL.....	5
2.2 VOIGTOV MODEL	6
2.3 KELVINOV MODEL	7
3 GLADKA MIŠIČNA CELICA	8
3.1 KONTRAKCIJA GLADKIH MIŠIČNIH CELIC.....	9
3.2 RAZVOJ SILE V GLADKO MIŠIČNI CELICI.....	10
3.2.1 <i>Viskoelastični mehanski model celice gladkih mišic</i>	10
3.2.2 <i>Aktivni razvoj sile</i>	12
3.2.3 <i>Aktivacija encima MLCK</i>	13
3.2.4 <i>Nastanek Ca²⁺ homeostaze</i>	14
4 REZULTATI	17
5 ZAKLJUČEK.....	20

1 UVOD

V gladki mišični celici (GMC) se ob holinergični stimulaciji poviša koncentracija kalcija (Ca^{2+}) v citosolu, kar preko tvorbe kompleksa kalcij-kalmodulin (Ca^{2+} -CaM) privede do aktivacije encima kinaze lahkih verig miozina (MLCK). Ta encim fosforilira lahke verige miozina (MLC) na vratu miozinske molekule, kar omogoči pripetje miozinskih glav na aktinsko vlakno in sprožitev prepenjanja glav ter drsenja vzdolž aktinskega vlakna. To vodi do razvoja sile v mišični celici. Ob neki zunanji aplicirani obremenitvi ostaja v primeru izometrične kontrakcije celotna dolžina mišične celice konstantna. Aktivna sila, ki jo generirajo prečni mostički, pa je enaka zunanji aplicirani sili na celico. V eksperimentu se tak poskus lahko izvaja na traktih gladke mišičnine ali na obročkih izvzetih iz traheje ali bronhijev. Ob stimulaciji s fiziološkim nevrotansmitorjem acetilholinom (ACh) naraste sila do 80% maksimalne vrednosti v približno 1 minuti, pri čemer je polovična vrednost dosežena v približno 10 sekundah. Tej prvi hitri fazi v razvoju sile sledi počasnejša faza, v kateri sila naraste še za dodatnih 20 % v času približno 30 minut. Razvoj od Ca^{2+} odvisne sile v prvi minuti razmeroma dobro opisuje 4-stanjski model, ki vključuje stanje pripetega defosforiliranega prečnega mostička na aktin (angl. latch-bridge model) [1-3]. Trenutno pa zgolj en model opisuje tudi počasnejšo fazo v razvoju sile, ki privzema upočasnitev preprijemanja prečnih mostičkov kot posledico regulacije proteinov na aktinskem vlaknu, vendar eksplicitno tega v modelu ne upošteva in ne obravnava. Omenjeni model je sestavljen iz dveh 4-stanjskih modelov, pri čemer so prehodi med štirimi stanji v enem izmed njih počasnejši, v drugem pa hitrejši. Slabost tega modela je, da avtorji niso specificirali tarč, signalnih poti in mehanizmov te regulacije. Obstaja več hipotez, ki predlagajo mehanizme razvoja sile v počasni fazi. Glavni »igralec« v teh hipotezah je encim protein kinaza C (PKC), ki ima v celici številne funkcije. Med drugim naj bi aktiviral protein CPI-17, ki fosforilira in s tem inhibira delovanje fosfataze lahkih verig miozina (MLCP), s čimer je možno razložiti povišanje sile. Drugi učinek encima PKC je fosforilacija dveh proteinov na aktinu, to sta kalponin in kaldesmon, ki regulirata aktivnost ATPaz na glavah pripetih miozinov. Fosforilacija obeh na aktin vezanih proteinov naj bi vodila do znižane hitrosti preprijemanja prečnih mostičkov [4]. Nobena izmed teh hipotez še ni bila eksplicitno preverjena z modelom. Eden izmed kandidatov, ki zmanjšuje aktivnost fosfataze, je tudi encim Rho-kinaza (RhoK), za katero pa se izkaže, da vpliva samo na razvoj sile v hitri fazi [3].

V tem delu študiramo mehanizme razvoja sile v GMC dihalnih poti ob holinergični stimulaciji, pri čemer obravnavamo najbolj aktualno verzijo modela za od Ca^{2+} odvisen razvoj sile, ki upošteva podroben opis od Ca^{2+} in CaM odvisne aktivacije MLCK in aktivnost MLCP. Obstoječi model nadgradimo z elementi, ki opisujejo viskoelastične lastnosti celice in njenih gradnikov po vzoru drugih avtorjev (S. Gestrelus in sod. v referenci [5] ter J. Yang in sod. v referenci [6]). Namen raziskave je ugotoviti, ali morebiti viskoelastične lastnosti celice pripomorejo k zakasnitvam v razvoju sile.

V nadaljevanju si bomo najprej ogledali zgradbo in rešitve treh osnovnih pasivnih viskoelastičnih mehanskih modelov ob pogoju izometričnosti. Za tem sledi opis zgradbe in kontrakcije GMC. Temu sledi opis matematičnega modela za napoved razvoja sile v GMC in dobljeni rezultati.

2 PASIVNI VISKOELASTIČNI MEHANSKI MODELI

Pasivni viskoelastični mehanski modeli opisujejo elastičnost in viskoznost različnih materialov, npr. polimerov, vezivnih tkiv... Sestavljeni so iz različne kombinacije vezav vzmeti in dušilk. Vzmet ponazarja elastične lastnosti, dušilka pa viskozne lastnosti snovi. Pogledali bomo zgradbo in rešitve treh osnovnih pasivnih viskoelastičnih modelov v primeru delovanja zunanje sile ob pogoju izometričnosti, ti so: Maxwellov model, Voigtov model in Kelvinov model. Ker so omenjeni modeli *pasivni*, njihov odziv je dosežen zgolj z neko zunanjo silo, je pri izometrični kontrakciji njihov raztezek oz. deformacija konstantna [7].

2.1 MAXWELLOV MODEL

Maxwellov model je sestavljen iz zaporedne vezave dveh elementov - dušilke in linearne vzmeti (slika 1a). Sila \bar{F} , s katero delujemo na element, je po velikosti enaka sili F_v , ki deluje na vzmet, ter sili F_d , ki deluje na dušilko [7,8]:

$$F = F_v = F_d. \quad (1)$$

Deformacija elementa (ε) je enaka vsoti deformacije vzmeti (ε_v) in deformacije dušilke (ε_d) [7,8]:

$$\varepsilon = \varepsilon_v + \varepsilon_d. \quad (2)$$

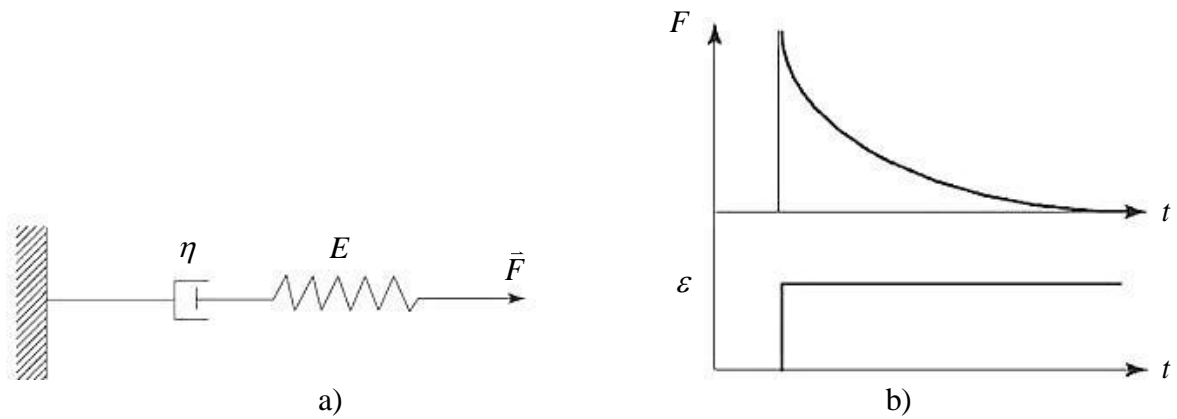
Ob upoštevanju enačbe $\dot{F}_v = E\dot{\varepsilon}_v$ (časovni odvod sile, ki je definirana s Hookovim zakonom) in enačbe $\dot{\varepsilon}_d = F_d / \eta$ (linearni zakon upora), je hitrost deformacije ($\dot{\varepsilon}$) elementa v Maxwellovem modelu:

$$\dot{\varepsilon} = \frac{\dot{F}}{E} + \frac{F}{\eta}, \quad (3)$$

kjer je \dot{F} časovni odvod sile, E koeficient vzmeti in η viskoznostni koeficient snovi v dušilki [7,8]. Pri izometrični kontrakciji ($\dot{\varepsilon} = 0$) je rešitev enačbe (3):

$$F = E\varepsilon e^{-\frac{E}{\eta}t}, \quad (4)$$

kjer je η / E relaksacijski čas. Ta nam pove, kako hitro se mora sila s časom (t) zmanjševati, da bi se ohranjalo konstantno dolžino elementa (slika 1b) [7,8].



Slika 1. Maxwellov model viskoelastičnosti. a) Sestavljen je iz zaporedne vezave linearne vzmeti z elastičnim koeficientom E in dušilke z viskoznostnim koeficientom η . b) Modelna napoved sile pri izometrični kontrakciji je eksponentna padajoča proti vrednosti 0. Povzeto po [8].

2.2 VOIGTOV MODEL

Voigtov model je sestavljen iz vzporedno vezane dušilke in linearne vzmeti (slika 2a). Velikost zunanje sile (F), s katero delujemo na element, je enaka vsoti velikosti sil v dušilki (F_d) in vzmeti (F_v) [7,8]:

$$F = F_d + F_v. \quad (5)$$

Raztezek oz. deformacija elementa (ε) je enaka deformaciji posameznega elementa - vzmeti (ε_v) oz. dušilke (ε_d):

$$\varepsilon = \varepsilon_v = \varepsilon_d. \quad (6)$$

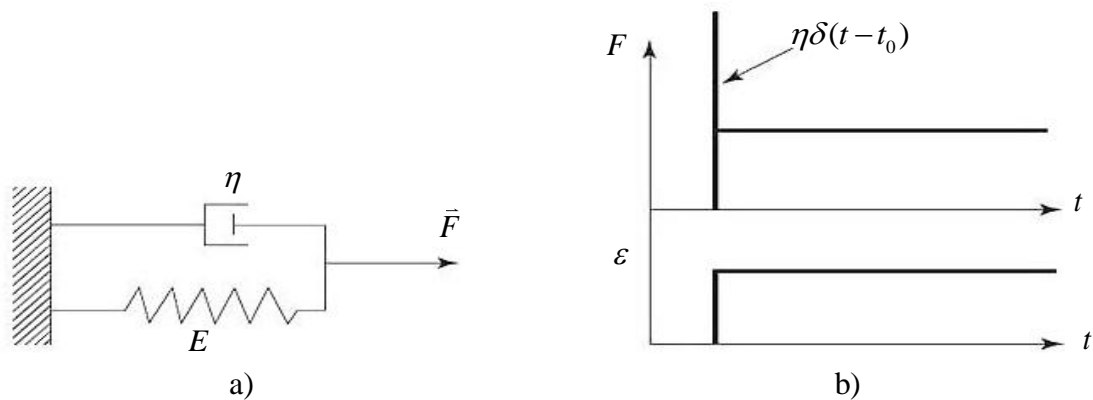
Ob upoštevanju Hookovega zakona za vzmet $F_v = E\varepsilon_v$ in linearne sile upora v dušilki $\dot{\varepsilon}_d = F_d / \eta$, lahko enačbo (5) zapišemo v obliki:

$$F = \dot{\varepsilon}\eta + \varepsilon E. \quad (7)$$

Pri izometrični kontrakciji je sila definirana kot:

$$F = \varepsilon(\eta\delta + E), \quad (8)$$

kjer δ predstavlja funkcijo, ki ima vrednost nič za $t \neq 0$, ter vrednost neskončno za $t = 0$ [7,8].



Slika 2. Voigtov model viskoelastičnosti. a) Sestavljen je iz vzporedne vezave dušilke z viskoznostnim koeficientom η in linearne vzmeti z elastičnim koeficientom E . b) Pri izometrični kontrakciji po skokovitem raztežku sila (F) po hitri spremembi v obliki funkcije δ ostane konstantna. Povzeto po [8].

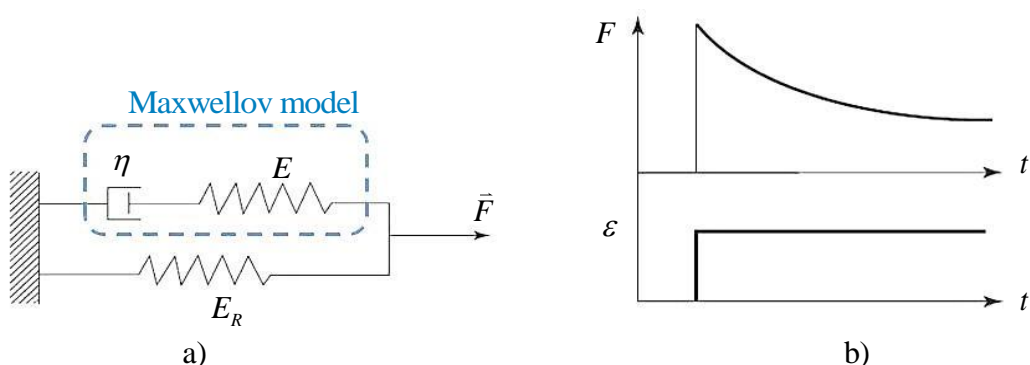
2.3 KELVINOV MODEL

Kelvinov model (slika 3a) dobimo, če elementoma v Maxwellovemu modelu (slika 1a) vzporedno vežemo še eno vzmet. Velja:

$$E_R(\tau_F \dot{\varepsilon} + \varepsilon) = \tau_\varepsilon \dot{F} + F, \quad (9)$$

kjer je τ_F relaksacijski čas deformacije pri konstantni sili, τ_ε relaksacijski čas sile pri konstantni deformaciji in E_R elastični relaksacijski modul. Silo v odvisnosti od časa pri izometrični kontrakciji opisuje enačba [7,8]:

$$F = E_R \left\{ 1 - \left(1 - \frac{\tau_F}{\tau_\varepsilon} \right) e^{-\frac{t}{\tau_\varepsilon}} \right\} \varepsilon. \quad (10)$$



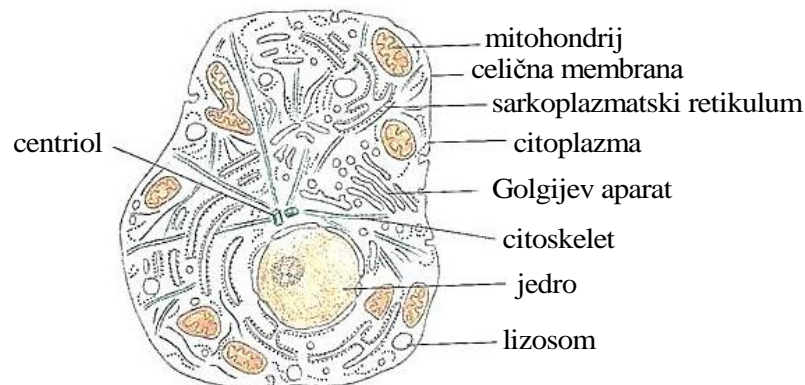
Slika 3. Kelvinov model viskoelastičnosti. a) Sestavljen je iz Maxwellovega modela, katerima je vzporedno vezana linearna vzmet z elastičnim koeficientom E_R . b) Modelna napoved sile (F) pri izometrični kontrakciji, kjer pride do eksponentno padajoče sile (F) proti konstantni vrednosti. Povzeto po [8].

Izmed teh treh modelov je Kelvinov model pokazal neustreznost Maxwellovega ter Voigtovega modela pri hitrosti izgubljanja energije v različnih materialih s cikličnimi

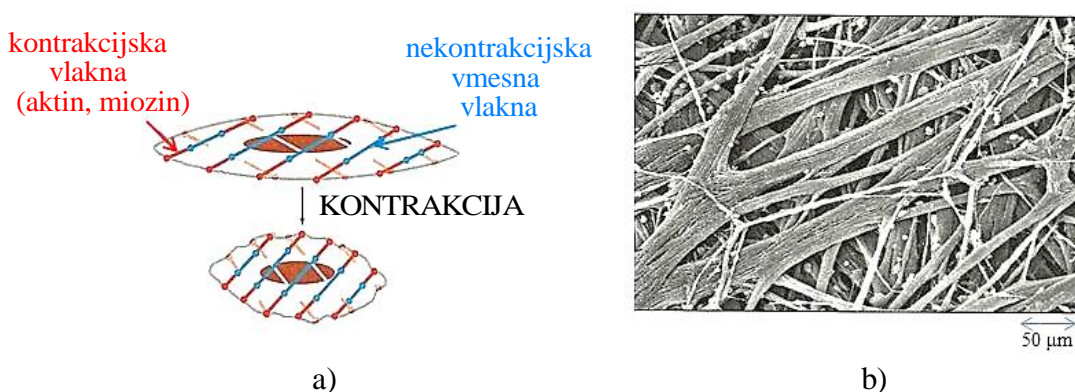
obremenitvami. Kelvinov model imenujemo tudi *standardni linearni model*. Predstavljeni modeli so pasivni, saj je njihov odziv dosežen samo z neko zunanjo silo. Viskoelastični model gladkih mišic (GM), ki ga bomo obravnavali v nadaljevanju pa je *aktiven*, saj dodaten *aktivni element* povzroča *aktivno silo* [7,8]. Preden se lotimo viskoelastičnih lastnosti gladko mišične celice, si oglejmo njeno zgradbo in kontrakcijo.

3 GLADKA MIŠIČNA CELICA

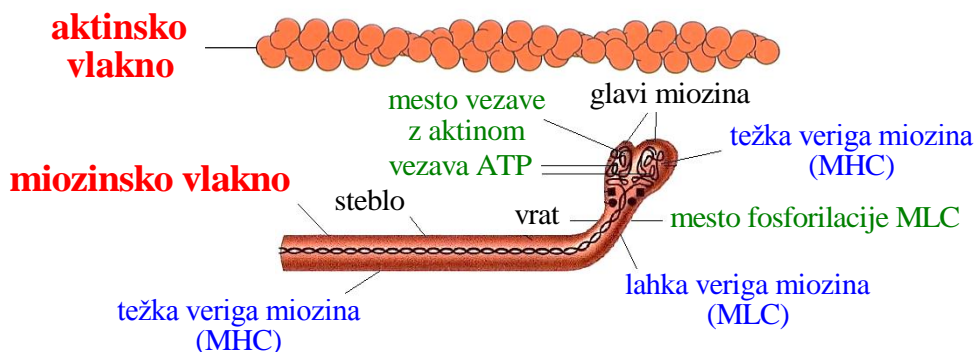
Gladko mišično celico (GMC) obdaja celična membrana, ki ločuje znotrajcelično okolje od zunanosti ter jo ščiti pred zunanjimi vplivi. V celični membrani se nahajajo receptorji in proteini, v celici pa: jedro, sarkoplazmatski retikulum (SR), Golgijev aparat, mitohondriji (MIT) (slika 4)... Jedro ima pomembno vlogo pri celični delitvi, v SR in mitohondrijih se shranjuje Ca^{2+} , ki je ključen pri znotrajcelični signalizaciji, v Golgijevem aparatu pa poteka priprava produktov, ki jih celica izloča [9]. Pri kontrakciji GMC imata pomembno vlogo beljakovini aktin in miozin, ki se prepletata v celici in tako tvorita tanka vlakna (slika 5). Na miozinskih vlaknih so posebne tvorbe iz miozina, ki se imenujejo *prečni mostički* (angl. cross-bridge, slika 6). Sestavljeni so iz treh delov: stebila, vrata in dveh glav. Rep in glavi sta sestavljeni iz težkega, vrat pa iz lahkega miozina, na katerem pred kontrakcijo poteče fosforilacija. Na aktinskem vlaknu so posebna aktivna mesta, na katera se v procesu kontrakcije vežejo glave prečnih mostičkov [10].



Slika 4. Shematski prikaz mišične celice. Povzeto po [11].



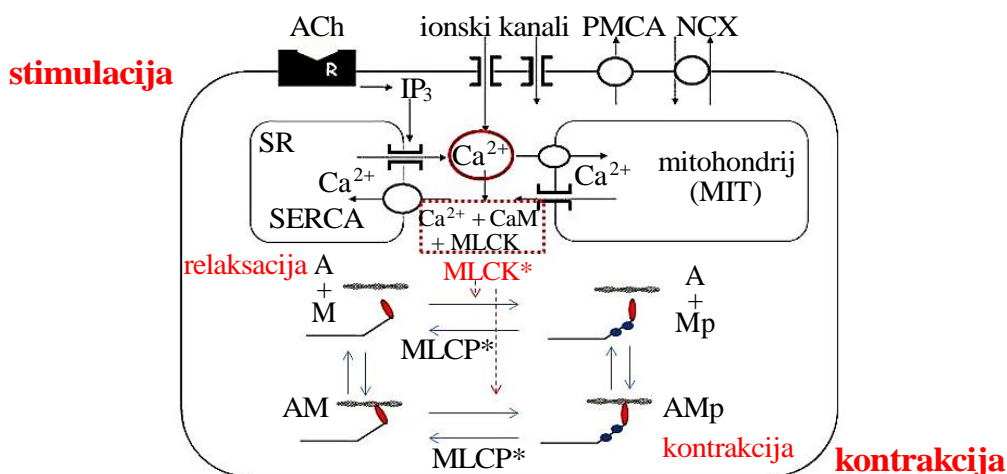
Slika 5. Vlakna GMC. a) GMC vsebuje kontrakcijska vlakna, sestavljena iz aktina in miozina ter nekontrakcijska vlakna. b) Snop gladkih mišičnih celic pod elektronskim mikroskopom. Povzeto po [11].



Slika 6. Aktinsko in miozinsko vlakno. Povzeto po [11].

3.1 KONTRAKCIJA GLADKIH MIŠIČNIH CELIC

Za kontrakcijo GMC je potrebna stimulacija receptorjev na celični membrani, ki jo povzročijo različni agonisti. Agonisti so posredniki pri prenosu signala iz zunanosti (akcijskega potenciala) v notranost GMC. Najučinkovitejši agonist pri GMC je acetilholin (ACh). Vezava ACh na receptorje (R) povzroči nastajanje molekul inozitol 1,4,5-trifosfata (IP_3) v notranosti celice, ki se nato vežejo na posebne receptorje (IP_3R) na kanalih membrane SR. Po aktivaciji receptorjev IP_3R se v citoplazmo iz SR sprosti precejšnja količina Ca^{2+} . Koncentracijo Ca^{2+} v citoplazmi uravnava predvsem odprtost kanalov na SR ter aktivnost črpalk, ki prečrpavajo Ca^{2+} nazaj v SR (SERCA črpalke), v določeni meri pa tudi vezava Ca^{2+} na citoplazemske proteine, izmenjava Ca^{2+} z mitohondriji in pretok Ca^{2+} preko celične membrane (ionski kanali, črpalke PMCA in NCX). Na odprtost kanalov na SR lahko vplivata ali oba IP_3 in Ca^{2+} (mehanizem CIICR – »calcium and IP_3 induced calcium release«), ali pa samo Ca^{2+} (CICR – »calcium induced calcium released«). Ca^{2+} v citoplazmi se poleg ostalih proteinov veže tudi s proteinom CaM, ki aktivira encim MLCK. Aktiviran encim MLCK (na sliki 7 označen z MLCK*), to je tisti, na katerega je vezan kompleks Ca_4CaM , fosforilira MLC (A+Mp) na vratu miozina (slika 6). Fosforilacija MLC omogoči vezavo miozinske glave na aktinsko vlakno (AMp), kar imenujemo aktinsko-miozinski prečni mostiček (angl. actomyosin crossbridge), s tem pa tudi kontrakcijo GMC. Aktivna oblika encima MLCP (na sliki 7 označen z MLCP*) pa poskrbi za defosforilacijo prečnih mostičkov in prehod v stanji A+M in AM, kot je prikazano na sliki 7. Razvoj sile tako opisujejo 4 stanja aktina (A) in miozina (M). Silo generirajo in vzdržujejo na aktin pripeti prečni mostički (slika 7) [2,12].

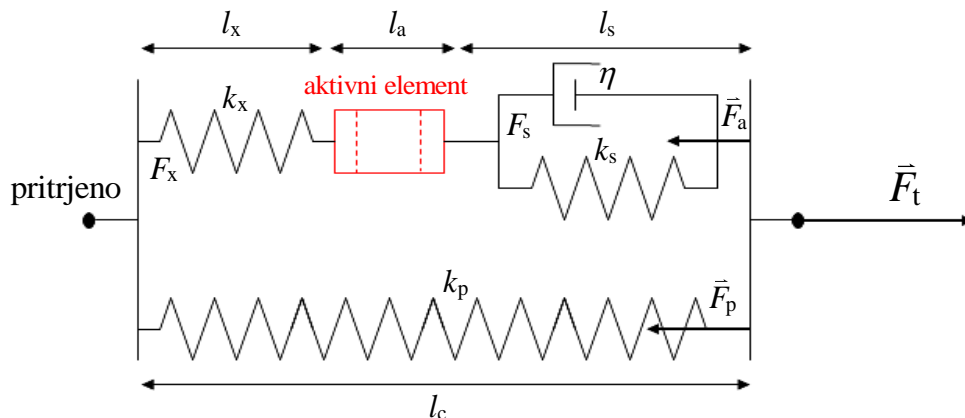


Slika 7. Shematski prikaz procesov od stimulacije do kontrakcije GMC. Oznake so vpeljane v tekstu. Povzeto po [2,12].

3.2 RAZVOJ SILE V GLADKO MIŠIČNI CELICI

3.2.1 Viskoelastični mehanski model celice gladkih mišic

Viskoelastični mehanski model GMC, ki ga obravnavamo v tem diplomskem seminarju, je kompleksnejši od navedenih v 2. poglavju. Model povezuje aktivno silo, ki je posledica drsenja prečnih mostičkov ob aktinskem vlaknu, z mehanskimi lastnosti miofilamentov (aktin, miozin) in njihovimi viskoelastičnimi strukturami, ki so v stiku s celično steno. Vzmet z dolžino l_x in z elastičnim koeficientom k_x opisuje raztezek in elastičnost prečnih mostičkov, Voigtov element z dolžino l_s , z vzmetjo z elastičnim koeficientom k_s in z dušilko z viskoznostnim koeficientom η , opisuje viskoelastične lastnosti izrastkov miofilamentov, ki so v stiku s celično steno, ter vzmet z dolžino l_c in elastičnostjo k_p , ki opisuje dolžino in elastične lastnosti celične stene s citoskeletom. Aktivni element z dolžino l_a ponazarja del, kjer v mišični celici poteka interakcija med prečnimi mostički in aktinskim vlaknom, ki s svojim prepenjanjem med aktivnimi mesti, konformacijskimi spremembami in drsenjem ob aktinskem vlaknu ustvari aktivno silo F_a , le-ta pa povzroči skrčitev ostalih elementov. Elementi modela so na eni strani fiksno pripeti, na drugi strani pa nanje delujemo z zunanjo silo F_t . Pri izometrični kontrakciji ostane dolžina celice po stimulaciji in skrčitvi aktivnega elementa nespremenjena. F_t , ki je hkrati generirana sila celice, je enaka vsoti aktivne (F_a) in pasivne sile (F_p). F_x in F_s pa sta sili ostalih opisanih elementov ter sta po velikosti enaki F_a (slika 8) [6].



Slika 8. Viskoelastični mehanski model GMC. Posamezni elementi ter oznake fizikalnih količin so vpeljani v tekstu. Povzeto po [6].

Aktivno silo, ki je posledica interakcij med prečnimi mostički in aktinskim vlaknom, opisuje enačba:

$$F_a = \left\{ f_{AMp} kAMp (v_x + \dot{l}_a) + f_{AM} kAM \dot{l}_a \right\} e^{-\beta((l_a - l_{opt})/l_{opt})^2}, \quad (11)$$

kjer je f_{AMp} konstanta trenja med aktinom in fosforiliranim miozinom ter f_{AM} konstanta trenja med aktinom in nefosforiliranim miozinom. Oznaka $kAMp$, ki predstavlja relativni delež na aktin pripetih fosforiliranih prečnih mostičkov, je definirana kot razmerje med koncentracijama na aktin pripetega fosforiliranega miozina in celotnega miozina ($[AMp]/[M]_{tot}$). Oznaka kAM , ki predstavlja relativni delež na aktin pripetih nefosforiliranih prečnih mostičkov, pa je definirana kot razmerje med koncentracijama na aktin pripetega nefosforiliranega prečnega mostička in celotnega miozina ($[AM]/[M]_{tot}$). v_x je hitrost gibanja aktinskega vlakna (hkrati je le-ta enaka hitrosti prepenjanja prečnih mostičkov na aktin), \dot{l}_a

hitrost drsenja prečnih mostičkov ob aktinskem vlaknu (hkrati je l_e -ta enaka hitrosti krčenja aktivnega elementa), β modulationska konstanta dolžine in l_{opt} optimalna dolžina aktivnega elementa. Pri optimalni dolžini poteka maksimalna interakcija med miozinskim in aktinskim vlaknom oz. pri optimalni dolžini celica razvije maksimalno napetost. Pri takšnem zapisu aktivne sile predpostavimo, da tako fosforilirani kot nefosforilirani prečni mostički drsijo vzdolž aktinskega vlakna s hitrostjo \dot{l}_a in povzročajo kontrakcijo celice, samo fosforilirani prečni mostički pa »veslajo« in poganjajo aktinsko vlakno. Aktivno silo tako ustvarjajo samo fosforilirani prečni mostički, nefosforilirani pa jo vzdržujejo [6].

Pasivna sila (F_p), ki opisuje elastične lastnosti celičnih sten, ki se odražajo v konstanti (k_p) in skupni dolžini celice (l_c), je:

$$F_p = k_p \left(e^{\alpha_p \frac{l_c - l_0}{l_0}} - 1 \right), \quad (12)$$

kjer je α_p konstanta pasivnega elementa in l_0 dolžina celice, kadar pasivni element ne generira sile [6].

Ena izmed sil je tudi sila, ki opisuje elastične lastnosti prečnih mostičkov pripetih na aktin (F_x). Definirana je kot:

$$F_x = (k_{x1} k_{AMP} + k_{x2} k_{AM}) l_x e^{-\beta \left((l_a - l_{opt}) / l_{opt} \right)^2}, \quad (13)$$

kjer sta k_{x1} in k_{x2} konstanti elastičnosti fosforiliranih in nefosforiliranih prečnih mostičkov. Ostale konstante so enake kot pri enačbi (11). Enačba pokaže, da oba tipa prečnih mostičkov, tako fosforiliranih kot nefosforiliranih, prispevata k elastičnim lastnostim pripetih prečnih mostičkov [6].

Na desni strani od aktivnega elementa je zaporedno vezan Voigtov element, ki predstavlja viskoelastične lastnosti miofilamentov in njihovih izrastkov, ki so v stiku s celično steno (slika 8). Sestavljen je iz vzporedne vezave vzmeti in dušilke (podrobnejši opis v poglavju 2). Povezava med silo (F_s) in raztežkom (l_s) je:

$$F_s = \eta_s \dot{l}_s + k_s \left(e^{\alpha_s (l_s - l_{s0}) / l_{s0}} - 1 \right), \quad (14)$$

kjer je \dot{l}_s hitrost krčenja oz. raztezanja Voigtovega elementa, α_s je brezdimenzijska konstanta, k_s je elastičnost Voigtovega elementa in l_{s0} njegova dolžina, kadar je sila F_s enaka nič [6].

V vsakem trenutku velja enakost sil:

$$F_s = F_a = F_x, \quad (15)$$

zunanja sila, s katero delujemo na celico, je enaka:

$$F_t = F_a + F_p. \quad (16)$$

Dolžina celice je pri izometrični kontrakciji konstantna in je v vsakem trenutku enaka:

$$l_c = l_x + l_a + l_s. \quad (17)$$

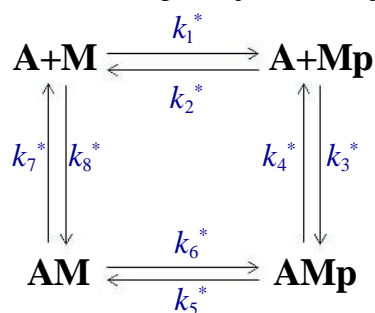
Tabela 1. Modelni parametri viskoelastičnega modela

Parameter	Vrednost	Parameter	Vrednost
l_c	123,0 μm	v_x	5,0 $\mu\text{m ms}^{-1}$
l_{opt}	100,0 μm	k_s	0,2 μN
l_0	40,0 μm	k_p	0,1 μN
l_{s0}	30,0 μm	α_s	4,4
k_{x1}	13,0 $\mu\text{N } \mu\text{m}^{-1}$	α_p	0,1
k_{x2}	6,3 $\mu\text{N } \mu\text{m}^{-1}$	β	7,5
f_{AMp}	0,5 $\mu\text{N ms } \mu\text{m}^{-1}$	η	0,01 $\mu\text{N ms } \mu\text{m}^{-1}$
f_{AM}	80,0 $\mu\text{N ms } \mu\text{m}^{-1}$		

3.2.2 Aktivni razvoj sile

Kontrakcijo mišic povzroči drsenje in prepenjanje prečnih mostičkov med aktinskim in miozinskim vlaknom. V GM kontrakcijo posredno uravnava Ca^{2+} preko vezave na CaM in posledične aktivacije encima MLCK, ki fosforilira lahke verige miozina (MLC). S fosforilacijo MLC se poveča afiniteta prečnih mostičkov do aktina in poviša hitrost prepenjanja. Ob defosforilaciji MLC se afiniteta med aktinom in miozinom zmanjša, hitrost prepenjanja na aktin pripetih defosforiliranih prečnih mostičkov pa je zelo majhna oz. nič, kar imenujemo stanje na aktin pripetih zaskočenih prečnih mostičkov (angl. »latch bridge«). Defosforilacijo prečnih mostičkov regulira aktivna oblika encima fosfataze lahkih verig miozina (MLCP). Povišana hitrost fosforilacije je povezana s povečanjem, povišana hitrost defosforilacije pa z zmanjšanjem koncentracije Ca^{2+} v citoplazmi [13].

Za razvoj aktivne sile pri kontrakciji privzamemo osnovni 4-stanjski kinetični model (slika 9), ki sta ga objavila Hai in Murphy [13], dopolnila pa Rembold in Murphy [13]. Model vsebuje štiri osnovna stanja molekule miozina (M) v interakciji z aktinom (A). Model upošteva tudi, da se lahko na aktin veže nefosforiliran prečni mostiček, ki silo samo vzdržuje, ustvarja pa jo na aktin pripet fosforiliran prečni mostiček [13]. Vezava nefosforiliranega miozina na aktin v prvotnem osnovnem modelu ni bila vsebovana. Po vzoru drugih avtorjev (Fajmut in sod. v referenci [13]) v modelu upoštevamo tudi regulacijo aktivacije MLCP.



Slika 9. 4-stanjski model za razvoj aktivne sile. Stanje M predstavlja nepripet nefosforiliran miozin, stanje Mp pa nepripet fosforiliran miozin. Stanje AM predstavlja na aktin pripet nefosforiliran miozin, AMp pa na aktin pripet fosforiliran miozin. k_1^* do k_8^* so hitrostne konstante. Povzeto po [13].

Takšno kinetično shemo opisujejo naslednje diferencialne enačbe:

$$\frac{d[\text{Mp}]}{dt} = k_1^* [\text{M}] - k_2^* [\text{Mp}] - k_3^* [\text{Mp}] + k_4^* [\text{AMp}], \quad (18)$$

$$\frac{d[\text{AMp}]}{dt} = k_3^* [\text{Mp}] - k_4^* [\text{AMp}] - k_5^* [\text{AMp}] + k_6^* [\text{AM}], \quad (19)$$

$$\frac{d[\text{AM}]}{dt} = k_5^* [\text{AMp}] - k_6^* [\text{AM}] - k_7^* [\text{AM}] + k_8^* [\text{M}] \quad (20)$$

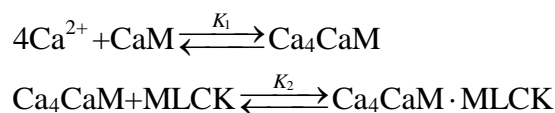
in ohranitvena enačba za miozin:

$$[\text{M}]_{\text{tot}} = [\text{M}] + [\text{Mp}] + [\text{AMp}] + [\text{AM}]. \quad (21)$$

[M] je koncentracija neprijetega nefosforiliranega miozina, [Mp] pa koncentracija neprijetega fosforiliranega miozina.

3.2.3 Aktivacija encima MLCK

Prva uveljavljena teorija za aktivacijo encima MLCK je bila, da se ob povišanju koncentracije Ca^{2+} v citoplazmi štirje Ca^{2+} ioni sočasno vežejo na CaM. Kompleks Ca_4CaM pa nato interagira z encimom MLCK, s čimer postane MLCK aktiven (slika 10). Nato aktiven MLCK fosforilira MLC. Med drugim so tudi zaradi prepričanja o hitrem poteku reakcij uporabili približek hitre vzpostavitve ravnovesja [13].



Slika 10. Prva kinetična shema interakcij med Ca^{2+} , CaM in MLCK. Kompleks $\text{Ca}_4\text{CaM} \cdot \text{MLCK}$ predstavlja aktivno obliko encima MLCK. K_1 in K_2 sta ravnovesni konstanti. Povzeto po [13].

Zadnje meritve [1] so pokazale, da z MLCK ne reagira samo kompleks Ca_4CaM , temveč tudi kalcija prost CaM in kompleksi Ca_2CaM . CaM namreč vsebuje dve različni vezavni mesti za Ca^{2+} , na kateri se Ca^{2+} približno sočasno veže. Ker je vezava MLCK na komplekse Ca_2CaM počasnejša, se je izkazalo, da uporaba približka hitre vzpostavitve ravnovesja ni primeren pristop k matematičnemu modeliranju. Na podlagi teh ugotovitev so izdelali kompleksnejšo kinetično shemo interakcij med Ca^{2+} , CaM in MLCK v obliki kocke, kjer so upoštevana različna vezavna mesta za Ca^{2+} (terminala N in C), vezavno mesto za MLCK (terminal M) in nezasedena vezavna mesta (_), kot je prikazano na sliki 11. V enačbah (22), (23) in (24) uporabimo njihove koncentracije. Ob upoštevanju, da obstajajo na CaM tri vezavna mesta, od katerih je lahko posamezno mesto zasedeno ali pa ne, obstaja v modelu 8 različnih kompleksov molekule CaM, ki so v kinetični shemi na sliki 11 razporejeni v ogliščih kocke [1].

Takšna kinetična shema vsebuje 12 reakcij in 24 hitrostnih konstant. Opisujeta jo 2 ohranitveni enačbi:

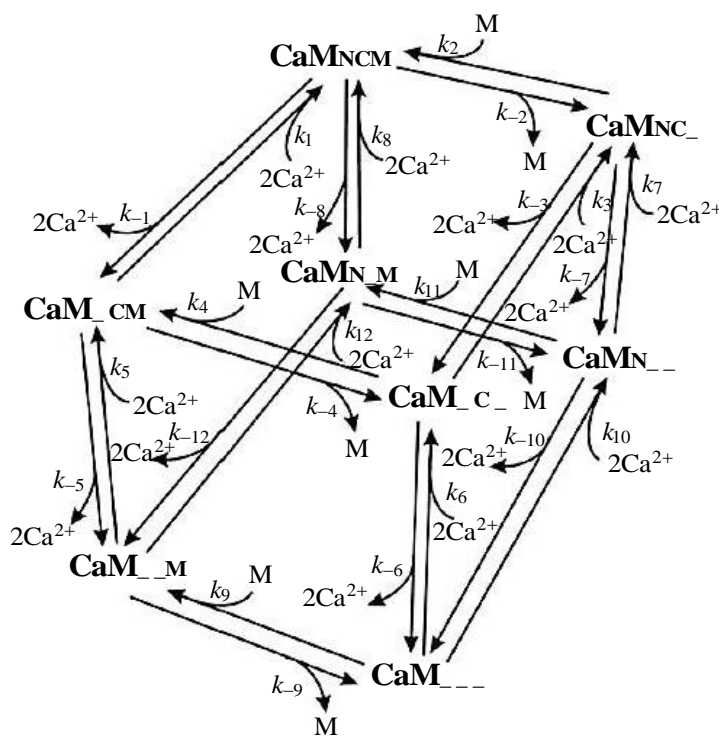
$$[\text{CaM}_{\dots}] = [\text{CaM}_{\text{tot}}] - ([\text{CaM}_{\text{NC}_-}] + [\text{CaM}_{\text{CM}}] + [\text{CaM}_{\text{C}_-}] + [\text{CaM}_{\text{M}}] + [\text{CaM}_{\text{N}_-}] + [\text{CaM}_{\text{N}_\text{M}}] + [\text{CaM}_{\text{NCM}}]) \quad (22)$$

$$[\text{M}] = [\text{M}_{\text{tot}}] - ([\text{CaM}_{\text{CM}}] + [\text{CaM}_{\text{M}}] + [\text{CaM}_{\text{N}_\text{M}}] + [\text{CaM}_{\text{NCM}}]) \quad (23)$$

in 7 diferencialnih enačb (zaradi 7 neodvisnih spremenljivk) oblike:

$$\frac{d[\text{CaM}_{\text{NC}_-}]}{dt} = -k_1 [\text{Ca}^{2+}]^2 [\text{Ca}_{\text{CM}}] + k_{-1} [\text{CaM}_{\text{NCM}}] + k_4 [\text{M}] [\text{CaM}_{\text{C}_-}] - k_4 [\text{CaM}_{\text{CM}}] + k_5 [\text{Ca}^{2+}]^2 [\text{CaM}_{\text{M}}] - k_5 [\text{CaM}_{\text{CM}}]. \quad (24)$$

Ostale diferencialne enačbe za CaM_{NC_-} , CaM_{C_-} , CaM_{M} , CaM_{N_-} , $\text{CaM}_{\text{N}_\text{M}}$ in CaM_{NCM} pa naredimo po zgledu enačbe (24) [1].



Slika 11. Kinetična shema interakcij med Ca^{2+} , CaM in MLCK. Podpisani črki N in C predstavljata dve različni vezavni mesti na CaM (N- in C-terminal) za Ca^{2+} ione, podpisana črka M predstavlja zasedeno vezavno mesto na CaM z MLCK, podpisana črta (_) pa predstavlja nezasedena vezavna mesta na CaM. k_i in k_{-i} so hitrostne konstante. Aktivna oblika MLCK je označena s CaM_{NCM} . Povzeto po [1].

3.2.4 Nastanek Ca^{2+} homeostaze

Vezava agonista, npr. neurotransmitterja acetilholina (ACh), na receptorje v celični membrani povzroči povišanje koncentracije Ca^{2+} v citoplazmi. Ca^{2+} homeostaza v celici je lahko ali v obliki dvofaznega spreminjanja koncentracije (slika 13a, 14a), kar pomeni, da prvemu

hitremu povišanju koncentracije sledi faza počasnejšega vračanja do vrednosti, ki je višja od mirovne, ali pa v obliki oscilacij (slika 13b, 14b), kjer prvemu hitremu in visokemu povišanju koncentracije sledi faza samovzdrževanih oscilacij koncentracije Ca^{2+} . Dvofazne signale zasledimo v celicah človeka, goveda in podganah, oscilirajoče pa v celicah miši, svinj, morskih prašičkov in tudi podganah [14].

Pri matematičnem modeliranju Ca^{2+} homeostaze v GMC celico obravnavamo kot zaprt sistem, kar pomeni, da ni izmenjave Ca^{2+} preko celične membrane. Za shranjevanje Ca^{2+} upoštevamo štiri shrambe, in sicer SR, MIT, shranjevalne (BP) in signalne (SP) proteine. Preko membrane SR upoštevamo tok Ca^{2+} skozi kanal IP_3R tipa 1 (J_{R1}), pasivni (J_{pas}) in aktivni (J_{SERCA}) transport Ca^{2+} . Preko membrane mitohondrijev upoštevamo tok Ca^{2+} v njih (J_{mi}) in tok iz njih (J_{mo}). Vezavo Ca^{2+} na BP opišemo s tokom J_{BP} , na SP pa s tokom J_{SP} (slika 12) [14].

Model sestavljajo štiri navadne nelinearne diferencialne enačbe prvega reda:

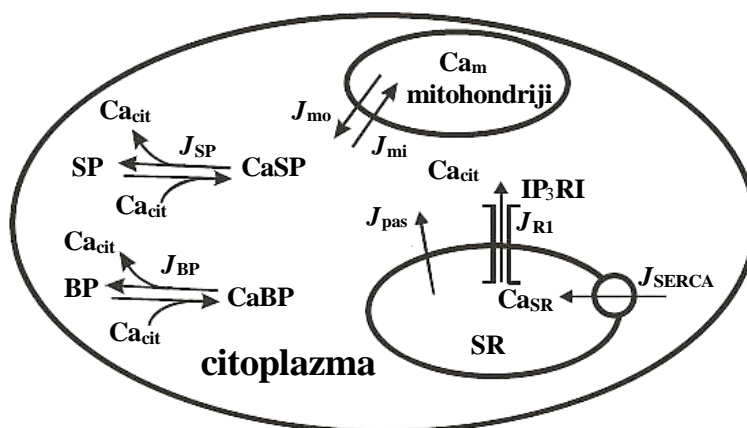
$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}}{dt} = J_{R1} - J_{\text{SERCA}} + J_{\text{pas}} - J_{\text{BP}} - J_{\text{SP}} - J_{\text{mi}} + J_{\text{mo}}, \quad (25)$$

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}}{dt} = \frac{\beta_{\text{SR}}}{\rho_{\text{SR}}} (J_{\text{SERCA}} - J_{R1} - J_{\text{pas}}), \quad (26)$$

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]_{\text{m}}}{dt} = \frac{\beta_{\text{m}}}{\rho_{\text{m}}} (J_{\text{mi}} - J_{\text{mo}}), \quad (27)$$

$$\frac{dh}{dt} = q_1 \frac{[\text{IP}_3] + q_2}{[\text{IP}_3] + q_3} (1 - h) - q_4 h [\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}, \quad (28)$$

kjer so $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{m}}$ koncentracije prostega Ca^{2+} v citoplazmi (cit), SR in mitohondrijih (m). β_{SR} in β_{m} sta razmerji koncentracij prostega in celotnega Ca^{2+} v SR in v MIT, ρ_{SR} in ρ_{m} sta razmerji med volumnom aktivnega dela SR oz. MIT in volumnom citoplazme, q_1 , q_2 , q_3 in q_4 pa so kinetične konstante [14]. h je spremenljivka, ki opisuje časovno odvisnost odprtosti kanalov na SR v odvisnosti od koncentracije IP_3 in Ca^{2+} .



Slika 12. Shema modela za napoved Ca^{2+} signala v GMC. Povzeto po [14].

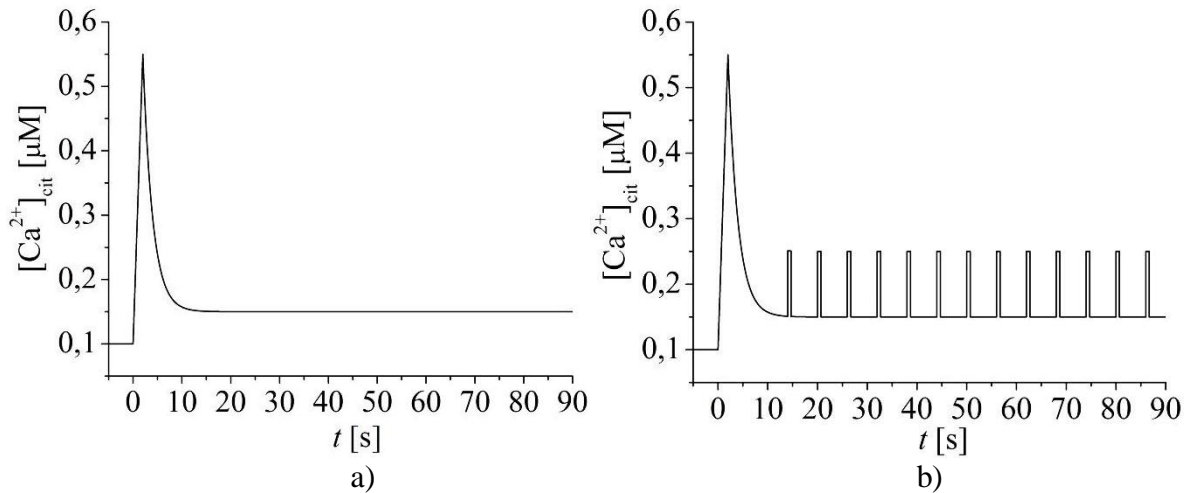
Zaradi lažje analize, smo v programu Berkeley Madonna matematično generirali dvofazni Ca^{2+} signal, ki ga opišemo:

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}(t) = \begin{cases} [\text{Ca}^{2+}]_r & ; \quad t < t_1 \\ [\text{Ca}^{2+}]_r + \left([\text{Ca}^{2+}]_{\text{max}} - [\text{Ca}^{2+}]_r\right) \frac{t-t_1}{t_1-t_2} & ; \quad t_1 \leq t \leq t_2 \\ [\text{Ca}^{2+}]_p + \left([\text{Ca}^{2+}]_{\text{max}} - [\text{Ca}^{2+}]_p\right) e^{-k(t-t_2)} & ; \quad t > t_2, \end{cases} \quad (29)$$

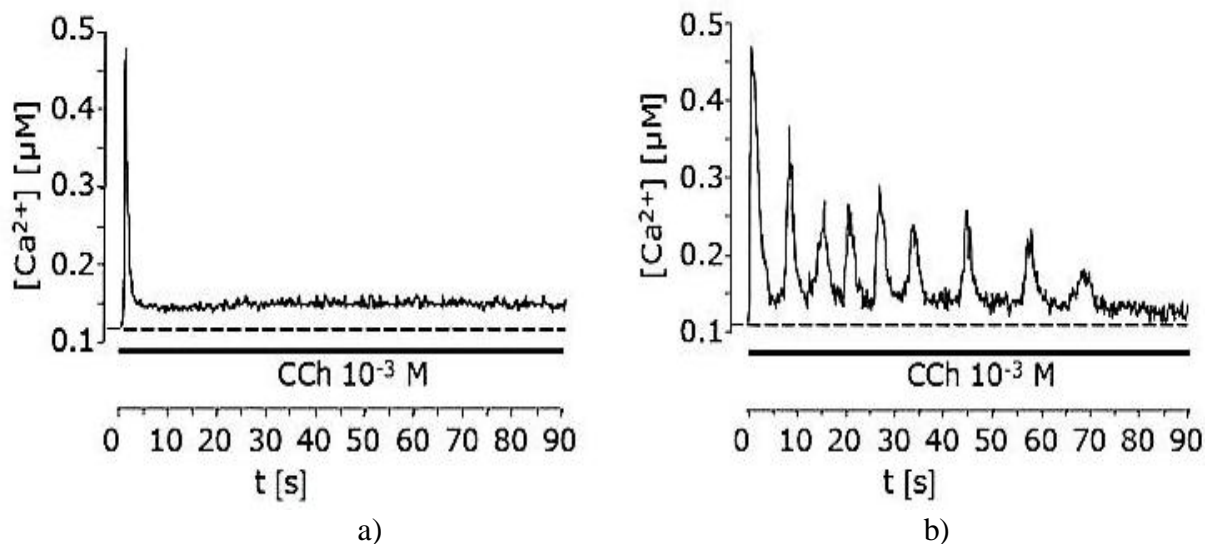
kjer so $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{max}}$, $[\text{Ca}^{2+}]_p$ in $[\text{Ca}^{2+}]_r$ koncentracije vrha (max), platoja (p) in mirovnega stanja (r). t_1 je čas ob začetku naraščanja koncentracije Ca^{2+} , t_2 je čas ob dosegu vrha, k pa določa hitrost padanja vrednosti platoja. Prav tako smo umetno generirali oscilirajoč Ca^{2+} signal:

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}(t) = \begin{cases} [\text{Ca}^{2+}]_r & ; \quad t < t_1 \\ [\text{Ca}^{2+}]_r + \left([\text{Ca}^{2+}]_{\text{max}} - [\text{Ca}^{2+}]_r\right) \frac{t-t_1}{t_1-t_2} & ; \quad t_1 \leq t \leq t_2 \\ [\text{Ca}^{2+}]_p + \left([\text{Ca}^{2+}]_{\text{max}} - [\text{Ca}^{2+}]_p\right) e^{-k(t-t_2)} & ; \quad t_2 < t < t_3, \\ [\text{Ca}^{2+}]_p + \left(\text{if MOD}(t, t_0) \geq t_s \text{ then } 0 \text{ else } [\text{Ca}^{2+}]_a\right) & ; \quad t \geq t_3 \end{cases} \quad (30)$$

kjer imajo $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{max}}$, $[\text{Ca}^{2+}]_p$, $[\text{Ca}^{2+}]_r$, t_1 , t_2 in k enak pomen kot v enačbi (29), $[\text{Ca}^{2+}]_a$ določa višino oscilirajočih pravokotnih pulzov nad vrednostjo platoja, t_3 je čas ob začetku faze oscilacij, t_s je čas trajanja enega pravokotnega pulza, t_0 je perioda oscilacij in $\text{MOD}(t, t_0)$ je ostanek pri deljenju časa t s časom t_0 [2,14]. Vrednost parametrov je povzeta iz [3], lastnosti tako definiranih signalov pa so zelo podobne izmerjenim.



Slika 13. Matematično generirani a) dvofazni in b) oscilirajoči Ca^{2+} signal.

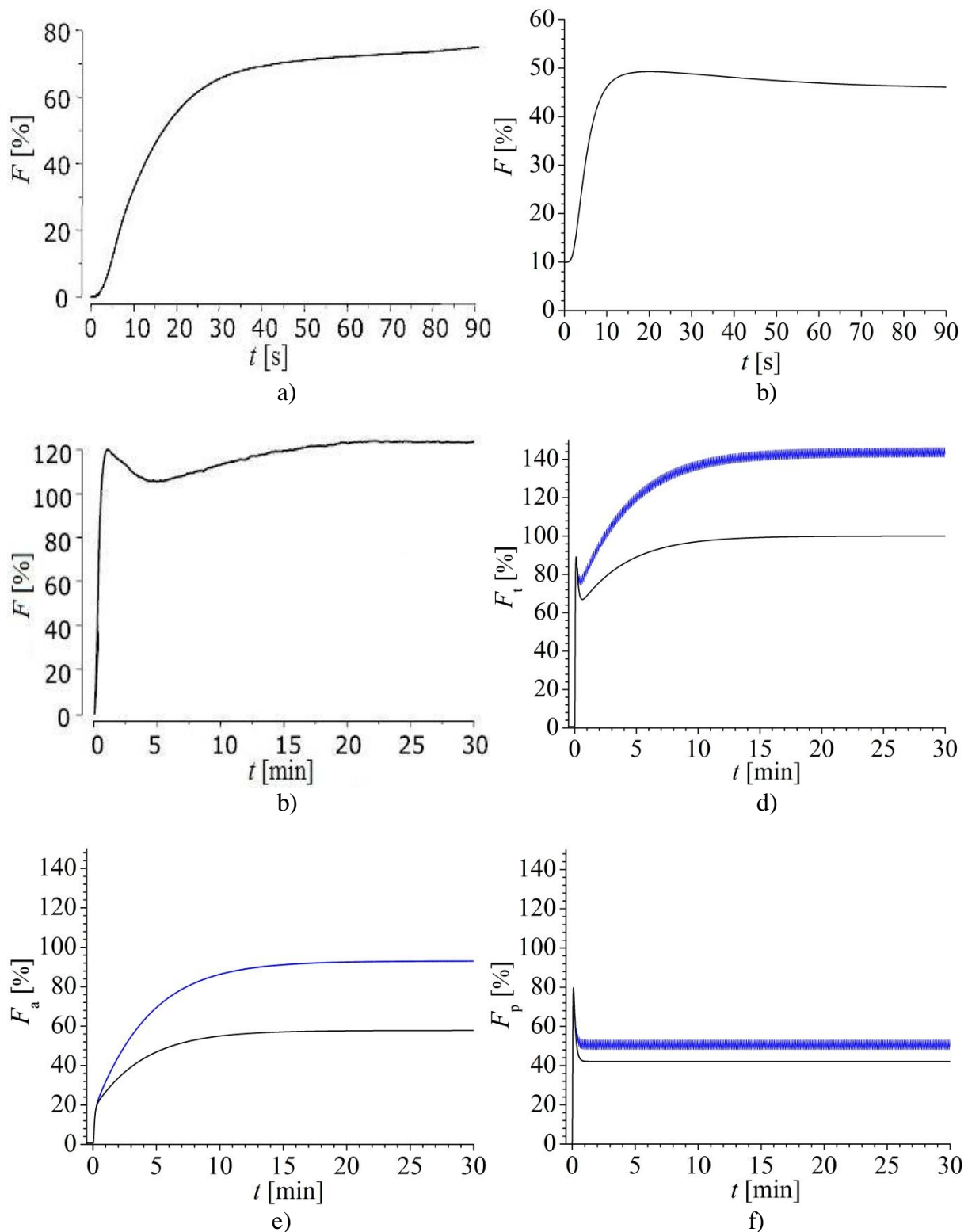


Slika 14. Izmerjeni a) dvofazni in b) oscilirajoči Ca^{2+} signal [2].

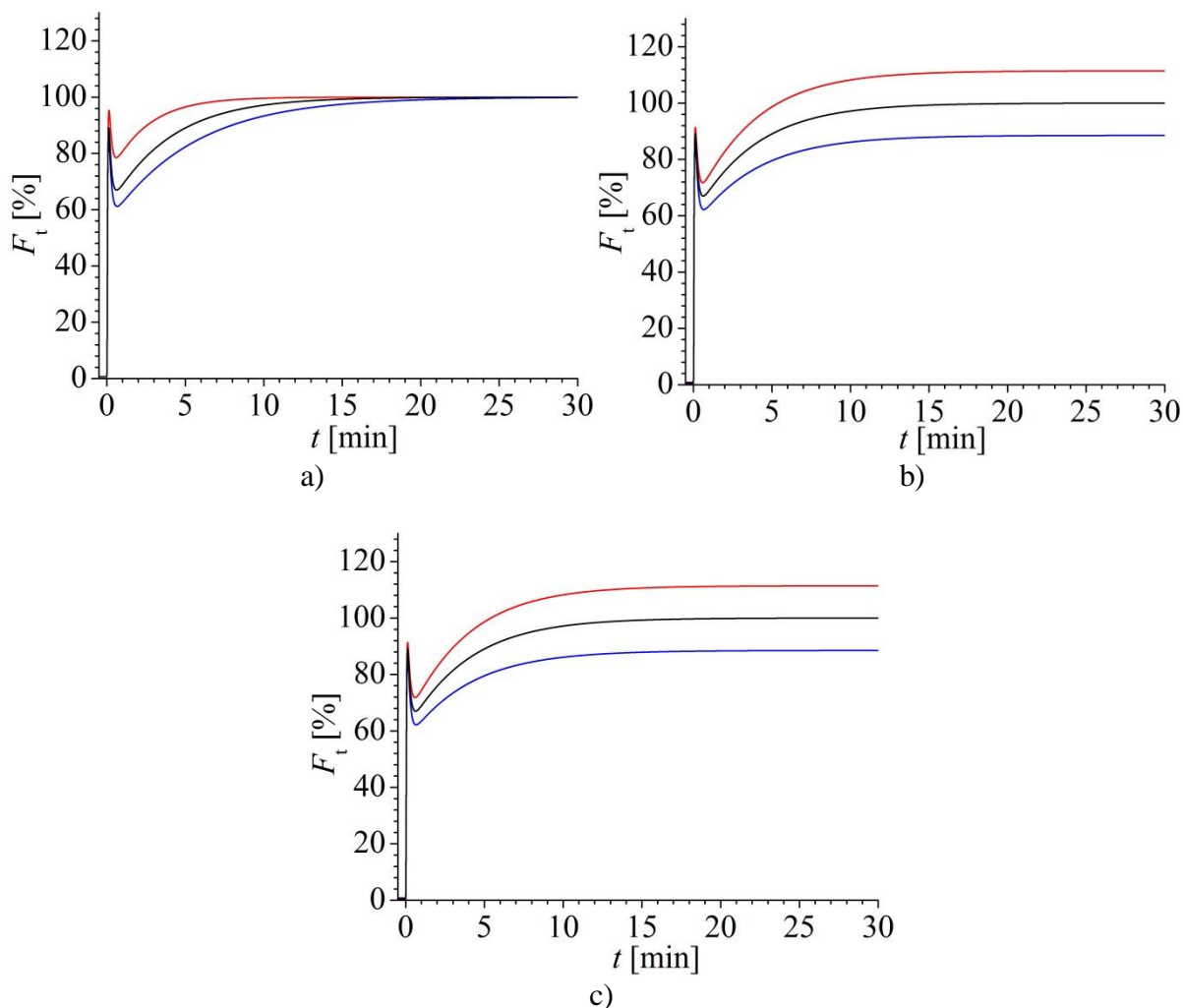
4 REZULTATI

V tem poglavju bomo komentirali in analizirali rezultate, ki jih dobimo s sklopitvijo viskoelastičnega modela, 4-stanjskega modela za razvoj aktivne sile, modela za aktivacijo encima MLCK in časovno spremenljivega Ca^{2+} signala. Kot rezultat predstavimo razvoj sile v GMC pri izometrični kontrakciji in spremembe dolžin posameznih elementov viskoelastičnega modela za obe vrsti Ca^{2+} signalov.

Izkaže se, da model napove razvoj sile v GMC, ki se razlikuje od tistega, ko viskoelastične lastnosti sistema niso upoštevane. Samo 4-stanjski model da za rezultat silo, ki doseže svoj maksimum v času nekaj 10 sekund, kar je sicer v skladu z meritvami, vendar je sila nato ves čas konstantna (slika 15a in b). Iz meritev v daljšem časovnem obsegu pa se izkaže, da omenjeni maksimum sile ni tudi globalni maksimum, saj je le-ta ob dolgotrajni stimulaciji dosežen šele po nekaj 10 minutah (slika 15c). Ta globalni maksimum je za približno dodatnih 20 % višji od prvega maksimuma. 4-stanjski model, ki je nadgrajen z viskoelastičnim modelom, pa da za rezultat podobno obnašanje, kot je tisto, ki ga opazijo pri eksperimentu na gladki mišičnini podganje traheje. Prvi hitri fazi, ki je dosežena v manj kot 1 minuti, sledi druga počasnejša faza v razvoju sile, kjer skupna sila doseže maksimalno vrednost v približno 30 minutah (slika 15c in d). Skupna sila je vsota aktivne in pasivne sile, ki sta na sliki 15e in f prikazani tako za dvofazni kot za oscilirajoči Ca^{2+} signal. Iz analize posameznih prispevkov v skupni sili je razvidno, da k zakasnitvi v razvoju sile prispeva aktivna sila, ki doseže svoj maksimum šele ob času pribl. 15 min. Pri oscilirajočem Ca^{2+} signalu je v drugi, počasnejši fazi, opazen večji porast sile kot pri dvofaznem. Izmed parametrov viskoelastičnega modela, ki vplivajo na obliko sile v drugi fazi, smo izpostavili trenje med aktinom in nefosforiliranim miozinom (f_{AM}), trenje med aktinom in fosforiliranim miozinom (f_{AMP}) ter hitrost gibanja aktinskega vlakna (v_x). Tako pri dvofaznem kot pri oscilirajočem Ca^{2+} signalu konstanta trenja med aktinom in fosforiliranim miozinom ter hitrost gibanja aktinskega vlakna spreminjata vrednost maksimalne sile. Trenje med aktinom in nefosforiliranim miozinom pa spreminja hitrost razvoja sile (slika 16).

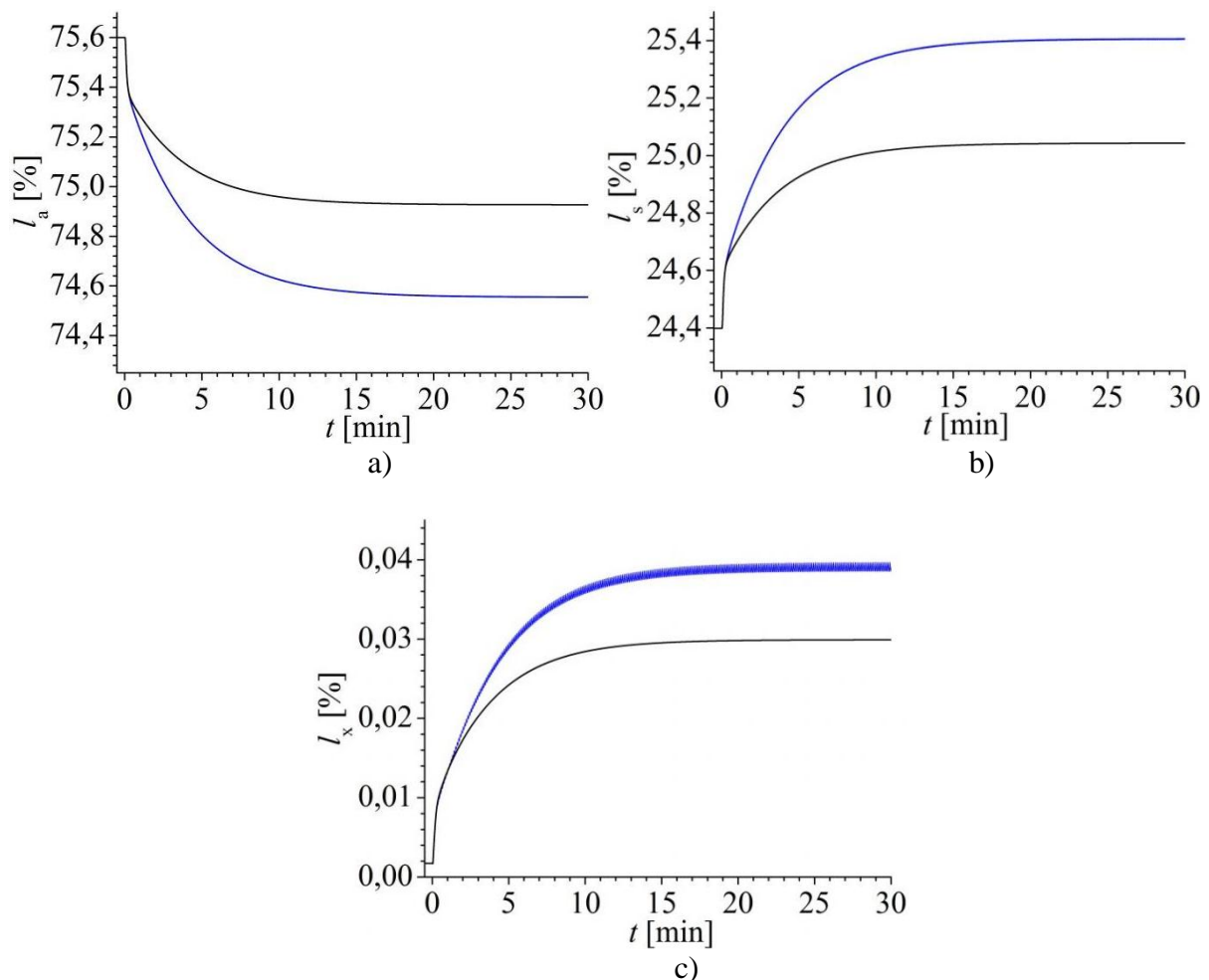


Slika 15. Izmerjene in modelne napovedi časovne (t) odvisnosti sil (F) v GMC za dvofazni (črna črta) in oscilirajoči (modra črta) Ca^{2+} signal. a) Izmerjena in b) modelno napovedana sila s samo 4-stanjskim modelom, c) izmerjena in d) modelno napovedana sila z nadgrajenim modelom. e) Aktivna sila se v celici razvije dokaj pozno v primerjavi s 4-stanjskim modelom, ki ne upošteva viskoelastičnih lastnosti in f) pasivna sila, ki se po zaključku prve, hitre faze več s časom ne spreminja. Pri skupni in pasivni sili so pri oscilirajočem Ca^{2+} signalu opazne oscilacije (odebeljena modra črta). Vrednosti parametrov so podane v tabeli 1.



Slika 16. Skupna sila (F_t) pri dvofaznem Ca^{2+} signalu. a) Vpliv trenja med aktinom in nefosforiliranim miozinom na hitrost v razvoju sile pri vrednostih $f_{AM} = 50,0 \mu\text{N ms } \mu\text{m}^{-1}$ (rdeča črta), $f_{AM} = 80,0 \mu\text{N ms } \mu\text{m}^{-1}$ (črna črta), $f_{AM} = 110,0 \mu\text{N ms } \mu\text{m}^{-1}$ (modra črta) ter b) vpliv trenja med aktinom in fosforiliranim miozinom pri vrednostih $f_{AMP} = 0,6 \mu\text{N ms } \mu\text{m}^{-1}$ (rdeča črta), $f_{AMP} = 0,5 \mu\text{N ms } \mu\text{m}^{-1}$ (črna črta), $f_{AMP} = 0,4 \mu\text{N ms } \mu\text{m}^{-1}$ (modra črta). c) Vpliv hitrosti gibanja aktinskega vlakna na vrednost maksimalne sile pri vrednostih $v_x = 6,0 \mu\text{m ms}^{-1}$ (rdeča črta), $v_x = 5,0 \mu\text{m ms}^{-1}$ (črna črta), $v_x = 4,0 \mu\text{m ms}^{-1}$ (modra črta). Ostale vrednosti parametrov so podane v tabeli 1.

Interakcijo med prečnimi mostički in aktinskim vlaknom ponazarja aktivni element, ki se pri kontrakciji skrči. Posledično se zaradi izometrične kontrakcije dolžini zaporedno vezane vzmeti aktivnemu elementu in Voigtovega elementa povečata. Dolžine dosežejo konstantno vrednost, ko celica razvije maksimalno silo. Pri oscilirajočem Ca^{2+} signalu je opazna večja skrčitev aktivnega elementa kot pri dvofaznem, kar povzroči večjo razvito silo v celici. Dolžini vzmeti in Voigtovega elementa se ustrezno povečata.



Slika 17. Časovna odvisnost dolžine elementov viskoelastičnega modela GMC pri izometrični kontrakciji. Skrčitev aktivnega elementa pri dvofaznem (črna črta) in oscilirajočem Ca^{2+} signalu (modra črta) (a) povzroči povečanje dolžine Voigtovega elementa (b) in zaporedno vezane vzmeti (c). Pri zaporedno vezani vzmeti so pri oscilirajočem Ca^{2+} signalu opazne oscilacije (odebeljena modra črta). Vrednosti parametrov so podane v tabeli 1.

5 ZAKLJUČEK

Namen diplomskega seminarja je bil ugotoviti ali viskoelastične lastnosti celice prispevajo k zakasnitvam v razvoju sile v gladki mišični celici. Model za od Ca^{2+} odvisen razvoj sile, ki upošteva podroben opis od Ca^{2+} in CaM odvisne aktivacije MLCK in regulacijo aktivnosti MLCP, smo nadgradili z elementi, ki opisujejo viskoelastične lastnosti gladke mišične celice. Modelne napovedi tako nadgrajenega modela so pokazale, da viskoelastične lastnosti celice bistveno vplivajo na hitrost in obliko v razvoju sile. Z viskoelastičnim modelom bi bilo moč celo deloma pojasniti zakasnitev v razvoju sile v drugi, počasnejši fazi, ki nastopi navadno nekaj 10 minut po začetku stimulacije celice. Viskoelastični model napove maksimum v razvoju sile po približno 15 minutah, kar se precej dobro ujema z meritvami. K zakasnitvi v razvoju sile bistveno prispeva aktivni in ne pasivni element viskoelastičnega modela, kar je deloma presenetljivo, saj sam aktivni del brez upoštevanja viskoelastičnih lastnosti celice dobro napove razvoj sile v prvi minuti. Modelne napovedi tudi pokažejo, da pri oscilirajočem Ca^{2+} signalu v drugi fazi celica razvije večjo maksimalno silo kot pri dvofaznem. Pri analizi treh parametrov viskoelastičnega modela smo ugotovili, da na višino razvite sile vplivata

hitrost drsenja in sila trenja med fosforiliranimi prečnimi mostički in aktinom, na hitrost razvoja sile pa vpliva trenje med aktinom in nefosforiliranimi prečnimi mostički.

V prihodnje bi bilo potrebno raziskati še vpliv drugih parametrov na magnitudo, obliko in hitrost razvoja sile, ter ugotoviti, ali se je moč s smiselnimi spremembami parametrov z rešitvami modela natančneje približati izmerjenim vrednostim sile. S tem bi ugotovili ali je viskoelastični model zadovoljiv pri opisu zakasnitve v razvoju sile, ali pa je potrebno upoštevati še kak drugi regulacijski mehanizem v celici, ki vpliva na to zakasnitev. Glede na trenutne modelne napovedi pa sklepamo, da je upoštevanje viskoelastičnih lastnosti pri razvoju sile v daljšem časovnem obdobju precej ključnega pomena, saj je samo z encimskimi reakcijami zelo težko razložiti spremembe na tako dolgi časovni skali.

LITERATURA IN VIRI

- [1] A. Fajmut, M. Brumen in S. Schuster, *Theoretical model of the interactions between Ca^{2+} , calmodulin and myosin light chain kinase*, FEBS Lett. **579** (20), 4361 (2005).
- [2] P. Mbikou, A. Fajmut, M. Brumen in E. Roux, *Theoretical and Experimental Investigation of Calcium-Contraction Coupling in Airway Smooth Muscle*, Cell. Biochem. Biophys. **46** (3), 233 (2006).
- [3] P. Mbikou, A. Fajmut, M. Brumen in E. Roux, *Contribution of Rho kinase to the early phase of the calcium-contraction coupling in airway smooth muscle*, Exp. Physiol. **96** (2), 240 (2011).
- [4] C. Hai in H. R. Kim, *An expanded latch-bridge model of protein kinase C-mediated smooth muscle contraction*, J. Appl. Physiol. **98** (4), 1356 (2005).
- [5] S. Gestrelus in P. Borgström, *A dynamic model of smooth muscle contraction*, Biophys. J. **50** (1), 157 (1986).
- [6] J. Yang, J. W. Clark Jr., R. M. Bryan in C. Robertson, *The myogenic response in isolated rat cerebrovascular arteries: smooth muscle cell model*, Med. Eng. Phys. **25** (8), 691 (2003).
- [7] B. H. Brown, R. H. Smallwood, D. C. Barber, P. V. Lawford in D. R. Hose, *Medical Physics and Biomedical Engineering* (Institute of Physics Publishing, London, 1999).
- [8] Z. Gao, *Mechanical Properties of Polymers and Rubbers* (Eastman Kodak Company, Rochester, 2006).
- [9] A. Dobovišek, A. Fajmut, M. Brumen, *Celica gladke mišice*. Pridobljeno 10. 4. 2012, iz http://lizika.pfmb.uni-mb.si/biofizika/projekt/gladke_misice/celica.htm.
- [10] A. Dobovišek, A. Fajmut, M. Brumen, *Fiziološki model krčenja gladkih mišic*. Pridobljeno 10. 4. 2012, iz http://lizika.pfmb.uni-mb.si/biofizika/projekt/gladke_misice/model.htm.
- [11] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts in J. D. Watson, *Molecular Biology of the Cell, 3th Edition* (Garland Science, New York, 1994).
- [12] M. Brumen, A. Fajmut, A. Dobovišek in E. Roux, *Mathematical Modelling of Ca^{2+} Oscillations in Airway Smooth Muscle Cells*, J. Biol. Phys. **31**, 515 (2005).
- [13] A. Fajmut, A. Dobovišek in M. Brumen, *Mathematical Modeling of the Relation between Myosin Phosphorylation and Stress Development in Smooth Muscles*, J. Chem. Inf. Model. **45** (6), 1610 (2005).
- [14] A. Fajmut, *Modeliranje biokemijskih procesov kot sestavnih elementov kalcijeve signalizacije v procesu skrčitve gladkih mišičnih celic dihalnih poti*, Doktorska disertacija (Pedagoška fakulteta, Maribor, 2006).