

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова

На правах рукописи



МЕТАЛЬНИКОВА Надежда Алексеевна

ЗАДАЧИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕХАНИКИ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ

Специальность 01.02.08 - биомеханика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2013

Работа выполнена на кафедре гидромеханики механико-математического факультета и в лаборатории биомеханики Института механики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: Цатурян А.К., доктор физико-математических наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник
НИИ механики МГУ имени М.В. Ломоносова

Официальные оппоненты: Полежаев А.А., доктор физико-математических наук, заведующий сектором ФГБУН
Физический институт РАН имени П.Н. Лебедева

Штейн А.А., кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник
НИИ механики МГУ имени М.В. Ломоносова

Ведущая организация: ФГБУН Институт иммунологии и физиологии
Уральского отделения РАН (ИИФ УрО РАН)

Защита состоится 18 октября 2013 г. в 15 часов на заседании диссертационного совета Д.501.001.89 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, Главное здание МГУ, аудитория 16-10.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке механико-математического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан “16” сентября 2013 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета Д.501.001.89,
доктор физико-математических наук



В.В. Измоленов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Исследование механизма мышечного сокращения является одной из актуальных и важных проблем современной биомеханики. Мышцы представляют собой специализированные органы, способные генерировать активные механические усилия и совершать значительную работу. Большую часть объема мышечной клетки занимают миофибриллы – цилиндрические структуры, образованные одинаковыми повторяющимися элементами – саркомерами. Саркомер ограничен с двух сторон плотными Z-дисками. К этим дискам с обеих сторон крепятся тонкие актиновые нити. В середине саркомера располагаются толстые нити, построенные преимущественно из другого сократительного белка, миозина. Укорочение происходит в результате перемещения (скольжения) нитей друг относительно друга (H.E. Huxley, J. Hanson, 1954; A.F. Huxley, R. Niedergerke, 1954; A.F. Huxley, 1957; H.E. Huxley 1969; A.F. Huxley, R.M. Simmons, 1971). Вследствие такого скольжения уменьшается длина каждого саркомера и всей мышцы в целом. Перемещение нитей друг относительно друга происходит за счет циклического замыкания и размыкания контактов между нитями актина и миозина. Эти контакты формируются головками миозина, которые расщепляют АТФ и преобразуют освободившуюся химическую энергию в механическую, генерируя тянущее усилие и совершая работу. Миозиновые головки тянут нити актина к центру саркомера, что приводит к сокращению мышцы.

Более поздние эксперименты показали, что нити актина и миозина растяжимы (H.E. Huxley и др., 1994; K. Wakabayashi и др., 1994). Более того, оказалось, что, кроме растяжения актиновых нитей, происходит и изменение угла закрутки актиновой спирали (J. Bordas и др., 1999; А.К. Цатурян и др., 2005). Такие изменения угла составляют доли градуса на каждый мономер актина. Однако, поскольку их число в нити велико – 360-370 штук, то даже малые изменения угла спирали могут привести к большим поворотам конца нити. Было обнаружено, что прочное связывание миозиновых головок с актином изменяет спиральный угол актина и растягивает актиновые нити (А.К. Цатурян и др., 2005). Активация тонких нитей ионами Ca^{2+} и пассивное растяжение расслабленных волокон в отсутствие Ca^{2+} также приводят к изменению угла закрутки актиновой спирали (J. Bordas и др., 1999; Y. Takezawa и др., 1998). Хотя некоторые из имеющихся математических моделей сокращения учитывают растяжимость актиновых и миозиновых нитей (Д.А. Шестаков, А.К. Цатурян, 1998), ни одна из них не принимает во внимание закручивание актина. Выяснение вопроса о том, какое влияние это может оказать на работу мышцы, остается открытым.

Регуляция сокращения поперечно-полосатых мышц осуществляется путем изменения концентрации ионов Ca^{2+} в мышечной клетке. Взаимодействуя с регуляторным белком тропонином (Тn) и связанным с ним тропомиозином (Тm), которые расположены на поверхности тонких актиновых нитей, Ca^{2+} вызывает сокращение мышечной клетки. Удаление Ca^{2+} приводит к расслаблению. Имеются экспериментальные данные, показывающие, что

эффективность кальциевой регуляции мышечного сокращения зависит от механических свойств Тm. В 2001 году D.A. Smith предложил рассматривать Тm как упругий стержень, который находится в поле электростатических сил и подвергается изгибу при присоединении тропонина или миозиновой головки к актину. Однако эта и последующие модели не учитывали спиральную форму тропомиозина и не позволяли объяснить характер зависимости активации мышечного сокращения от концентрации Ca^{2+} . Построение модели активации, учитывающей спиральную форму тропомиозина в недеформированном состоянии и влияние миозиновых головок на активацию сокращения, также актуально. Особенно важно это для сердечной мышцы, где Тn связывает только один ион кальция, но механическое напряжение резко возрастает в узком диапазоне изменения концентрации Ca^{2+} . Такую зависимость характеристик системы от управляющего параметра, в данном случае от концентрации Ca^{2+} , называют "кооперативной". Она обусловлена взаимодействием между соседними кальций-связывающими молекулами Тn, соединенными упругими молекулами Тm, и играет важную функциональную роль ("закон сердца" Франка-Старлинга).

Цель и задачи исследования. Целью работы была разработка и анализ математических моделей, учитывающих механические и геометрические характеристики сократительных и регуляторных белков мышц, которые не рассматривались в известных моделях. Были поставлены следующие задачи:

- Построение математической модели развития активного напряжения в саркомере скелетной мышцы с учетом растяжения и кручения спиралей актина, а также экспериментально обнаруженного влияния присоединенных миозиновых головок и растягивающей силы на кручение актина.
- Оценка механических параметров, определяющих кручение актина при его растяжении и крутящего момента, создаваемого миозиновыми головками, по опубликованным экспериментальным данным. Исследование влияния кручения актина на механику мышечного сокращения на примере экспериментов по релаксации напряжения после ступенчатой деформации.
- Построение механической модели активации сокращения мышц ионами кальция с учетом спиральной формы тропомиозина в недеформированном состоянии.
- Исследование влияния параметров модели на характер активации мышечного сокращения ионами кальция.

Научная новизна. В работе получены следующие новые результаты, выносимые на защиту:

- Предложена модель механики саркомера, впервые учитывающая кручение нитей актина. Решена задача о релаксации механических характеристик после ступенчатого удлинения или укорочения мышцы. Показано, что модель описывает экспериментально обнаруженную нелинейность релаксации напряжения в мышце – релаксация ускоряется при укорочении и замедляется при растяжении. При релаксации напряжения после растяжении

или укорочения мышечного волокна, угол закрутки актиновой спирали не возвращается к своему первоначальному значению, а продолжает изменяться в том же направлении, что и при мгновенно упругой реакции.

- Результаты исследования показывают, что кручение актиновых нитей, роль которого не учитывалась в предыдущих моделях мышцы, может оказаться существенным фактором, определяющим механику мышечного сокращения.
- Предложена механическая модель, которая рассматривает тропомиозиновую цепь как упругий стержень, имеющий в недеформированном состоянии форму спирали и способный скользить без удлинения по поверхности нити актина. Модель описывает существенные черты Ca^{2+} активации тонких нитей в сердечной мышце и объясняет высокую кооперативность связывания TnC ионами Ca^{2+} даже в отсутствие миозиновых головок.
- Модель также воспроизводит увеличение Ca -чувствительности тонких нитей при присоединении миозиновых головок без существенного увеличения кооперативности. Кроме того, модель объясняет результаты экспериментов, в которых некоторые молекулы TnC были заменены мутантными, нечувствительными к Ca^{2+} .

Достоверность результатов. Достоверность результатов, представленных в диссертации, обусловлена сравнением результатов моделирования с описанными в литературе экспериментальными данными, применением надежных методов численного моделирования с контролем точности и сравнением с ранее рассмотренными моделями.

Научная и практическая значимость. Научная значимость работы состоит в том, что в ней впервые построены и проанализированы математические модели, принимающие во внимание недавно установленные экспериментальные факты. Это касается учета деформируемости молекул сократительных и регуляторных белков мышцы, актина и тропомиозина, и особенностей геометрического строения сократительного аппарата мышц на молекулярном и мезоскопическом уровнях. Результаты численного моделирования показали, что эти свойства могут играть существенную роль в развитии активного напряжения в мышце и в регуляции этого процесса ионами кальция. Практическая значимость работы состоит в том, что с помощью предложенных в ней моделей можно анализировать механические аспекты некоторых врожденных заболеваний, в частности, кардиомиопатий, связанных с мутациями в молекулах сократительных и регуляторных белков сердечной мышцы.

Апробация работы. Результаты, полученные в работе, были доложены на следующих научных конференциях: Конференция-конкурс молодых ученых НИИ механики МГУ (2009, 2011, 2012); 10-ая Всероссийская конференция по биомеханике "Биомеханика 2010" (Саратов, 2010), Международная конференция "Биологическая подвижность: от фундаментальных исследований до нанотехнологий" (Пущино, 2010), Конференция МГУ "Ломоносовские чтения" (2012), Международная конференция "Биологическая подвижность:

фундаментальные и прикладные исследования" (Пушино, 2012), 41-ая Европейская мышечная конференция (Родос, Греция, 2012).

Результаты работы были также доложены и обсуждены на специализированных научных семинарах: семинар по биофизике под руководством проф. Роджера Кука (Roger Cooke, UCSF, Сан-Франциско, Калифорния, США, 2012), семинар по механике сплошных сред под руководством акад. РАН А.Г. Куликовского, проф. В.П. Карликова, члена-корр. РАН О.Э. Мельника (НИИ механики МГУ, Москва, 2012, 2013).

Публикации по теме диссертации. Основные результаты работы изложены в 10 научных публикациях, из которых 2 ([4], [10]) – статьи в журналах, входящих в Перечень ВАК на момент публикации, и 8 – тезисы докладов. В работах [4], [6], [8], [10], опубликованных в соавторстве с научным руководителем, автору принадлежит участие в постановке задачи, разработка алгоритмов решения, численное моделирование и анализ результатов. Все положения, выносимые на защиту, получены лично соискателем.

Структура работы. Диссертация содержит введение, четыре главы, заключение и список литературы. В работе имеется 49 рисунков, 2 таблицы и 133 библиографические ссылки. Общий объем диссертации составляет 115 страниц.

Во Введении обсуждается актуальность темы диссертации, основные цели и направления исследований, указана научная и практическая значимость работы.

В **Главе 1** рассмотрено строение, механические свойства и особенности функционирования и регуляции сердечной и скелетных мышц. На рис. 1 показано строение саркомера, толстых и тонких нитей. В ходе сокращения головки миозина, выступающие из толстой нити, взаимодействуют с актином и тянут нити актина к центру саркомера. Вследствие такого движения уменьшается длина каждого саркомера и всей мышцы в целом.

До недавнего времени полагали, что при таком механизме генерации движения, получившем название "скользящих нитей", длина самих нитей не меняется. Позднее выяснилось, что и актиновые, и миозиновые нити растяжимы, а актиновые нити, кроме того, могут закручиваться под влиянием различных факторов, таких как растягивающие напряжения, крутящие моменты, образование белковых комплексов. Хотя угол закрутки составляет доли градуса на мономер актина, закрутка всей нити, содержащей >300 мономеров, может быть существенной. Выделены факторы, влияющие на изменение закрутки нитей актина, и оценены величины некоторых параметров, влияющих на этот процесс.

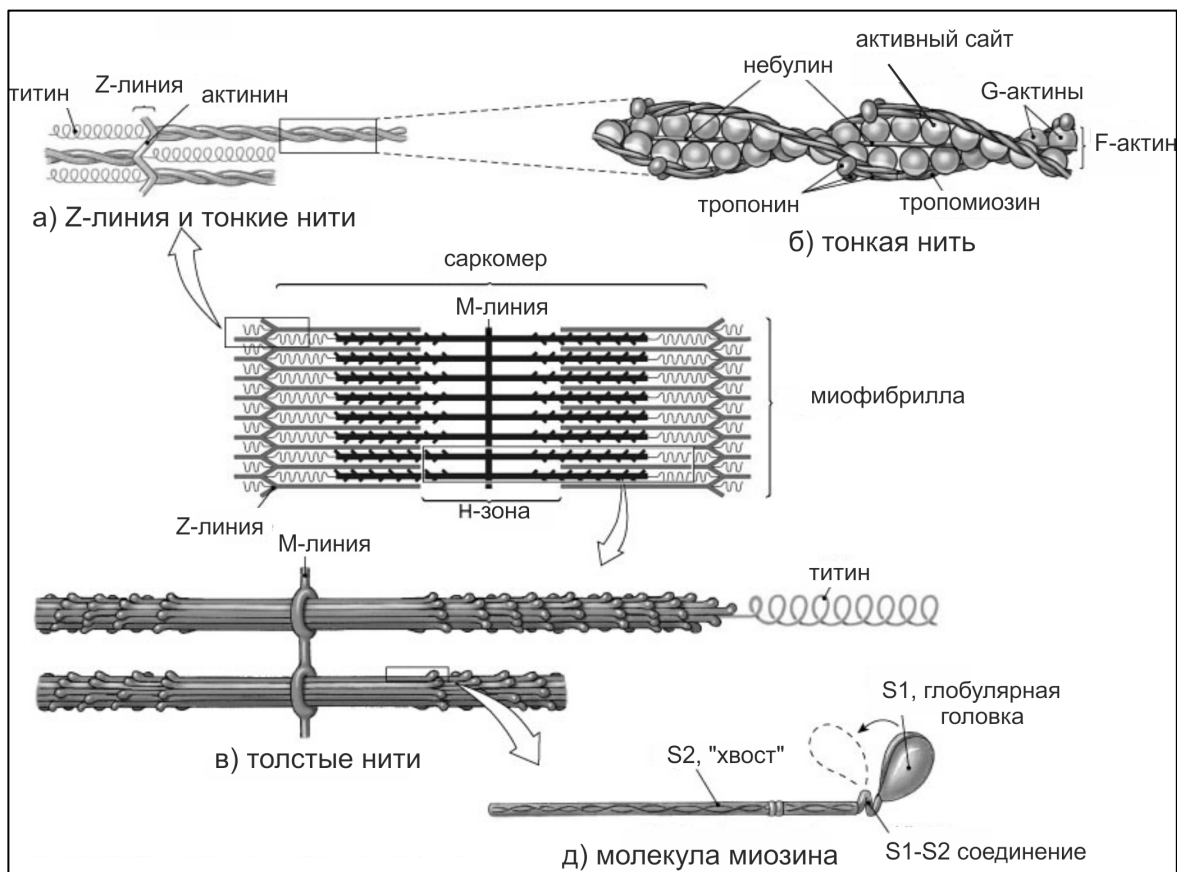


Рис. 1. Схема строения саркомера. Показана упаковка основных мышечных белков в тонкие (а, б) и толстые (в, д) нити. Число миозиновых молекул в ярусе толстой нити может меняться в зависимости от вида животного и типа мышц, в мышцах высших позвоночных оно равно трём.

Регуляция сокращения поперечно-полосатых мышц осуществляется путем изменения концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме. Взаимодействуя с регуляторными белками, тропонином (Тп) и тропомиозином (Тм), входящими в тонкие нити, Ca^{2+} вызывает сокращение мышечной клетки. Удаление Ca^{2+} приводит к расслаблению. Молекула Тм образована двумя перекрученными α -спиралями и имеет форму длинной спирали. Две таких молекулы располагаются напротив друг друга в желобах длинной актиновой спирали (рис. 2). Соседние молекулы Тм соединяются друг с другом "голова к хвосту" и образуют непрерывный изогнутый стержень длиной около 1 мкм, который тянется вдоль всей актиновой нити.

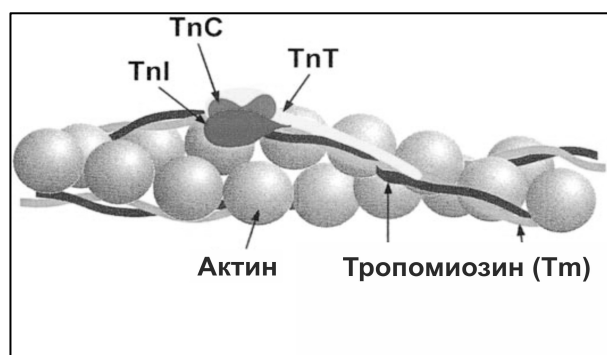


Рис. 2. Белки тонкой нити: актин, тропомиозин (Тм), тропонин (Тп).

С каждой молекулой Tm связана молекула Tn, состоящая из трех субъединиц – TnC, TnI и TnT. В отсутствие Ca^{2+} подвижный участок TnI присоединяется к актину и сдвигает весь Tn-Tm комплекс так, что он блокирует участки связывания миозиновых головок на актине. При связывании Ca^{2+} с TnC мобильный участок TnI отсоединяется от актина и присоединяется к TnC, а весь Tm-Tn комплекс поворачивается относительно оси актиновой нити и освобождает её участок для присоединения миозиновых головок, т.е. переводит систему из заблокированного состояния (B) в закрытое (C). Наконец, присоединение миозиновой головки к актину вызывает дальнейший сдвиг Tm спирали и переводит систему в открытое состояние (O).

Зависимость вероятности образования комплексов CaTnC, V , от концентрации Ca^{2+} , C , хорошо описывается формулой Хилла:

$$V = \frac{[C]^n}{[C]_{50}^n + [C]^n} \quad (1)$$

с показателем кооперативности n (его также называют коэффициентом Хилла). Здесь C_{50} – концентрация, при которой половина молекул TnC связана с Ca^{2+} . В TnC сердечной мышцы имеется лишь один участок связывания с ионом Ca^{2+} . Несмотря на это, $n \geq 2.5$. Причины такой кооперативности (независимое связывание одного иона Ca^{2+} с каждой молекулой TnC соответствует $n = 1$), а также зависимости параметров, входящих в формулу (1), от механических величин представляют предмет интенсивной дискуссии.

В обзоре также рассмотрены современные данные о механических свойствах всех белковых компонент саркомера: актина, миозина, тропомиозина и др. Также описаны современные представления о молекулярных механизмах сокращения мышц и регуляции этого процесса. Особенное внимание уделено регуляции сокращения сердечной мышцы и процессам, лежащим в основе так называемого "закона сердца Франка-Старлинга". В последнем разделе главы 1 описаны существующие математические модели сокращения мышц и его регуляции ионами Ca^{2+} .

Из обзора следует, что (i) существующие модели механики саркомера не учитывают закручивание актина под действием различных факторов, которое может оказывать существенное влияние на механику мышечного сокращения; (ii) существующие модели кальциевой регуляции не учитывают реальную структуру спирали тропомиозина, которая может являться одним из ключевых факторов регуляции мышечного сокращения.

Глава 2 посвящена численному исследованию влияния закручивания и растяжения белковых нитей саркомера на характеристики сокращения мышц. Выведены основные уравнения, описывающие изменение угла закрутки актиновой нити $\phi(s, t)$, перемещение нитей актина $u_a(s, t)$ и миозина $u_m(s, t)$, удлинения саркомера $y(t)$ и концентрации силогенерирующих актин-миозиновых мостиков $n(s, t)$ в мышечном волокне в зависимости от времени t и осевой координаты s (рис. 3). В **разделе 2.1** дана постановка задачи о релаксации напряжения и других механических характеристик в ответ на

ступенчатую деформацию (рис. 3А), а в **разделах 2.2, 2.3** – приведены результаты ее численного решения.

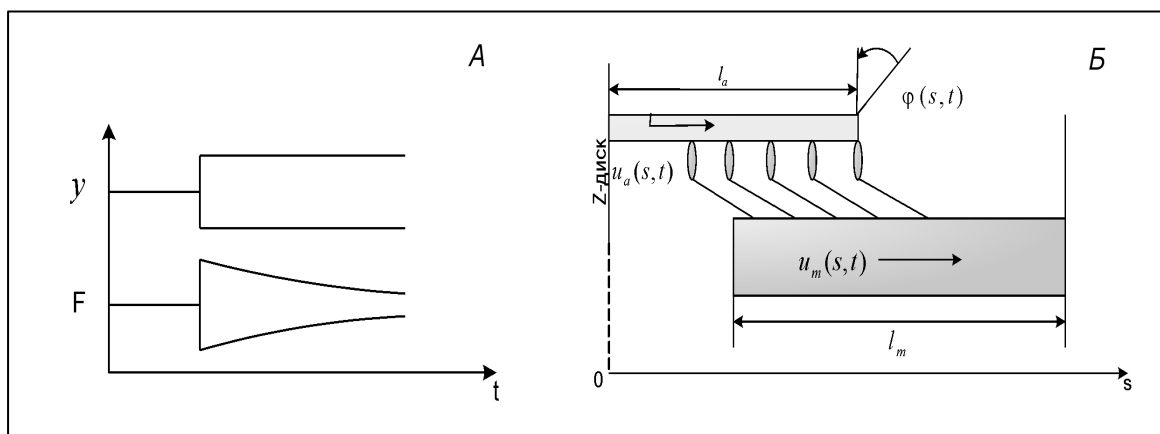


Рис. 3. А: изменение удлинения (y) и ответ развиваемого напряжения (F) на ступенчатую деформации мышечного волокна. Б: схема строения полусаркомера мышцы и обозначения используемых в модели величин.

Система уравнений, описывающих изменения угла ϕ , относительного перемещения нитей $U = u_a - u_m$ и концентрации мостиков n , имеет следующий вид:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{c_a + c_m} \cdot \frac{\partial^2 U(s, t)}{\partial s^2} - p n_0 U(s, t) = f_0 n_0 n(s, t) - \frac{\delta n_0}{c_a + c_m} \cdot \frac{\partial n(s, t)}{\partial s} - p n_0 U_0(s) \\ \frac{\partial n(s, t)}{\partial t} = k_+(1 - n(s, t)) - k_- n(s, t) \\ \frac{\partial^2 \phi(s, t)}{\partial s^2} - \frac{n_0 \chi}{L} \phi(s, t) = \\ = \left(-\frac{\gamma \delta n_0}{c_a + c_m} - \beta n_0 \right) \cdot \frac{\partial n(s, t)}{\partial s} - \frac{\gamma}{c_a + c_m} \cdot \frac{\partial^2 U(s, t)}{\partial s^2} - \frac{n_0 \chi}{L} \phi_0(s) - \frac{\Omega_0 n_0 n(s, t)}{L} \end{array} \right. \quad (2)$$

Здесь c_a , c_m – коэффициенты продольной податливости (растяжимости) актиновых и миозиновых нитей, кинетические константы $k_+(U - U_0) = k_-(U - U_0) \eta e^{\frac{-k(U - U_0)h}{k_B T}}$ и $k_-(U - U_0) = e^{\frac{\lambda k(U - U_0)h}{k_B T}}$, описывают структурные изменения в актин-миозиновых мостиках в зависимости от относительного перемещения нитей (A.F. Huxley, R.M. Simmons, 1971); k – жесткость одного миозинового мостика; h – "шаг", т.е. осевое перемещение при переходе миозинового мостика из состояния, слабо присоединенного к актину, в прочно связанное силогенерирующее состояние; λ – константа, описывающая зависимость скорости отсоединения от относительного перемещения; η – константа скорости перехода из "слабого", "нетянувшего" в прочное, тянущее состояние в изометрическом сокращении; k_B , T – постоянная Больцмана и абсолютная температура; p – погонная жесткость присоединенных к актину миозиновых мостиков на единицу длины при максимально возможном их числе; n_0 – погонная концентрация присоединенных мостиков. Параметры γ , L ,

$\delta, \beta, \chi, \Omega_0$ характеризуют раскрутку нити актина под действием растягивающей силы, жесткость актиновой нити на кручение, ее растяжимость и закрутку под действием присоединенных миозиновых мостиков, жесткость мостиков на кручение, а также крутящий момент, создаваемый этими мостиками в изометрических условиях, соответственно. Выражения для полного механического напряжения, развиваемого мышечным волокном в расчете на одну актиновую нить, F , и удлинения волокна, y , имеют вид:

$$F(t) = \int_{s_1}^{s_2} f(t) ds, f = phn(s, t)n_0 + pn_0(U_m(s, t) - U_m^0(s) - U_a(s, t) + U_a^0(s)),$$

$$y = Fc_a s_1 + Fc_m(l - s_2) + c_a \int_{s_1}^{s_2} \sigma_a(s, t) ds + \delta n_0 \int_{s_1}^{s_2} n(s, t) ds + u|_{s_2}. \quad (3)$$

Граничные условия для угла: $\phi(0) = 0, M(s_2) = 0$, $\phi|_{s_1-0} = \phi|_{s_1+0}$, $M|_{s_1-0} = M|_{s_1+0}$, где M – момент внутренних сил, $\frac{dM}{ds} = -\Omega$, а Ω – момент сил, создаваемый миозиновыми головками. Граничные условия для перемещения имеют вид $\frac{\partial U}{\partial S}|_{s_1} = -c_a F|_{s_1} - \delta n_0 n|_{s_1}$, $\frac{\partial U}{\partial S}|_{s_2} = c_m F|_{s_2} - \delta n_0 n|_{s_2}$, $U(0) = 0$ и содержат функционал от искомого решения, F . В граничные условия также входят распределения перемещений нитей u_{a0}, u_{m0} и развиваемое напряжение F_0 в ходе стационарного сокращения при постоянной длине, которые находятся из аналитического решения соответствующей задачи. Распределения искомым величин в ходе мгновенно-упругой реакции в предположении о том, что длительность деформирования много меньше характерного времени структурных изменений в актин-миозиновых мостиках k_-^{-1} были найдены аналитически. В этом случае система уравнений (2) сводится к системе обыкновенных дифференциальных уравнений. Распределения, полученные в процессе мгновенно-упругой реакции, были использованы как начальные условия для моделирования процесса релаксации. После быстрой ступенчатой деформации сразу после окончания мгновенно упругой реакции, напряжение в мышечном волокне релаксирует на миллисекундной временной шкале (А.Ф. Нукли, Р.М. Симмонс, 1971). При этом изменения перемещения и угла зависят не только от пространственной координаты, но и от времени. Кроме того, в зависимости от времени изменяется распределение величины n – концентрации "тянущих" миозиновых мостиков, от которой зависят и растяжение, и кручение нитей. Задача была решена численно методом параметрической прогонки с итерациями. Из сравнения с опубликованными экспериментальными данными полученных решений задач об установившемся сокращении и мгновенно-упругой реакции была проведена оценка параметров, которые не были измерены экспериментально: $\gamma > 0$ – коэффициент, описывающий раскрутку нити актина под действием растягивающей силы; Ω_0 – "погонного" крутящего момента, создаваемого миозиновыми головками в изометрическом сокращении. Затем, используя полученные оценки этих параметров, были проведены численные расчеты для процесса релаксации мышечного волокна. Примеры моделирования ответов на растяжение мышцы

из состояния изометрического сокращения с $y_0 = 1.62$ нм до $y = 4$ нм и её укорочения до $y = -3$ нм показаны на рис. 4, где представлен временной ход изменения напряжения, развиваемого волокном, и среднего значения концентрации тянущих мостиков n .

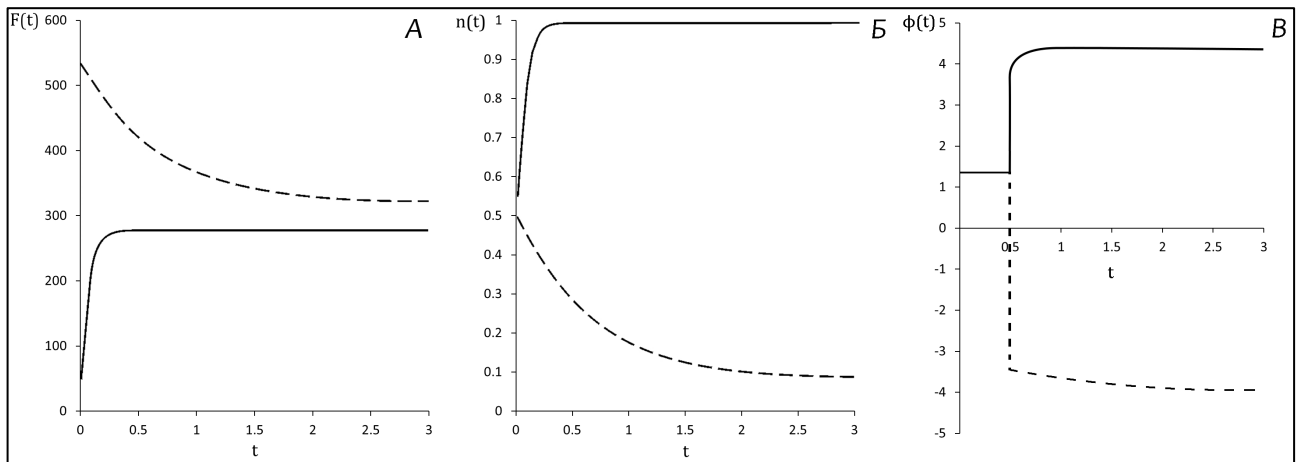


Рис. 4. Изменение силы F , развиваемой волокном в пересчете на одну актиновую нить, (А) и средней концентрации мостиков n (Б) в ответ на ступенчатую деформацию. Пунктирные кривые соответствуют изменению силы при удлинении волокна до $y = 4$ нм; сплошные – укорочению до $y = -3$ нм. В: изменение угла поворота конца актиновой нити

Из графиков видно, что модель описывает экспериментально обнаруженную нелинейность релаксации напряжения в мышце – релаксация ускоряется при укорочении и замедляется при растяжении (**раздел 2.4**). Также оказалось, что при релаксации напряжения после растяжения или укорочения мышечного волокна угол закрутки актиновой спирали не возвращается к своему исходному значению, а продолжает изменяться в том же направлении, что и при мгновенно упругой реакции. Изменение угла поворота конца актиновой нити превышает 180° (рис. 4В).

Глава 3 посвящена построению и исследованию механической модели регуляции мышечного сокращения ионами кальция. В **разделе 3.1** рассмотрена постановка задачи, в которой тропомиозиновая нить представлена как упругий стержень, имеющий в недеформированном состоянии форму спирали. Тропомиозин может скользить по цилиндрической поверхности актина в поле силы, обусловленной электростатическим взаимодействием заряженных аминокислот на поверхности актиновой нити и Тm и пропорциональной угловому перемещению.

Перемещение точки тропомиозиновой спирали имеет осевую, $u(z)$, и угловую, $\varphi(z)$, компоненты, зависящие от координаты z , измеряемой вдоль оси тонкой нити (рис. 5). Предполагая, что тропомиозин нерастяжим, а его перемещения малы, получено соотношение, связывающее между собой радиальную и осевую компоненты вектора перемещения $u'(z) + a^2\psi\varphi'(z) = 0$. Чтобы упростить дальнейшие выкладки, вводится параметр $g_0 = 1 + a^2\psi^2$, где

a – радиус цилиндрической поверхности по которой перемещается осевая линия тропомиозинового стержня, а ψ – параметр спирали, определяемый так, что её полному обороту соответствует осевое смещение $2\pi/\psi$ (рис. 5).

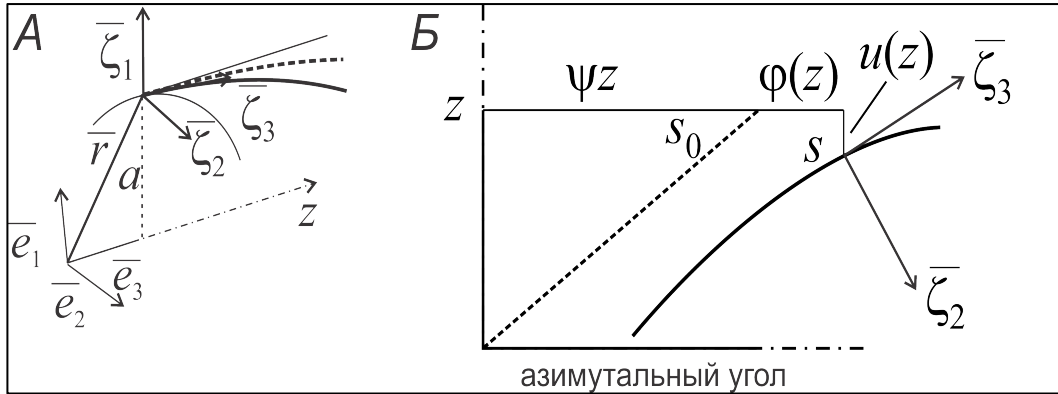


Рис. 5. Модель Тм спирали, показаны базисные вектора лабораторной (\bar{e}_i) и сопутствующей ($\bar{\zeta}_i$) систем координат. А: актиновый цилиндр с Тм спиралью на его поверхности. Б: развертка поверхности цилиндра.

В модели предполагалось, что изгибная жесткость Тм не зависит от направления изгиба, т.е. модули изгибной жесткости одинаковы $K_1=K_2=K$. Для коротковолновых изгибов такое предположение неверно, однако в данной задаче оно, по-видимому, оправдано, так как полупериод закрутки двух альфа-спиралей в суперспираль Тм составляет 5.5 нм, что много меньше характерного радиуса изгиба всего тропомиозинового стержня (≈ 20 нм). Поэтому можно считать, что энергия изгиба-кручения Тм принимает вид: $e = 0.5(K(\Delta\omega_1^2 + \Delta\omega_2^2) + G\Delta\omega_3^2)$, где $\Delta\omega_1, \Delta\omega_2, \Delta\omega_3$ – изменения компонент вектора кривизны-кручения Тм в сопутствующей системе координат. Изгибная жесткость Тм K много больше его жесткости при кручении G в силу особенностей молекулярной структуры Тм. В положении равновесия (С-состояние) Тм удерживается электростатической силой $-\alpha\varphi$, которая определяется ионными и электростатическими взаимодействиями, и пропорциональна смещению. Экспериментально было показано, что при присоединении миозиновой головки к актину Тм, смещаясь, скользит по поверхности актина, не прокатываясь. Таким образом, упругая энергия E деформированного Тм определяется энергией изгиба и работой сил актин-Тм взаимодействия и для участка стержня между точками b и c равна:

$$E = \frac{1}{2} \int_b^c \left(\alpha(\varphi(z))^2 + K \left(\left(\frac{a\varphi''(z)}{\sqrt{g_0}} \right)^2 + (2a\psi\varphi'(z))^2 \right) \right) dz. \quad (4)$$

Была введена безразмерная осевая координата: $x = z/\xi$, где $\xi = (4Ka^2/\alpha\sqrt{g_0})^{1/4}$ – характерная длина, и интеграл энергии (4) преобразован в безразмерный вид, а из вариационного принципа получено уравнение равновесия Тм стержня как условие минимума энергии:

$$\varphi^{IV}(x) - 4\beta\varphi''(x) + 4\varphi(x) = 0, \quad (5)$$

где $\beta = 2\alpha\psi^2\sqrt{Kg_0/\alpha}$ – безразмерное натяжение нити.

Присоединение TnI или миозиновой головки к актину фиксирует точки тропомиозинового стержня на актине, задавая определенные значения угла φ , равные φ_T или $\varphi_M = -\chi\varphi_T$, соответственно, где $\chi > 0$, так как тропонин и миозин смещают тропомиозин в противоположных направлениях. Предполагается, что фиксация Tm не создает изгибающий момент, поэтому в точках фиксации и само угловое перемещение, и его первые две производные непрерывны. Тропониновые комплексы расположены на расстоянии 38.5 нм друг от друга вдоль оси тонкой нити и, соответственно, могут присоединять тропомиозиновый стержень к каждому седьмому мономеру актима, смещая тропомиозин в противоположную сторону. Миозиновая головка может присоединиться к любому актиновому мономеру, кроме тех, к которым могут присоединиться подвижные участки TnI. На тонкой нити длиной 1.05 мкм имеются 27 Tn комплексов, в промежутках между которыми находятся 156 актиновых мономеров, доступных для миозиновых головок, итого $183=27+6\times 26$ потенциальных участков закрепления стержня. Присоединение TnC или миозиновой головки к актину или отсоединение от него представляют собой стохастический процесс, в котором вероятности присоединения и отсоединения зависят от концентрации ионов Ca^{2+} , а также от изменения упругой энергии Tm стержня, которое сопровождает такое присоединение или отсоединение. Решение уравнения (5) для произвольного числа точек закрепления требует достаточно большого объема вычислений. Поэтому мы использовали трехточечное приближение (**раздел 3.2**), считая, что изменение энергии деформированной спирали, связанное с ее присоединением или отсоединением от актима, такое же, как для бесконечно длинной спирали, закрепленной в точках, совпадающих с левой и правой ближайшими точками закрепления. Были получены решения уравнения (5) для бесконечно длинной тропомиозиновой спирали, закрепленной в одной, двух, трех или четырёх точках. Предварительные расчёты показали, что трехточечная аппроксимация приближает решение намного лучше, чем двухточечная, использовавшаяся в работах (D.A. Smith и др., 2001, 2003, 2011), а учёт еще одной, четвертой внешней точки крепления, наоборот, практически не влияет на результат, существенно увеличивая время вычислений. Энергия бесконечно длинного стержня, закрепленного TnI в единственной точке при $\varphi = \varphi_T$, равна $E_T = \alpha\xi\varphi_T^2\sqrt{g_0(1+\beta)}$. Поскольку присоединение и отсоединение Tm от актима происходят в результате химических реакций, в основе которых лежит броуновское движение молекул, мы ввели еще один безразмерный параметр $\gamma = \alpha\xi\varphi_T^2\sqrt{g_0(1+\beta)}/k_B T$ – отношение упругой энергии к тепловой. **Раздел 3.3** посвящен определению условий на концах стержня, то есть определению состояний 1-го и 183-го участка закрепления Tm, а также введению корректировочной функции, которая позволила более точно вычислять изменения энергии Tm стержня конечной длины при отсоединении и присоединении крайних элементов.

В разделе 3.4 в соответствии с описанным ранее механизмом взаимодействия субъединиц Tn, Ca^{2+} и актина рассмотрена следующая кинетическая схема (рис. 6).

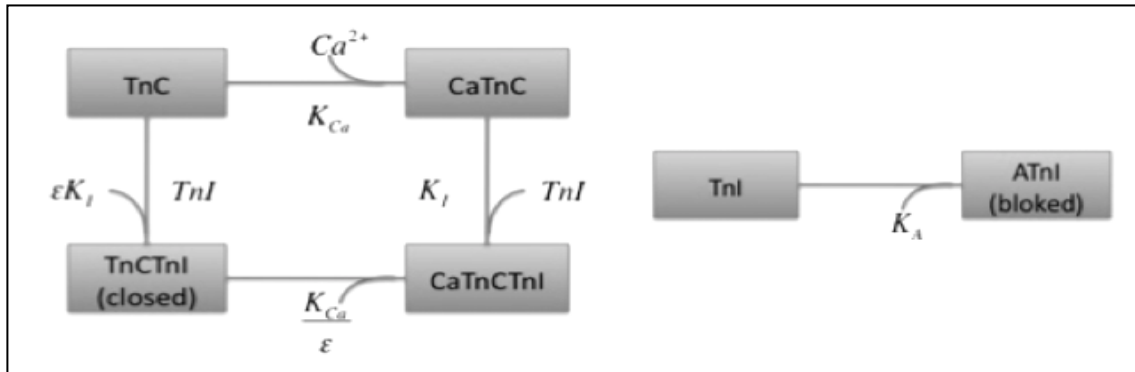


Рис. 6. Кинетическая схема взаимодействия субъединиц тропонина, Ca^{2+} и актина, K_{Ca} , K_I , K_A – константы равновесия соответствующих реакций.

Здесь K_{Ca} , K_I и K_A – константы равновесия присоединения Ca^{2+} к TnC, переключаящего сегмента TnI к TnC и присоединения ингибиторного домена TnI к актину, соответственно, а $0 < \epsilon < 1$ параметр, характеризующий связывание TnI с TnC в отсутствие Ca^{2+} . Схема предполагает, что TnC может связать только один ион Ca^{2+} , как в сердечной мышце, и такое связывание способствует отсоединению TnI от актина и присоединению к TnC. Обозначим $C = K_{Ca}[Ca^{2+}]$, y , z – безразмерную концентрацию Ca^{2+} и вероятности пребывания TnC и ингибирующего участка TnI в свободном состоянии, соответственно. Тогда для стационарного процесса вероятности пребывания компонент тропонинового комплекса в состояниях CaTnC, CaTnCTnI, TnCTnI равны Cy , $CyzK_I$ и $yezK_I$, соответственно, при условии, что ингибирующий участок TnI не присоединен к актину. Вероятность присоединения TnI к актину равна при этом zK_A , а y и z удовлетворяют условиям:

$$\begin{cases} y + yC + yCzK_I + yezK_I = 1, \\ z + zK_A + yezK_I + yCzK_I = 1. \end{cases} \quad (6)$$

Система (6) представляет собой уравнения химической кинетики (т.н. закон действующих масс), которые записаны не для концентраций веществ, а для вероятностей пребывания молекул в том или ином состоянии.

В разделе 3.5 рассмотрен метод Монте-Карло для численного решения задачи определения среднестатистических характеристик системы в зависимости от концентрации ионов кальция. Активация сокращения характеризуется вероятностями пребывания TnC и TnI в свободном и связанном состоянии, а также вероятностью связывания миозиновых головок с актином. Изменения состояния системы имеют стохастический характер и при заданной величине безразмерной концентрации кальция C , определяются ее текущим состоянием, т.е. представляют собой стационарный марковский процесс. Поскольку даже в одном саркомере имеются тысячи тонких нитей, все экспериментально наблюдаемые характеристики являются средними по

ансамблю. Скорости присоединения и отсоединения от актина TnI или миозиновых головок определяются изменением упругой энергии Tm стержня вследствие такого перехода. Было сделано предположение, что связывание ингибирующего участка TnI с актином и присоединение миозиновой головки – обратимые стохастические процессы, такие, что отношение скоростей прямого и обратного переходов для TnI и миозина определяются соотношениями:

$$p_j = k_{T+}/k_{T-} = zK_A \exp(-\gamma(E_3 - E_2)), \quad p_i = k_{M+}/k_{M-} = \rho \exp(-\gamma(E_3 - E_2)),$$

где индексы "+" и "-" соответствуют присоединению и отсоединению, а T и M – TnI и миозину (рис. 7), соответственно, ρ – доступность миозиновых головок для связывания с актином, E_3, E_2 – безразмерные (нормированные на E_T) упругие энергии тропомиозинового стержня предварительно рассчитанные по формуле (4) для всех возможных конфигураций, т.е. расстояний между двумя или тремя точками фиксации Tm стержня на актине молекулами TnI или миозиновыми головками.

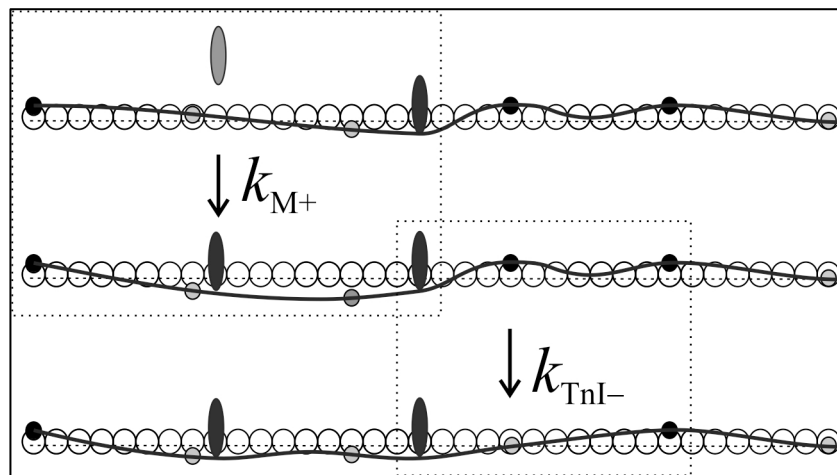


Рис. 7. Схематическое изображение фрагмента Tm стержня (черные линии). Тропониновые комплексы показаны кругами (черные соответствуют присоединенным TnI, серые не присоединенным TnI). Аналогично, присоединенные миозиновые головки показаны черными эллипсами, не присоединенные – серыми. Левый пунктирный прямоугольник показывает сегмент тонкой нити до и после присоединения миозиновой головки к актину (константа скорости k_{M+}). Правый пунктирный прямоугольник показывает другой сегмент до и после отсоединения молекулы TnI от актина (константа скорости k_{TnI-}).

Для определения средних стационарных характеристик системы, т.е. средней доли актин-связанных молекул TnI, доли комплексов CaTnC и вероятности присоединения к актину миозиновых головок в зависимости от концентрации кальция C использован метод Монте-Карло. Основная проблема заключалась в большой размерности фазового пространства 2^{183} (183 элемента, каждый из которых может находиться в любом из двух состояний – присоединенном или отсоединенном). Для определения характеристик системы был применен видоизмененный метод Метрополиса-Гастингса, который позволил добиться эффективной сходимости средних характеристик при относительно небольшом числе псевдослучайных испытаний. Основная идея

модификации состояла в алгоритме выбора элемента для очередной проверки на присоединение или отсоединение: наиболее часто проверялись те элементы, для которых вероятность изменения состояния наибольшая.

Каждому элементу была поставлена в соответствие вероятность присоединения $\sqrt[3]{p_i}$, если он был отсоединен, и вероятность отсоединения $(p_i)^{-1/3}$, если он был присоединен к актину. С учётом этих вероятностей производился псевдослучайный выбор элемента. После того, как элемент был выбран, решался вопрос о его переходе в новое состояние: вероятность присоединения вычислялась по формуле $\min[1, (p_i)^{1/3}]$, а отсоединения – $\min[1, (p_i)^{-1/3}]$. В результате такого правила выбора вероятность присоединения элемента равнялась $\sqrt[3]{p_i} \min[1; \sqrt[3]{p_i}]$, а отсоединения – $1/\sqrt[3]{p_i} \min[1; 1/\sqrt[3]{p_i}]$, соответственно. Таким образом, отношение вероятностей прямого и обратного перехода сохранялось равным p_i , как и должно быть.

В результате удовлетворительная сходимость средних характеристик системы была достигнута после 10^6 - 10^7 испытаний, что на много порядков меньше размерности системы. В **разделе 3.6** по данным опубликованных экспериментов произведена оценка параметров, необходимых для моделирования кальциевой регуляции.

В **Главе 4** представлены результаты моделирования кальциевой активации тонких нитей в отсутствие (**раздел 4.1**) и при наличии миозиновых головок (**раздел 4.2**), исследовано влияние параметров задачи на кальциевые кривые и на кажущийся коэффициент Хилла – **раздел 4.3**. Базовый набор параметров был следующим: $K_I = 1000$, $K_A = 200$, $\gamma = 4$, $\lambda = 2$ ($\xi = 19.25$ нм), $\beta = 3.5$, $\chi = 0.4$, $\varepsilon = 0$. В отсутствие миозиновых головок при значениях γ меньше 3.5, получить достаточно высокие значения коэффициента Хилла не удалось. Это означает, что высокая кооперативность активации тонких нитей требует, чтобы механическая энергия, связанная с присоединением TnI к актину, была существенно больше тепловой. При больших значениях параметра γ кальциевые кривые могут быть круче, чем представленные в работе. Расчётные кривые при $\lambda = 2$ ($\xi = 19.25$ нм), $\beta = 3.5$ показывают достаточно резкие и высококооперативные зависимости активации от концентрации кальция ($n \approx 2.5$) даже при отсутствии миозиновых головок, что согласуется с данными (Y.B Sun и M. Irving, 2009, 2010), которые показали, что тонкие нити активируются кооперативно, даже если присоединение миозиновых головок заблокировано. Увеличение параметра β приводит к снижению Ca-чувствительности и к увеличению кооперативности: кажущийся коэффициент Хилла, n , увеличивается (рис. 8А). При постоянной характерной длине Tm стержня цепи (постоянная изгибная жесткость и $\alpha = \text{const}$) β зависит от параметра спирали актина ψ . В модели, описанной ранее D.A. Smith и коллегами (2001, 2003, 2011), была использована теория прямолинейного упруго стержня, т.е. $\beta = 0$. Увеличение параметра β до значения, соответствующего реальной спиральной структуре актина, приводит к более высокой кооперативности Ca-активации тонких нитей, соответствующей

экспериментальным данным ($n \approx 2.5$). Изменение λ характеризует изменения в изгибной жесткости Tm , K , или параметра α , который удерживает Tm в S -состоянии. Увеличение λ приводит к сдвигу кривой активации влево, т.е. увеличивается Ca^{2+} -чувствительность и незначительно уменьшается кооперативность (рис. 8Б). Так как λ является отношением осевого расстояние между соседними молекулами тропонина (38,5 нм) к характерной длине Tm цепи, оно увеличивается, если изгибная жесткость Tm уменьшается. С другой стороны, увеличение коэффициента α , который характеризует актин-миозиновые электростатические силы взаимодействия, удерживающие Tm в S -состоянии, приводит к увеличению λ .

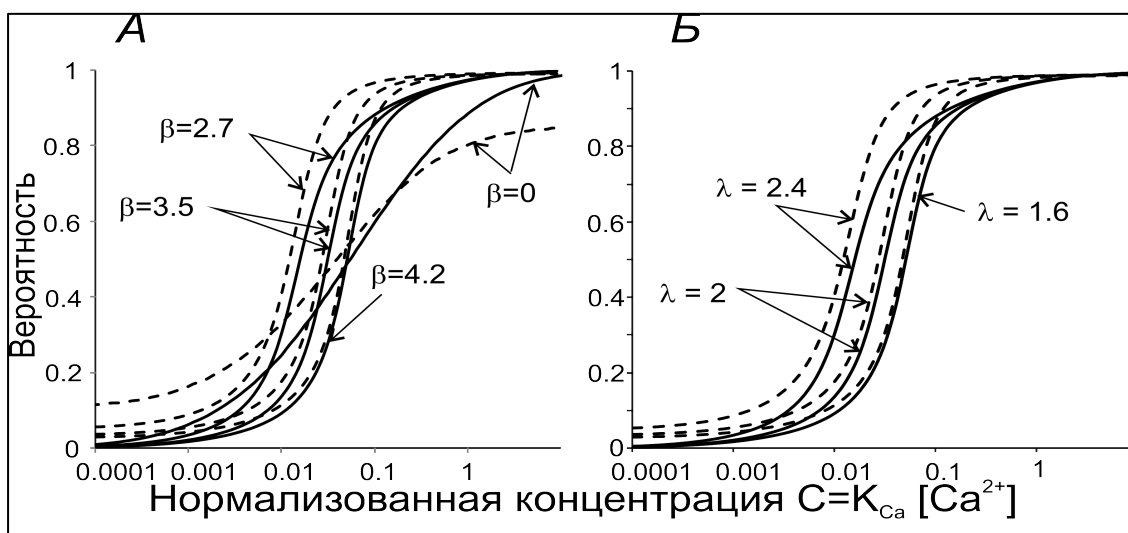


Рис. 8. Расчетные зависимости активации тонких нитей от концентрации кальция в отсутствие миозиновых головок для различных значений параметров β и λ . А: Расчет для $\lambda = 2$, значения β , приведены на графике. Б: расчеты для значений $\beta = 3.5$, величины λ показаны на графике. Средние значения доли несвязанных с актином молекул TnI показаны пунктирными линиями, а связанных с ионами Ca^{2+} молекул TnC – сплошными.

При присоединении миозиновых головок к актину расчетные кривые кальциевой активации смещаются влево, показывая повышенную чувствительность без существенного увеличения наклона кривой (рис. 9). Причина этого состоит в том, что при прочном связывании миозиновой головки с актином Tm стержень сдвигается и облегчает отсоединение соседних молекул TnI от актина. В работах Y.B. Sun и M.Irving (2009, 2010) была измерена относительная доля молекул TnC, связанных с Ca^{2+} в состоянии ригора, в котором все миозиновые головки прочно соединены с актином, а Tm – неподвижен, и обнаружено, что $[Ca^{2+}]_{50}$ в этом случае гораздо ниже, чем в присутствии АТФ. Кооперативность при этом также отсутствовала, $n = 1$. Для моделирования состояния ригора в настоящей работе задавали $K_A = 0$, чтобы отключить возможность связывания TnI с актином. Описанные выше свойства кальциевой активации в состоянии ригора хорошо описываются моделью (рис. 9А).

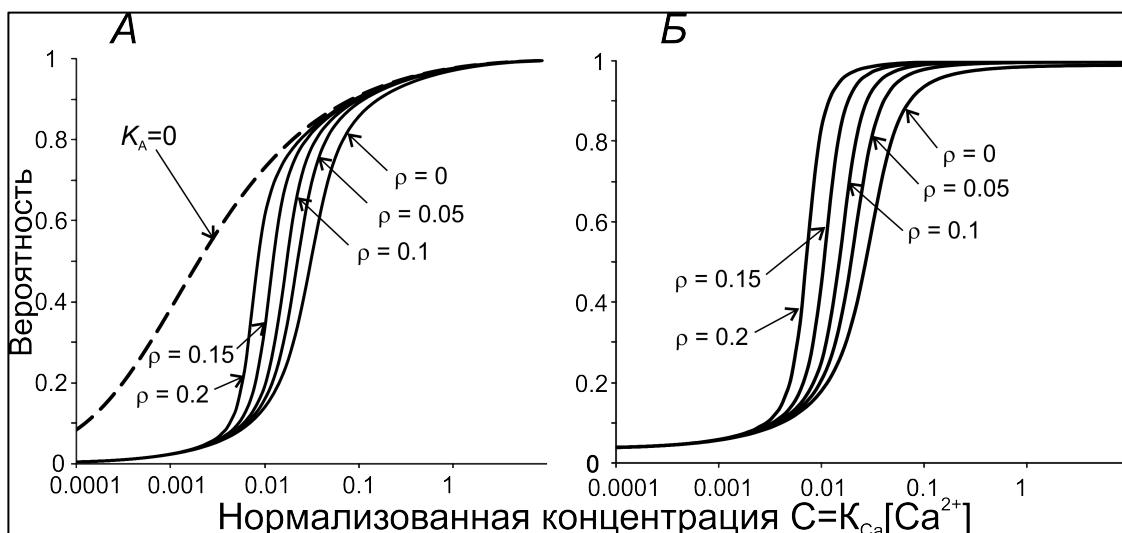


Рис. 9. Моделирование влияния головок миозина на кривые Ca-активации. А: средняя доля TnC, связанных с ионами Ca^{2+} при различных значениях доступности миозиновых головок, ρ . Расчет $K_A = 0$ соответствует состоянию ригора, показан пунктирной линией. Б: средняя доля TnI, не связанных с актином. $\beta = 3.5$, $\lambda = 2$ для всех приведенных расчетов.

Графики изменения вероятности пребывания миозиновых головок в присоединенном состоянии в зависимости от концентрации кальция и при различных значениях доступности миозиновых головок представлены на (рис. 10). Эти результаты хорошо согласуются с результатами экспериментов, в которых связывание миозиновых головок с актином было блокировано блебистатином или при помощи других биохимических воздействий (G.P. Farman и др. 2010).

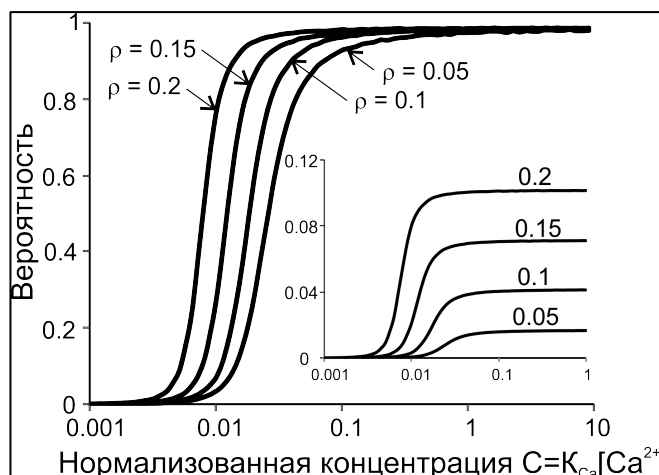


Рис. 10. Нормализованная средняя занятость мономеров актина миозиновыми головками в зависимости от безразмерной концентрации Ca^{2+} при различных значениях доступности миозиновых головок, ρ . Вставка: ненормированная занятость актина миозиновыми головками при тех же условиях ($\beta = 3,5$, $\lambda = 2$, значения ρ показаны на графике).

Результаты расчётов показывают, что предложенная нами модель впервые позволила объяснить недавно обнаруженную экспериментально

высокую кооперативность системы активации тонких нитей сердечной мышцы даже в отсутствии миозиновых мостиков, увеличение Ca-чувствительности в их присутствии, а также другие экспериментально наблюдаемые характеристики системы регуляции сокращения (раздел 4.4).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

- Построена кинетическая модель сокращения саркомеров поперечно-полосатых мышц, учитывающая кручение актиновых нитей под действием внешних сил и моментов, а также структурных перестроек. С использованием экспериментальных данных проведена оценка параметров модели, описывающих кручение актиновой нити под действием растягивающей силы и момента, создаваемого присоединенными миозиновыми головками.
- Проведены численные расчеты, моделирующие эксперименты по изучению релаксации напряжения после ступенчатой деформации мышечной клетки с учетом растяжения и кручения белковых нитей. Показано, что в таких режимах возникают значительные повороты актиновой нити в середине саркомеров, которые могут оказывать существенное влияние на актин-миозиновое взаимодействие.
- Построена математическая модель регуляции актин-миозинового взаимодействия, в которой тропомиозин рассматривается как упругий стержень, имеющий в недеформированном состоянии спиральную форму. Модель учитывает взаимодействие тропомиозина с актином и тропонином, а также связывание последнего с ионами Ca^{2+} и актином.
- Разработана модификация алгоритма Метрополиса-Гастингса, позволяющая эффективно вычислять среднестатистические стационарные характеристики стохастической марковской системы высокой размерности.
- Проведены численные расчеты зависимостей величин, характеризующих активацию мышечного сокращения, от концентрации ионов Ca^{2+} . Исследовано влияние параметров модели на эти зависимости. Показано, что предложенная модель позволяет объяснить высокую кооперативность системы активации сокращения мышцы в отсутствие и в присутствии миозиновых головок.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Метальникова Н.А. Математическая модель механики саркомера мышцы с учетом растяжения и кручения актиновых нитей. // Труды конф.-конкурса молодых ученых НИИ механики МГУ 14-16 октября 2009 г, 2010 М., МГУ. С. 225-232.
2. Метальникова Н.А. Учет растяжения и кручения актиновых нитей в модели механики саркомера поперечно-полосатых мышц. // Сб. "Материалы X Всероссийской конференции: Биомеханика 2010". Саратов. 2010. С. 116.

3. Metalnikova N.A. Twist and stretch of actin filaments in sarcomere: a model study. // *Biological motility: from fundamental achievements to nanotechnologies*. Pushchino. 2010. P. 173-174.
4. **Метальникова Н.А., Цатурян А.К. Математическая модель механики саркомера поперечно-полосатых мышц с учетом растяжения и кручения актиновых нитей. // *Биофизика*. 2010. Т. 55(5). С. 892-898.**
5. Метальникова Н.А. Математическая модель влияния механических факторов на кальциевую регуляцию мышечного сокращения. // Труды конференции-конкурса молодых ученых НИИ механики МГУ 12-14 октября 2011 г., 2012 М., МГУ. С. 179-185.
6. Метальникова Н.А., Цатурян А.К. Механическая модель кальциевой активации тонких нитей в саркомерах мышц. // Ломоносовские чтения. Тезисы докладов научной конференции. Секция механики. 16-25 апреля 2012г., Москва. Изд. МГУ. 2012. С. 118.
7. Metalnikova N.A. A mechanistic model of Ca-regulation of thin filaments in striated muscle. // *Biological motility: Fundamental and Applied Science*. Pushchino. 2012. P. 131-135.
8. Metalnikova N.A., Tsaturyan A.K. A mechanistic model of Ca-activation of the thin filaments in cardiac muscle. // *J. Muscle Res. and Cell Motil.* 2012. v 33., P. 241.
9. Метальникова Н.А. Влияние механических факторов на регуляцию мышечного сокращения. // Труды конф.-конкурса молодых ученых НИИ механики МГУ 8-10 октября 2012 г. (в печати).
10. **Metalnikova N.A., Tsaturyan A.K. A Mechanistic Model of Ca-Regulation of Thin Filaments in Cardiac Muscle. // *Biophysical Journal*. 2013., v. 105(4), P. 941-950.**