

BERNARD KORZENIEWSKI

*Zakład Biofizyki, Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński
Gronostajowa 7, 30-387 Kraków
e-mail benio@mol.uj.edu.pl*

KOMPUTEROWE MODELOWANIE REGULACJI FOSFORYLACJI OKSYDACYJNEJ

ILOŚCIOWE MODELE W FIZYCE I BIOLOGII

Trudno byłoby sobie wyobrazić współczesną fizykę (i chemię) bez teoretycznych, matematycznych modeli (teorii). Pozwalają one, między innymi (1) opisać analizowany układ w sposób ścisły i ilościowy, (2) wyjaśnić wiele pozornie nie związanych ze sobą zjawisk oraz (3) przewidzieć istnienie całkowicie nowych zjawisk nie odkrytych wcześniej na drodze eksperymentalnej. To ostatnie jest rzeczą powszechną w fizyce; jako przykłady można by tu wymienić teoretyczne przewidzenie istnienia pozytonu (antycząstki elektronu) przez Paula Diraca, soczewek grawitacyjnych w obrębie ogólnej teorii względności lub też kwarka t (top) w obrębie mechaniki kwantowej.

Opis układów biologicznych przez ilościowe matematyczne modele jest ciągle bardzo niepełny i znajduje się w początkowej fazie rozwoju. Wynika to z zasadniczej różnicy pomiędzy układami fizycznymi (i chemicznymi), z jednej strony, a biologicznymi – z drugiej. W fizycznych układach dynamicznych mamy do czynienia z jednym lub dwoma elementami, pomiędzy którymi zachodzi jedno proste oddziaływanie (może to być np. foton poruszający się w przestrzeni jako kwant promieniowania elektromagnetycznego lub elektron związany z jądrem atomowym na danym orbitalu w obrębie mechaniki kwantowej, albo też planeta obiegająca gwiazdę w teorii Newtona lub ogólnej teorii względności). W przypadku układów dynamicznych możliwy jest

ścisły analityczny opis zachowania się rozpatrywanego układu. Opis ten stosuje się jedynie do układów złożonych z bardzo małej liczby elementów – już problemu zachowania się trzech ciał w polu grawitacyjnym nie da się opisać ściśle w sposób analityczny. W przypadku układów termodynamicznych, złożonych z ogromnej ilości takich samych lub podobnych elementów, pomiędzy którymi występuje jedno proste oddziaływanie (przykładem takiego układu może być pojemnik z gazem), adekwatny jest opis statystyczny, w którym zachowanie się poszczególnych elementów (np. cząsteczek gazu) ulega uśrednieniu i pojawiają się parametry makroskopowe, takie jak temperatura.

Zarówno opis analityczny, jak i statystyczny jest całkowicie nieprzydatny w przypadku złożonych układów biologicznych. Te ostatnie bowiem składają się z ogromnej ilości rozmaitych, hierarchicznie zorganizowanych elementów i podzespołów, pomiędzy którymi zachodzi szeroka gama oddziaływań i interakcji. Nie można zatem oddać istoty takiego układu przy pomocy jednego prostego matematycznego wzoru ani też uśrednić zachowania się zupełnie do siebie niepodobnych elementów. A zatem, w przypadku złożonych, dynamicznych układów biologicznych potrzebny jest zupełnie inny rodzaj opisu ilościowego, niż w przypadku układów dynamicznych i termodynamicznych.

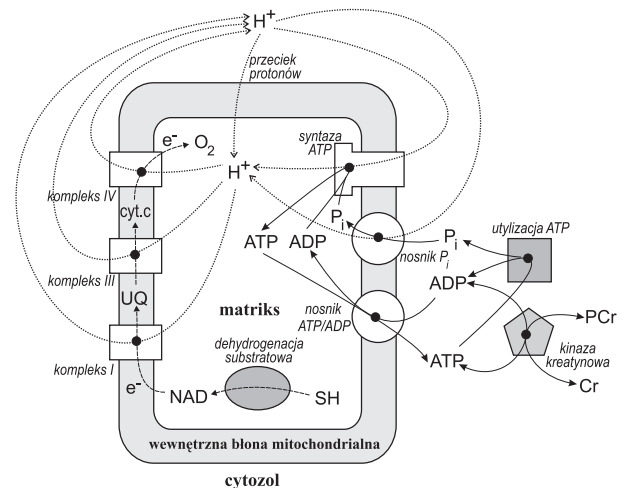
FOSFORYLACJA OKSYDACYJNA W MITOCHONDRIACH

Układy biologiczne można rozpatrywać na wielu poziomach hierarchii: (makro)molekul związków organicznych, ich kompleksów, elementów komórki (błony białkowo-lipidowe, cytoszkielet, chromosomy, rybosomy), organelli komórkowych, całych komórek, tkanek, narządów, organizmów wielokomórkowych, populacji, ekosystemów oraz całej biosfery. Można je też analizować w rozmaitych aspektach: strukturalnym, funkcjonalnym, rozwojowym (ontogenetycznym), ewolucyjnym itp. Do rozmaitych poziomów hierarchii i aspektów można stosować różne, często komplementarne, metody i paradygmaty opisu ilościowo-matematycznego. W niniejszym artykule problem ilościowego opisu układów biologicznych przedstawię na przykładzie modelowania szlaków metabolicznych, a w szczególności fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach. Będzie to biochemiczny, komórkowy i fizjologiczny poziom hierarchii rozpatrywany w aspekcie funkcjonalnym, dynamicznym i regulacyjnym.

Proces fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach jest odpowiedzialny za produkcję energii w komórce w postaci ATP. Mitochondria są organellami w komórkach eukariotycznych, otoczonymi dwiema błonami białkowo-lipidowymi, z których wewnętrzna jest w dużym stopniu nieprzepuszczalna dla jonów oraz pofałdowana (jej wpuklenia do wnętrza mitochondriów, czyli matriks, tworzą tzw. grzebień). Ogólny mechanizm i schemat przebiegu procesu oksydacyjnej syntezy ATP znany jest od momentu opublikowania przez MITCHELLA (1961) jego słynnej teorii chemiosmotycznej. Według tej teorii kluczowym pośrednikiem w produkcji ATP w procesie fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach i bakteriach oraz w procesie fosforylacji fotosyntetycznej w chloroplastach roślin i bakterii fotosyntetyzujących jest gradient protonów w poprzek odpowiedniej błony białkowo-lipidowej związanej z produkcją energii. Związany z tym gradientem potencjał termodynamiczny, zwany siłą protonomotoryczną (Δp), posiada dwie komponenty: elektryczną (różnica potencjału elektrycznego po obu stronach błony wynikająca z różnicy w ilości ładunków elektrycznych) oraz osmotyczną, stężeniową (różnica w stężeniu protonów po obu stronach błony).

Ogólny schemat fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach przedstawia Ryc. 1

(zainteresowanych szczegółami odsyłam do podręcznika NICHOLLSA i FERGUSONA 2002). Błoną związaną z produkcją energii jest tu wewnętrzna błona mitochondrialna. Proces zaczyna się w momencie przekazania elektronów z substratów oddechowych na NAD (oraz FAD) – utleniona forma NAD (NAD^+) zostaje przekształcona w formę zredukowaną (NADH). Etap ten nazywamy ogólnie dehydrogenacją substratów. Jest to duży blok metaboliczny, w skład którego wchodzi, między innymi, zachodząca w cytoplazmie komórki glikoliza oraz zlokalizowane w mitochondriach: β -oksydacja kwasów tłuszczowych i cykl Krebsa (cykl kwasów trójkarboksylowych). Elektrony są przekazywane z NAD na łańcuch oddechowy zlokalizowany w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, w skład którego wchodzi duże kompleksy białkowe (kompleks I, kompleks III i kompleks IV) oraz dwa drobnocząsteczkowe związki przenoszące elektrony pomiędzy nimi: ubichinon (UQ) oraz cytochrom c. Elektrony z FAD płyną poprzez kompleks II na ubichinon (nie jest to pokazane na Ryc. 1, ponieważ większość elektronów płynie przez NAD, a nie FAD). Ostatecznym akceptorem elektronów w łańcuchu oddechowym jest tlen, który w wyniku przyjęcia elektronów (i protonów z fazy wodnej) zostaje zredukowany do wody. Przepływ elektronów przez kompleksy



Ryc. 1. Ogólny schemat układu fosforylacji oksydacyjnej w mięśniu.

Przedstawiono enzymy, procesy i bloki metaboliczne uwzględnione *explicitie* w obrębie opisywanego modelu fosforylacji oksydacyjnej. UQ, ubichinon; cyt c, cytochrom c.

I, III i IV (ale nie przez kompleks II) łańcucha oddechowego sprzężony jest z pompowaniem protonów z wnętrza mitochondriów (matriks mitochondrialnej) na zewnątrz (do cytoplazmy komórki) – prowadzi to do powstania wspomnianego powyżej gradientu stężeń protonów (gradientu pH, czyli ΔpH) oraz gradientu ładunku elektrycznego wytwarzającego potencjał elektryczny ($\Delta\Psi$) (wynika to oczywiście z faktu, że protony obdarzone są ładunkiem dodatnim). Obie te komponenty składają się na siłę protonomotoryczną Δp . Typowe wartości tych trzech potencjałów termodynamicznych to: $\Delta\text{pH} = 30$ mV (0.5 jednostki pH), $\Delta\Psi = 150$ mV, $\Delta p = 180$ mV. Mniejsze stężenie protonów w matriks oraz jej ujemny ładunek powodują, że protony mają silną tendencję do spontanicznego powrotu z przedziału zewnętrznego do wnętrza mitochondriów. Część z nich (w komórkach wątroby – hepatocytach szczura jest to około 25%) płynie po prostu przez wewnętrzną błonę mitochondrialną nie wykonując żadnej pracy – jest to tak zwany przeciek protonów (ang. proton leak) (intensywność przecieku może być zwiększona przez tzw. białka rozprzegające, ang. uncoupling proteins, UCP). Związany jest on z dużą produkcją ciepła. U zwierząt stałocieplnych w czasie spoczynku jest to główny proces odpowiedzialny za termogenezę. Jednak większość protonów wraca do matriks mitochondrialnej przez kanał w syntazie ATP. Molekuła tego enzymu ma postać „grzybka”, którego „nóżka” jest zakotwiczona w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, a „główka” skierowana jest do matriks. Przepływ protonów przez synta-

zę ATP sprzężony jest z syntezą ATP z ADP i P_i (fosforanu nieorganicznego) w matriks mitochondrialnej. Ponieważ większość ATP zużywana zostaje przez procesy zachodzące w cytoplazmie, zachodzi konieczność transportu ATP na zewnątrz mitochondriów, a substratów do jego produkcji: ADP i P_i – do ich wnętrza. Odpowiadają za to dwa nośniki umieszczone w wewnętrznej błonie mitochondrialnej: nośnik ATP/ADP katalizuje elektrogeniczną wymianę ATP na ADP, natomiast nośnik fosforanu przenosi cząsteczki P_i razem z protonami. W cytoplazmie hydroliza ATP ulega sprzęgnięciu z takimi procesami, jak transport jonów (Na^+/K^+ , Ca^{2+}) w poprzek błony cytoplazmatycznej oraz błon retikulum endoplazmatycznego, synteza białek, kwasów nukleinowych i innych związków organicznych, praca mechaniczna (ATPaza aktomiozynowa w mięśniach), glukoneogeneza i ureogeneza (wątroba, nerka) itd. W tkankach pobudliwych (ang. excitable tissues), takich jak mięsień szkieletowy, mięsień sercowy lub neurony, para ATP/ADP pozostaje blisko równowagi termodynamicznej z parą fosfokreatyna (PCr)/kreatyna (Cr). Odpowiada za to enzym kinaza kreatynowa katalizujący szybką reakcję przenoszenia reszty fosforanowej z ATP na Cr (powstaje ADP i PCr) oraz reakcję odwrotną. Rolą układu kinazy kreatynowej jest, po pierwsze, stworzenie „buforu energetycznego” dla ATP (stężenie PCr jest kilkakrotnie większe, niż stężenie ATP), a po drugie – przewyciężenie możliwych ograniczeń dyfuzyjnych dla ADP (Cr dyfunduje znacznie szybciej, niż ADP).

DYNAMICZNY MODEL KOMPUTEROWY FOSFORYLACJI OKSYDACYJNEJ W MIĘŚNIU

Sama znajomość przebiegu jakiegoś złożonego procesu i mechanizmów fizykochemicznych leżących u jego podstawy zdecydowanie nie wystarczy, aby w pełni zrozumieć funkcjonowanie tego procesu, zależność jego intensywności od rozmaitych czynników, zachowanie się w odpowiedzi na rozmaite zewnętrzne zaburzenia oraz wewnętrzną regulację. Niezbędny jest do tego wyczerpujący ilościowy opis elementów rozważanego procesu oraz ich wzajemnego współdziałania.

Dla dynamicznego aspektu funkcjonowania szlaków metabolicznych w komórce najbardziej adekwatnym i pełnym rodzajem opisu ilościowego są komputerowe modele dynamiczne (pozwalające symulować zacho-

wania się badanego układu w czasie). W niniejszym artykule ogólna struktura i zastosowanie takich modeli zostaną omówione na przykładzie modelu układu fosforylacji oksydacyjnej w mięśniach szkieletowych i sercu, opracowanym przez autora i współpracowników (KORZENIEWSKI i MAZAT 1996, KORZENIEWSKI 1998, KORZENIEWSKI i ZOLADZ 2001, KORZENIEWSKI i współaut. 2005). Kilka innych modeli fosforylacji oksydacyjnej zostało zaproponowanych w literaturze (BOHNENSACK 1981, VENDELIN i współaut. 2000, CORTASSA i współaut. 2003), ale wspomniany model został najobszerniej przetestowany poprzez porównanie komputerowych symulacji z wynikami eksperymentów, a także jako jedyny

został użyty do próby teoretycznego przewidzenia zjawisk nie odkrytych wcześniej na drodze doświadczalnej.

Jak każdy tego typu dynamiczny model komputerowy szlaku metabolicznego, omawiany model składa się z dwóch głównych części: równań kinetycznych i zespołu równań różniczkowych. Równania kinetyczne opisują zależność szybkości działania poszczególnych enzymów/procesów/bloków metabolicznych od stężeń substratów, produktów, allosterycznych aktywatorów i inhibitorów oraz zewnętrznych (w stosunku do rozpatrywanego układu) efektorów. W dyskutowanym modelu dobrym przykładem jest równanie kinetyczne dla oksydazy cytochromowej (kompleksu IV łańcucha oddechowego):

$$v_{c4} = k_{c4} \cdot a^{2+} \cdot c^{2+} \frac{1}{1 + \frac{K_{mO_2}}{O_2}}$$

w którym szybkość reakcji katalizowanej przez ten enzym (v_{c4}) proporcjonalna jest do stałej szybkości reakcji (k_{c4}), stężenia zredukowanej formy cytochromu a_3 (a^{2+}),¹ stężenia zredukowanej formy cytochromu c (c^{2+}) oraz stężenia tlenu (O_2). Zależność szybkości reakcji od stężenia zredukowanej formy cytochromu c i a_3 jest liniowa, natomiast w przypadku stężenia tlenu przybiera ona formę hiperboliczną (Michaelisa-Menten). Każdy z elementów układu przedstawiony na Ryc. 1 opisany jest analogicznym równaniem kinetycznym, chociaż oczywiście równania te mają w każdym przypadku odmienną postać. Równania kinetyczne zostały częściowo oparte na dostępnych danych doświadczalnych dotyczących poszczególnych enzymów/procesów/bloków metabolicznych, a częściowo założone i dopasowane, tak aby poprawnie przewidywały właściwości kinetyczne całego układu.

Szybkości zmiany stężeń poszczególnych metabolitów w czasie opisywane są przez odpowiednie równania różniczkowe. W równaniach tych szybkość zmiany stężenia metabolitu wynika z różnicy pomiędzy szybkością wszystkich reakcji produkujących ten metabolit a szybkością wszystkich reakcji go zużywających. Na przykład, równanie różniczkowe dla stężenia zredukowanej formy cytochromu c ma następującą postać:

$$dc^{2+}/dt = (v_{c3} - 2 \cdot v_{c4}) \cdot 2 \cdot R_{cm}$$

gdzie szybkość zmiany tego stężenia w czasie dc^{2+}/dt równa jest różnicy pomiędzy szybkością redukcji cytochromu c przez kompleks III (v_{c3}) a szybkością jego utleniania przez kompleks IV (v_{c4} , opisaną w przedstawionym wyżej równaniu kinetycznym); człony „2” oraz „ R_{cm} ” opisują stechiometrię (dwa elektrony na jeden NADH, cztery elektrony na jeden O_2) oraz stosunek objętości komórki do objętości mitochondriów. Zmiany stężenia w czasie innych metabolitów także opisane są przez odpowiednie równania różniczkowe.

W czasie symulacji komputerowych przy użyciu modelu obliczenia dokonywane są w kolejnych krokach czasowych. Cały okres symulacji dzieli się na dyskretne krótkie odcinki czasowe, przy czym ich długość może być dostosowywana przy użyciu odpowiedniej procedury numerycznej, tak aby, z jednej strony, symulacja była wystarczająco dokładna (sprzyja temu krótki krok), a z drugiej – zajmowała możliwie mało czasu pracy komputera (co ma miejsce przy długim kroku, a więc stosunkowo małej ilości kroków). W każdym kroku „nowe” szybkości poszczególnych reakcji obliczane są na podstawie „starych” (z poprzedniego kroku) stężeń metabolitów i efektorów (równania kinetyczne), a z kolei „nowe” stężenia (wynikające ze „starych” stężeń oraz wielkości zmian stężeń w danym kroku) obliczane są na podstawie szybkości reakcji (równania różniczkowe). To „błędne koło” obliczeń powtarzane jest w kolejnych krokach aż do zakończenia symulacji. W ten sposób można symulować przebieg w czasie zmian zarówno szybkości reakcji, jak i stężeń metabolitów.

Punktem startu symulacji jest z reguły pewien stan stacjonarny (ang. steady-state), np. stan spoczynkowy w mięśniu szkieletowym. W takim stanie szybkości reakcji oraz stężenia metabolitów pozostają stałe, chociaż następuje stały jednokierunkowy przepływ metabolitów przez system. Na przykład, w pracującej komórce mięśnia ma miejsce ciągły rozkład glikogenu, przepływ metabolitów przez glikolizę i cykl Krebsa, przeniesienie elektronów na NAD i w końcu na tlen, produkcja ATP w mitochondriach i jego zużywanie w cytoplazmie na pracę mechaniczną. Cechy stanu stacjonarnego wynikają z faktu, że szybkości reakcji produkujących i konsumujących każdy z metabolitów są w nim dokładnie równe. Właściwa symulacja kom-

¹Cytochrom a_3 jest jednym z centrów przenoszenia elektronów (redoks) w oksydazie cytochromowej.

puterowa polega na zaburzeniu wyjściowego stanu stacjonarnego (np. poprzez przejście ze spoczynku do wysiłku w mięśniu związane z dużym wzrostem hydrolizy ATP) i stopniowe osiągnięcie, poprzez stan przejściowy, w którym szybkości reakcji i stężenia metabolitów ulegają zmianie, docelowego stanu stacjonarnego. Potem można przeprowadzić operację odwrotną i przejść do początkowego stanu stacjonarnego (np. od wysiłku do spoczynku w mięśniu, porównaj Ryc. 4–6). Zaburzenie stanu stacjonarnego wiąże się ze zmianą wartości pewnych parametrów, np. stałych szybkości dla jednego lub kilku elementów układu, spowodowaną przez działanie jakiegoś zewnętrznego (w stosunku do rozpatrywanego układu) efektora. Interesujące są przy tym zarówno wartości zmiennych (szybkości i stężeń) w docelowym stanie stacjonarnym, jak i czasowe przebiegi ich zmian w stanie przejściowym. Otrzymane w ten sposób teoretyczne przewidywania modelu dotyczące kinetycznych właściwości badanego układu mogą być następnie porównywane z wynikami odpowiednich eksperymentów.

Żeby być wiarygodnym, model złożonego układu biologicznego musi zostać wszechstronnie zweryfikowany poprzez porównanie symulacji z możliwie szerokim zestawem danych doświadczalnych obejmujących wartości parametrów oraz właściwości modelo-

wanego układu. Omawiany model poprawnie przewiduje wiele cech ilościowych systemu fosforylacji oksydacyjnej zarówno w izolowanych mitochondriach, jak i całym mięśniu szkieletowym i sercu, w tym: (1) wartości strumienia (konsumpcja tlenu VO_2 , produkcja ATP) oraz stężeń rozmaitych metabolitów (ADP, ATP, P_i , PCr, Cr, NADH/NAD⁺, cyt.c²⁺/cyt.c³⁺, cyt.a₃²⁺/cyt.a₃³⁺, Δp, O₂) w różnych stanach stacjonarnych narzuconych przez różne zapotrzebowanie na energię (ATP) oraz stężenie tlenu; (2) zmiany w czasie strumienia oraz stężeń metabolitów podczas przejścia z jednego stanu stacjonarnego do drugiego (przejście od spoczynku do pracy mechanicznej, przejście od nasycającego stężenia tlenu do anaerobiozy); (3) wartości współczynników kontroli strumienia² (ang. flux control coefficients), wyznaczone w obrębie Analizy Kontroli Metabolicznej (ang. Metabolic Control Analysis) (KACSER i BURNS 1973, HEINRICH i RAPAPORT 1974), stanowiące ilościową miarę kontroli sprawowanej przez poszczególne enzymy/procesy/bloki metaboliczne nad strumieniem konsumpcji tlenu w różnych stanach stacjonarnych; (4) zależności szybkości oddychania od stężeń/aktywności poszczególnych enzymów otrzymane poprzez miareczkowanie tych enzymów przy użyciu specyficznych inhibitorów (KORZENIEWSKI i MAZAT 1996).

REGULACJA FOSFORYLACJI OKSYDACYJNEJ W MIĘŚNIU SZKIELETOWYM I SERCU PRZY ZMIENIAJĄCYM SIĘ ZAPOTRZEBOWANIU NA ENERGIĘ

Przy przejściu ze stanu spoczynku do intensywnego wysiłku zużycie ATP w mięśniach szkieletowych ssaków może wzrosnąć nawet 100-krotnie (w mięśniach skrzydeł owadów nawet 600-krotnie). Szybkość produkcji ATP musi zostać w krótkim czasie dostosowana do szybkości zużycia tego związku³, w przeciwnym razie doszłoby do wyczerpania ATP, ustania pracy komórki mięśniowej lub na-

wet jej śmierci. Trzy procesy odpowiadają za produkcję ATP w komórce mięśnia szkieletowego. Reakcja katalizowana przez kinazę kreatynową może przejściowo dostarczać ATP w początkowej fazie wysiłku poprzez przeniesienie grupy fosforanowej z fosfokreatyny (PCr) na ADP (odbywa się to kosztem spadku stężenia PCr; porównaj Ryc. 4–6). Glikoliza beztlenowa stanowi istotne źródło

²Współczynnik kontroli strumienia definiowany jest jako:

$$C_{E_i}^J = (dJ/J)/(dE_i/E_i)$$

gdzie $C_{E_i}^J$ oznacza współczynnik kontroli strumienia dla enzymu E_i w odniesieniu do strumienia J , a dJ/J oznacza względną zmianę strumienia J spowodowaną małą względną zmianę stężenia/aktywności enzymu E_i – dE_i/E_i .

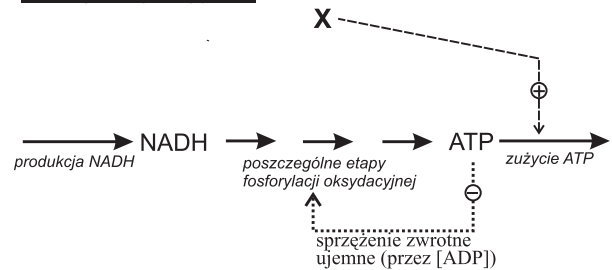
³W pracującym mięśniu szkieletowym ok. 70% ATP zużywane jest na pracę mechaniczną (ATPaza aktomiozynowa), a ok. 30% na transport jonów wapnia do cystern retikulum sarkoplazmatycznego wbrew gradientowi stężeń; uwolnienie jonów wapnia z tych cystern do cytoplazmy stanowi sygnał do skurczu mięśnia – powoduje wzajemne przesuwanie się wobec siebie filamentów aktyny i miozyny; aby nastąpił rozkurcz komórki mięśniowej jony wapnia muszą być z powrotem pobrane do retikulum sarkoplazmatycznego; pracujący mięsień z reguły naprzemiennie kurczy się i rozkurcza.

ATP przy krótkotrwałym, bardzo intensywnym wysiłku; jej produkt, mleczan, prowadzi do postępującego zakwaszenia mięśni oraz krwi i dlatego ten sposób produkcji ATP jest ograniczony w czasie. Głównym producentem ATP w większości mięśni szkieletowych (przynajmniej u człowieka) w większości warunków jest fosforylacja oksydacyjna.

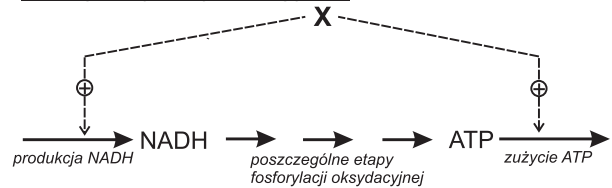
Trzy główne mechanizmy odpowiedzialne za dostosowanie szybkości produkcji ATP przez fosforylację oksydacyjną do bieżącej szybkości zużycia ATP (zapotrzebowania na energię) zostały zaproponowane w literaturze naukowej. W latach 50. CHANCE i WILLIAMS (1956) odkryli, że fosforylacja oksydacyjna (konsumpcja tlenu) w izolowanych mitochondriach aktywowana jest przez ADP i że zależność pomiędzy stężeniem ADP i szybkością oddychania jest w przybliżeniu hiperboliczna (zgodna z kinetyką Michaelisa-Menten); stężenie ADP potrzebne do osiągnięcia szybkości oddychania równej połowie szybkości maksymalnej (czyli stała połowicznej aktywacji $K_{0,5}$)⁴ wynosi około 30 μM , co mieści się w fizjologicznym zakresie stężeń ADP. Naturalnym zatem wydawało się przypuszczenie, że wzrost zapotrzebowania na energię (np. aktywacja zużycia ATP przez jony wapnia podczas przejścia od spoczynku do wysiłku w mięśniu szkieletowym) powoduje wzmożoną hydrolizę ATP do ADP (i P_i), zaś wzrost stężenia ADP aktywuje, na zasadzie sprzężenia zwrotnego ujemnego, proces syntezy ATP przez fosforylację oksydacyjną. Mechanizm ten można nazwać „aktywacją wyjścia” (ang. output activation), jako że bezpośredniej aktywacji (np. przez jony wapnia) ulega jedynie „wyjście” układu – zużycie ATP. Mechanizm ten jest przedstawiony schematycznie na Ryc. 2a („X” na Ryc. 2 oznacza zewnętrzny czynnik/mechanizm, na przykład jony wapnia, aktywujący rozmaite elementy omawianego układu).

Odkrycie aktywacji przez jony wapnia *in vitro* trzech „kluczowych” (posiadających największą kontrolę nad strumieniem metabolitów) dehydrogenaz cyklu Krebsa (dehydrogenazy pirogronianu, izocytrynianu i α -ketoglutaranu) skłoniła szereg autorów (MCCORMACK i współaut. 1990, HANSFORD 1980) do zaproponowania mechanizmu, który można nazwać „aktywacją wejścia/wyjścia” (ang. input/output activation). Zgodnie z tym mechanizmem jedynie wejście układu fosforyla-

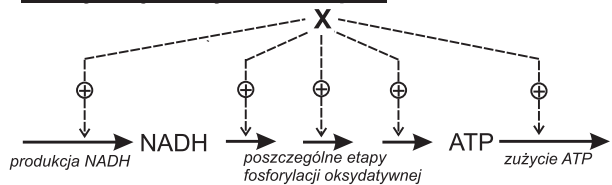
a. aktywacja wyjścia



b. aktywacja wejścia/wyjścia



c. aktywacja wszystkich etapów



Ryc. 2. Schematyczna prezentacja trzech głównych mechanizmów odpowiedzialnych za dostosowanie szybkości produkcji ATP do bieżącego zapotrzebowania na energię zaproponowanych w literaturze.

X, zewnętrzny efektor (np. jony wapnia) aktywujący bezpośrednio rozmaite elementy układu energetycznego komórki.

cji oksydacyjnej (produkcja NADH, czyli dehydrogenacja substratowa) oraz jego wyjście (zużycie ATP) są aktywowane bezpośrednio podczas wzmożonego zapotrzebowania na energię, podczas gdy sama fosforylacja oksydacyjna jest aktywowana jedynie pośrednio, poprzez wzrost w [ADP] i [NADH]. Mechanizm aktywacji wejścia/wyjścia przedstawiony jest na Ryc. 2b.

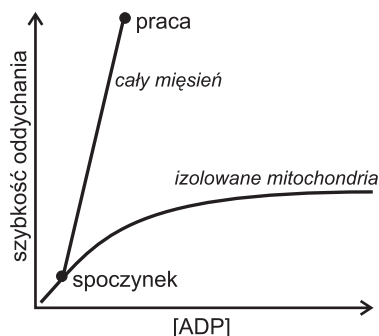
Wreszcie, badania teoretyczne przy użyciu omawianego dynamicznego modelu komputerowego fosforylacji oksydacyjnej silnie sugerują, że jedynie bezpośrednia aktywacja, przez jakiś ciągle nie odkryty cytoplazmatycz-

⁴W przypadku całych mitochondriów poprawniej jest mówić o stałej połowicznej aktywacji ($K_{0,5}$), niż o stałej Michaelisa-Menten (K_m).

ny czynnik/mechanizm, całego układu fosforylacji oksydacyjnej w ogólności, a wszystkich jego elementów (kompleksów I, III i IV, syntazy ATP, nośników ATP/ADP oraz fosforanu) w szczególności, może wyjaśnić rozmaite właściwości tego układu obserwowane w całym mięśniu szkieletowym w warunkach fizjologicznych (KORZENIEWSKI 1998, 2001, 2003). Mechanizm ten, nazwany równoległą aktywacją (ang. parallel activation), lub aktywacją każdego etapu (ang. each-step activation) przedstawiony jest na Ryc. 2c.

Jakie ilościowe i jakościowe argumenty przemawiają za tym ostatnim mechanizmem? Po pierwsze, fenomenologiczna zależność $VO_2/[ADP]$ w całym mięśniu szkieletowym jest w większości wypadków znacznie bardziej stroma, niż w izolowanych mitochondriach. Oznacza to, że w tym pierwszym przypadku względne (procentowe lub „krotnościowe”) zmiany w szybkości oddychania, towarzyszące danym konkretnym względnym zmianom w stężeniu ADP, są znacznie większe, niż w drugim przypadku. Jak to było wspomniane powyżej, w izolowanych mitochondriach eksperymenty pokazują z reguły hiperboliczną zależność szybkości oddychania od $[ADP]$; oznacza to, że zależność ta jest w najlepszym razie (przy stężeniach ADP znacznie niższych niż $K_{0,5}$) liniowa (pierwszego rzędu). Wynika z tego, że, powiedzmy, 5-krotny wzrost stężenia ADP powoduje co najwyżej 5-krotny wzrost szybkości oddychania. W całym mięśniu szkieletowym w warunkach fizjologicznych 2–5-krotnemu wzrostowi $[ADP]$ towarzyszy, w typowym przypadku, 10–60-krotny wzrost szybkości oddychania (HOCHACHKA 1994, DUDLEY i współaut. 1987, JENESON i współaut. 1996). Omawianą różnicę w nachyleniu fenomenologicznej zależności $VO_2/[ADP]$ pomiędzy izolowanymi mitochondriami i całym mięśniem szkieletowym przedstawia schematycznie Ryc. 3.

Po drugie, maksymalna szybkość oddychania, w przeliczeniu na ilość mitochondriów, jest 2–4-krotnie większa w mięśniu szkieletowym niż w izolowanych mitochondriach (TONKONOGI i SAHLIN 1997). Tę różnicę także obrazuje Ryc. 3. Omawiane właściwości fosforylacji oksydacyjnej w całym mięśniu szkieletowym można łatwo wytłumaczyć przy pomocy mechanizmu równoległej aktywacji – pokazują to odpowiednie symulacje komputerowe.



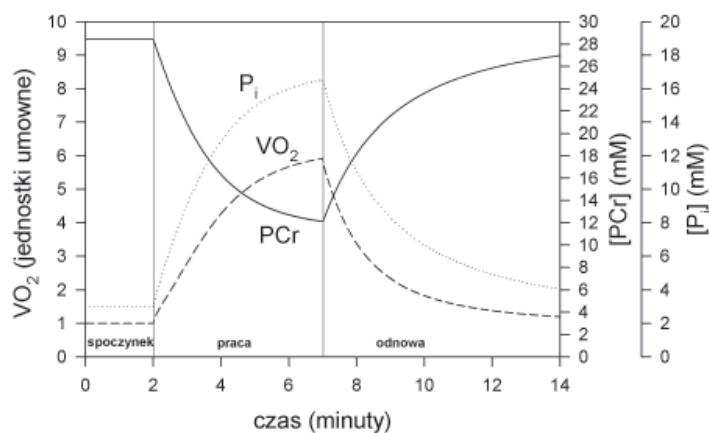
Ryc. 3. Schematyczna prezentacja różnic w fenomenologicznej zależności pomiędzy VO_2 i $[ADP]$ w izolowanych mitochondriach i w całym mięśniu szkieletowym.

Po trzecie, wzrost w intensywności równoległej aktywacji jest w stanie wytłumaczyć wpływ treningu na kinetyczne właściwości fosforylacji oksydacyjnej. Trening mięśnia powoduje ilościową zmianę co najmniej dwóch właściwości: połowicznego czasu przejścia szybkości oddychania po rozpoczęciu wysiłku ($t_{1/2}$) i homeostazy stosunku ATP/ADP⁵. Po rozpoczęciu wysiłku konsumpcja tlenu przez mięsień rośnie w sposób zbliżony do eksponencjalnego. Można określić czas potrzebny na osiągnięcie przez VO_2 połowy jej wartości docelowej (przy danej intensywności wysiłku) – jest to właśnie czas połowicznego przejścia $t_{1/2}$. Otóż, trening mięśnia powoduje znaczące skrócenie tego czasu (HICKSON i współaut. 1978, HAGBERG i współaut. 1980, PHILLIPS i współaut. 1995). Trening powoduje także wzrost homeostazy ATP/ADP – mniejsze zmiany w tym stosunku podczas przejścia od spoczynku do wysiłku mają miejsce w mięśniu wytrenowanym, niż w mięśniu nie wytrenowanym przy tej samej intensywności wysiłku (i, co za tym idzie, konsumpcji tlenu) (CLARK i współaut. 1988, CONSTABLE i współaut. 1987, DUDLEY i współaut. 1987). Ilościowa analiza danych eksperymentalnych prowadzi do wniosku, że o ile skrócenie $t_{1/2}$ może być wytłumaczone zarówno przez wzrost ilości mitochondriów spowodowany treningiem, co zostało stwierdzone doświadczalnie (HOLLOSZY 1967, HOPPELER i FLUCK 2003), jak i przez wzrost intensywności równoległej aktywacji, to za zwiększenie homeostazy ATP/ADP może odpowiadać jedynie ten ostatni mechanizm (KORZENIEWSKI i ZOLADZ 2003).

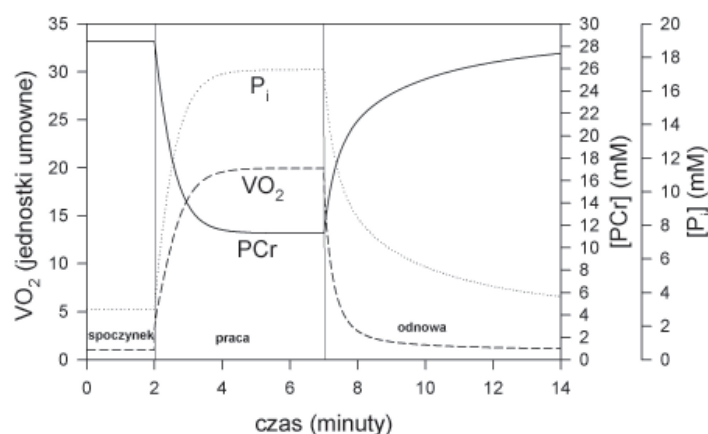
⁵A co za tym idzie – potencjału fosforylacyjnego: miernika ilości energii wyzwanej przy hydrolizie ATP, proporcjonalnego do logarytmu z $[ATP]/([ADP][P_i])$.

Kinetyczne właściwości fosforylacji oksydacyjnej w mięśniach szkieletowych wykazują duże zróżnicowanie w zależności od typu mięśnia i warunków doświadczalnych. W mięśniach glikolitycznych (o stosunkowo większym udziale glikolizy beztlenowej w produkcji ATP, ale ciągle ze znacznym udziałem fosforylacji oksydacyjnej), mięśniach stymulowanych do skurczu elektrycznie i mięśniach perfundowanych (w których zamiast normalnej krwi tlen i substraty oddechowe dostarczane są za pomocą sztucznie pompowanego medium perfuzyjnego) daje się zauważyć tendencja do trzech właściwości: (1) fenomenologiczna zależność $VO_2/[ADP]$ (lub $VO_2/[PCr]$) ma stosunkowo małe nachylenie, jest mało stroma; (2) czas połowicznego przejścia $t_{1/2}$ dla VO_2 i $[PCr]$ po rozpoczęciu wysiłku oraz po jego zakończeniu w czasie odnowy (ang. recovery) mięśnia jest stosunkowo długi (powyżej 1 minuty); (3) występuje symetria pomiędzy $t_{1/2}$ dla PCr pomiędzy przejściem od spoczynku do wysiłku i od wysiłku do spoczynku – w obu przypadkach $t_{1/2}$ ma taką samą wartość. Taki zestaw właściwości można otrzymać w symulacjach komputerowych przy założeniu, że nie ma żadnej bezpośredniej aktywacji fosforylacji oksydacyjnej (a więc stosowany jest mechanizm aktywacji wyjścia) (KORZENIEWSKI 2003). Pokazuje to Ryc. 4, gdzie w czasie wysiłku VO_2 wzrasta jedynie 7-krotnie przy spadku $[PCr]$ do około 11 mM, $t_{1/2}$ dla VO_2 i $[PCr]$ przy rozpoczęciu i po zakończeniu wysiłku wynosi 84 s i jest jednakowy w obu tych przypadkach. Z drugiej strony, w mięśniach oksydacyjnych (w których glikoliza beztlenowa odgrywa marginalną rolę) w wa-

runkach fizjologicznych (mięśnie stymulowane neuronalnie, mięśnie *in vivo*, nie perfundowane) można zaobserwować tendencję do współwystępowania przeciwnych właściwości kinetycznych: (1) fenomenologiczna zależność $VO_2/[ADP]$ (lub $VO_2/[PCr]$) jest stroma; (2) czas połowicznego przejścia $t_{1/2}$ dla VO_2 i $[PCr]$ po rozpoczęciu wysiłku oraz po jego zakończeniu jest krótki (zdecydowanie poniżej 1 minuty); (3) występuje asymetria pomiędzy $t_{1/2}$ dla PCr podczas przejścia od spoczynku do wysiłku i od wysiłku do spoczynku – w tym ostatnim przypadku $t_{1/2}$ może być zdecydowanie dłuższy. Symulacje komputerowe przewidują tego typu zachowanie układu jedynie w warunkach intensywnej równoległej aktywacji (KORZENIEWSKI 2003), co pokazuje Ryc. 5. W tym przypadku szybkość oddychania wzrasta 20-krotnie przy spadku $[PCr]$ do 11 mM, połowiczny czas przejścia dla VO_2 i $[PCr]$ przy rozpoczęciu i zakończeniu wysiłku wynosi znacznie poniżej 60 s, a $t_{1/2}$ dla $[PCr]$ jest znacznie krótszy po rozpoczęciu wysiłku (25 s), niż po jego zakończeniu (40 s), co wynika z faktu, że mitochondria są bardziej aktywne (w wyniku równoległej aktywacji) w czasie wysiłku, niż po jego zakończeniu. W niektórych przypadkach w czasie odnowy mięśnia po wysiłku występuje tak zwany „nadstrzał” PCr (ang. PCr overshoot) – stężenie fosfokreatyny wzrasta od poziomu wysiłkowego nawet powyżej poziomu spoczynkowego, by potem stopniowo wrócić do tego poziomu (KUSHMERICK i współaut. 1992, SAHLIN i współaut. 1997). Jedynym znanym możliwym wyjaśnieniem tego zjawiska zaproponowanym w literaturze jest hipoteza, że bezpośrednia aktywa-



Ryc. 4. Symulowane przebiegi czasowe $[PCr]$, $[P_i]$ i VO_2 podczas przejścia spoczynek-praca i praca-spoczynek (odnowa), przy braku równoległej aktywacji. VO_2 wyrażone jako wielokrotność spoczynkowego VO_2 .



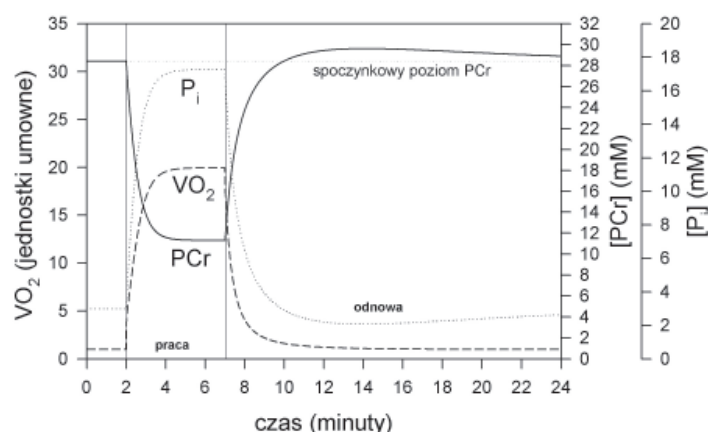
Ryc. 5. Symulowane przebiegi czasowe $[PCr]$, $[P_i]$ i VO_2 podczas przejścia spoczynek-praca i praca-spoczynek (odnowa), w obecności intensywnej równoległej aktywacji w czasie pracy, która to aktywacja zanika szybko po ustaniu pracy. VO_2 wyrażone jako wielokrotność spoczynkowego VO_2 .

cja fosforylacji oksydacyjnej nie jest wyłączana natychmiast po zakończeniu wysiłku, lecz zanika stopniowo w sposób eksponencjalny (KORZENIEWSKI 2003). Symulacja komputerowa przeprowadzona przy uwzględnieniu tego założenia przedstawiona jest na Ryc. 6.

Bardzo ciekawa sytuacja panuje w przypadku kinetycznej charakterystyki fosforylacji oksydacyjnej w mięśniu sercowym *in vivo*. 5-krotnemu wzrostowi w intensywności pracy i konsumpcji tlenu nie towarzyszą tutaj praktycznie żadne zmiany w stężeniu ADP, ATP, PCr, Cr, P_i i NADH (BALABAN i współaut. 1986, KATZ i współaut. 1989, HEINEMAN i BALABAN 1993). Można to wytłumaczyć przy założeniu, że wszystkie elementy układu (zużycie ATP, produkcja NADH i poszczególne

enzymy fosforylacji oksydacyjnej) aktywowane są w dokładnie tym samym stopniu (KORZENIEWSKI i współaut. 2005). Z drugiej strony, zmiany w stężeniach metabolitów w sercu perfundowanym są znaczne (FROM i współaut. 1990). Wydaje się zatem, że równoległa aktywacja w sercu jest równie czuła na warunki doświadczalne, jak w mięśniu szkieletowym.

Podsumowując, modelowanie komputerowe szlaków metabolicznych umożliwia udowodnienie, w pewnym zakresie, tezy filozoficznej – redukcjonizmu, mówiącej, że cechy układu na wyższym poziomie w hierarchii złożoności wyłaniają się z interakcji elementów na niższym poziomie hierarchii. W przypadku modelu fosforylacji oksydacyjnej



Ryc. 6. Symulowane przebiegi czasowe $[PCr]$, $[P_i]$ i VO_2 podczas przejścia spoczynek-praca i praca-spoczynek (odnowa), w obecności intensywnej równoległej aktywacji w czasie pracy, która to aktywacja powoli zanika po ustaniu pracy. VO_2 wyrażone jako wielokrotność spoczynkowego VO_2 .

nej w mięśniu możliwe jest wyprowadzenie z właściwości elementów (kinetyki poszczególnych enzymów, równoległej aktywacji) na niższym (biochemicznym) poziomie organizacji – cech układu na wyższym (komórkowym, fizjologicznym) poziomie organizacji, do których należą: (1) małe zmiany w stężeniach metabolitów, którym towarzyszą duże zmiany w strumieniu (szybkości oddychania, produkcji/konsumpcji ATP); (2) duża aktywność fosforylacji oksydacyjnej *in vivo*; (3) indukowana przez trening adaptacja fosforylacji oksydacyjnej do wysiłku fizycznego; (4) asymetria w kinetyce zmian w [PCr] na początku wysiłku i po jego zakończeniu; (5) „nadstrzał” PCr w czasie odnowy mięśnia po zakończeniu wysiłku; (6) duża różnorodność kinetycznych właściwości fosforylacji oksydacyjnej w różnych mięśniach i rozmaitych warunkach doświadczalnych. Ogólnie rzecz biorąc, koncepcja równoległej aktywacji, tak jak dobra teoria fizyczna, pozwala na wyjaśnienie wielu, pozornie ze sobą niezwiązanymi zjawisk.

Cytoplazmatyczny czynnik/mechanizm odpowiedzialny za równoległą aktywację poszczególnych enzymów fosforylacji oksydacyjnej podczas zwiększonego zapotrzebowania na energię nie został jeszcze odkryty na drodze doświadczalnej, chociaż niektóre przesłanki wskazują na udział jonów wapnia oraz, być może, hormonów. Zostało zaproponowane, że, być może, poszukiwanym czynnikiem jest częstotliwość oscylacji stężenia jonów Ca^{2+} w komórce, która zostaje zintegrowana przez jakieś białko powodujące, na przykład, fosforylację poszczególnych enzymów fosforylacji oksydacyjnej (KORZENIEWSKI 2001). Tak czy owak, przewidywania teoretyczne mogą stać się silnym bodźcem do podjęcia badań doświadczalnych ukierunkowanych na odkrycie natury tego czynnika/mechanizmu. Bez względu na to, czy koncepcja równoległej aktywacji znajdzie ostatecznie potwierdzenie eksperymentalne, wyraźnie ukazuje ona problem badawczy i jedną z możliwych dróg jego rozwiązania.

WNIOSKI

Omawiane badania teoretyczne przy użyciu dynamicznego modelu komputerowego w mięśniu szkieletowym i sercu demonstrują użyteczność ilościowych modeli szlaków metabolicznych dla lepszego zrozumienia funkcjonowania i regulacji tych szlaków. Dobrze przetestowane modele dają wgląd w sposób, w jaki ze współdziałania elementów na poziomie mikroskopowym wyłania się makroskopowe zachowanie całego układu; ponieważ ludzki mózg nie jest przystosowany do integracji dużej liczby danych ilościowych, komputer staje się tu niezbędnym narzędziem. W końcu, symulacje komputerowe

pokazują, iż także w układach biologicznych możliwe jest przewidywanie (a przynajmniej podjęcie próby przewidywania) istnienia nowych, wciąż jeszcze nie odkrytych na drodze doświadczalnej fenomenów.

Ogólnie rzecz biorąc, do pełnego zrozumienia dynamicznych i ilościowych aspektów metabolizmu komórki nie wystarczy znajomość zestawu genów (genomika) oraz białek (proteomika) danego organizmu. Niezbędna jest jeszcze integracja właściwości kinetycznych poszczególnych elementów układu metabolicznego (metabolomika lub integromika).

COMPUTER MODELLING OF REGULATION OF OXIDATIVE PHOSPHORYLATION

Summary

Quantitative description of complex biological systems is presented using as an example a dynamic computer model of oxidative phosphorylation in mitochondria. Theoretical studies concerning the regulation of this process in response to varying en-

ergy demand in intact skeletal muscles and heart are discussed. Computer simulations demonstrate that it is possible to predict theoretically, at least to try to, the existence of completely new phenomena in biological systems.

LITERATURA

- BALABAN R. S., KANTOR H. L., KATZ L. A., BRIGGS R. W., 1986. *Relation between work and phosphate metabolite in the in vivo paced mammalian heart*. Science 232, 1121-1123.
- BOHNENSACK R., 1981. *Control of energy transformation of mitochondria. Analysis by a quantitative model*. Biochim. Biophys. Acta 634, 203-218.
- CLARK 3RD B. J., ACKER M. A., MCCULLY K., SUBRAMANIAN H. V., HAMMOND R. L., SALMONS S., CHANCE B., STEPHENSON L. W., 1988. *In vivo ³¹P-NMR spectroscopy of chronically stimulated canine skeletal muscle*. Am. J. Physiol. 254, C258-266.
- CHANCE B., WILLIAMS G. R., 1956. *The respiratory chain and oxidative phosphorylation*. Adv. Enzymol. 17, 65-134.
- CONSTABLE S. H., FAVIER R. J., MCLANE J. A., FELL R. D., CHEN M., HOLLOSZY J. O., 1987. *Energy metabolism in contracting rat skeletal muscle: adaptation to exercise training*. Am. J. Physiol. 253, C316-C322.
- CORTASSA S., AON M. A., MARBAN E., WINSLOW R. L., O'ROURKE B., 2003. *An integrated model of cardiac energy metabolism and calcium dynamics*. Biophys. J. 84, 2734-2755.
- DUDLEY G. A., TULLSON P. C., TERJUNG R. L., 1987. *Influence of mitochondrial content on the sensitivity of respiratory control*. J. Biol. Chem. 262, 9109-9114.
- FROM A. H. L., ZIMMER S. D., MICHURSKI S. P., MOHANAKRISHNAN P., ULSTAD V. K., THOMA W. J., UGURBIL, K., 1990. *Regulation of oxidative phosphorylation rate in the intact cell*. Biochemistry 29, 3731-3743.
- HAGBERG J. M., HICKSON R. C., EHSANI A. A., HOLLOSZY J. O., 1980. *Faster adjustment to and recovery from submaximal exercise in the trained state*. J. Appl. Physiol. 48, 218-224.
- HANSFORD R. G., 1980. *Control of mitochondrial substrate oxidation*. Curr. Top. Bioenerg. 10, 217-277.
- HEINEMAN F. W., BALABAN R. S., 1993. *Effects of afterload and heart rate on NAD(P)H redox state in the isolated rabbit heart*. Am. J. Physiol. 264, H433-H440.
- HEINRICH R., RAPOPORT T. A., 1974. *A linear steady-state treatment of enzymatic chains. General properties, control and effector strength*. Eur. J. Biochem. 42, 89-95.
- HICKSON R. C., BOMZE H. A., HOLLOSZY J. O., 1978. *Faster adjustment of O₂ uptake to the energy requirement of exercise in the trained state*. J. Appl. Physiol. 44, 877-881.
- HOCHACHKA P. W., 1994. *Muscles as Metabolic Machines*. CRC Press, Boca Raton.
- HOLLOSZY J. O., 1967. *Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle*. J. Biol. Chem. 242, 2278-2282.
- HOPPELER H., FLUCK M., 2003. *Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function*. Med. Sci. Sports Exerc. 35, 95-104.
- JENESON J. A., WISEMAN R. W., WESTERHOFF H. V., KUSHMERICK M. J., 1996. *The signal transduction function of oxidative phosphorylation is at least second order in ADP*. J. Biol. Chem. 271, 27995-27998.
- KACSER H., BURNS J. A., 1973. *The control of flux*. Symp. Soc. Exp. Biol. 32, 65-104.
- KATZ L. A., SWAIN J. A., PORTMAN M. A., BALABAN R. S., 1989. *Relation between phosphate metabolites and oxygen consumption of heart in vivo*. Am. J. Physiol. 256, H265-H274.
- KORZENIEWSKI B., 1998. *Regulation of ATP supply during muscle contraction: theoretical studies*. Biochem. J. 330, 1189-1195.
- KORZENIEWSKI B., 2001. *Theoretical studies on the regulation of oxidative phosphorylation in intact tissues*. Biochim. Biophys. Acta 1504, 31-45.
- KORZENIEWSKI B., 2003. *Regulation of oxidative phosphorylation in different muscles and various experimental conditions*. Biochem. J. 375, 799-804.
- KORZENIEWSKI B., MAZAT J.-P., 1996. *Theoretical studies on the control of oxidative phosphorylation in muscle mitochondria: application to mitochondrial deficiencies*. Biochem. J. 319, 143-148.
- KORZENIEWSKI B., ZOLADZ J. A., 2001. *A model of oxidative phosphorylation in mammalian skeletal muscle*. Biophys. Chem. 92, 17-34.
- KORZENIEWSKI B., ZOLADZ J. A., 2003. *Training-induced adaptation of oxidative phosphorylation in skeletal muscle*. Biochem. J. 374, 37-40.
- KORZENIEWSKI B., NOMA A., MATSUOKA S., 2005. *Regulation of oxidative phosphorylation in intact mammalian heart in vivo*. Biophys. Chem. 116, 145-157.
- KUSHMERICK M. J., MEYER R. A., BROWN T. R., 1992. *Regulation of oxygen consumption in fast-twitch and slow-twitch muscle*. Am. J. Physiol. 263, C598-C606.
- MCCORMACK J. G., HALESTRAP A. P., DENTON R. M., 1990. *Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism*. Physiol. Rev. 70, 391-425.
- MITCHELL P., 1961. *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism*. Nature 191, 144-148.
- NICHOLLS D. G., FERGUSON S. J., 2002. *Bioenergetics 3*. Academic Press, London.
- PHILLIPS S. M., GREEN H. J., MACDONALD M. J., HUGHSON, R. L., 1995. *Progressive effect of endurance training on VO₂ kinetics at the onset of submaximal exercise*. J. Appl. Physiol. 79, 1914-1920.
- SAHLIN K., SODERLUND K., TONKONOGLI M., HIRAKOBA, K., 1997. *Phosphocreatine content in single fibres of human muscle after sustained submaximal exercise*. Am. J. Physiol. 273, C172-C178.
- TONKONOGLI M., SAHLIN K., 1997. *Rate of oxidative phosphorylation in isolated mitochondria from human skeletal muscle: effect of training status*. Acta Physiol. Scand. 161, 345-353.
- VENDELIN M., KONGAS O., SAKS V. A., 2000. *Regulation of mitochondrial respiration in heart cells analyzed by reaction-diffusion model of energy transfer*. Am. J. Physiol. 278, C747-C764.