

Esko Niinimäki

**Luurankolihasolun glykolyysin simulointi
differentiaaliyhtälöillä**

Tietotekniikan kandidaatintutkielma

28. huhtikuuta 2015

Jyväskylän yliopisto

Tietotekniikan laitos

Tekijä: Esko Niinimäki

Yhteystiedot: eskaniin@student.jyu.fi

Työn nimi: Luurankolihas-solun glykolyysin simulointi differentiaaliyhtälöillä

Title in English: Skeletal muscle cell glycolysis simulation with differential equations

Työ: Kandidaatintutkielma

Sivumäärä: 26+0

Tiivistelmä: Solun aineenvaihduntaa on hankala tutkia. Simulointi voi olla eräs ratkaisu ongelmaan. Tutkielma tarkastelee differentiaaliyhtälöihin perustuvaa luurankolihas-solun glykolyysin simuloimista. Siihen on kehitetty 2000-luvulla glykolyysin reaktioiden empiirisiin mittaustuloksiin perustuvia malleja. Differentiaaliyhtälömallit soveltuvat hyvin simuloimiseen, ja suurimpana ongelmana voidaan pitää parametrien saatavuutta ja epävarmuutta.

Avainsanat: glykolyysi, lihas, mallintaminen, simulointi, solu

Abstract: Cell metabolism is difficult to investigate. Simulation can be one solution to the problem. This thesis examines differential equation based simulation of skeletal muscle glycolysis. For simulation, in 2000s it has been developed models based on empirical measurements of the reactions of glycolysis. Differential equation models suit well for simulation and availability and uncertainty of parameters can be regarded as the biggest problems.

Keywords: cell, glycolysis, modeling, muscle, simulation

Termiluettelo

in vitro	Elävän solun ulkopuolella, esimerkiksi lasimaljassa, suoritettava tutkimus.
in vivo	Elävässä organismissa tehty tutkimus.
konsentraatio	Liuenneen aineen pitoisuus liuoksessa, yksikkö mol/m^3 .
pitoisuus	Liuenneen aineen pitoisuus liuoksessa, yksikkö kg/m^3 .
lokeroituminen	(compartmentalization) Ilmiön tapahtuminen tietyssä paikassa vastakohtana (tasaisesti) koko alueella tapahtuvaan ilmiöön.
reversiibeli reaktio	(Bio)kemiallinen reaktio, joka voi tapahtua molempiin suuntiin.
irreversiibeli reaktio	(Bio)kemiallinen reaktio, joka voi tapahtua vain toiseen suuntaan.
ATP	Adenosiinitrifosfaatti, molekyyli, johon kemiallisesti sitoutunut energiaa solu käyttää toimintoihinsa. Koostuu yhdestä adenosiinista ja kolmesta fosfaatista.
ADP	Adenosiinidifosfaatti, koostuu yhdestä adenosiinista ja kahdesta fosfaatista.
AMP	Adenosiinimonofosfaatti, koostuu yhdestä adenosiinista ja yhdestä fosfaatista.
glukoosi	Rypälesokeri. Glukoosia saa ravinnon hiilihydraateista.
glykogeeni	Glukoosin varastomuoto eläimillä.
pyruvaatti	Palorypälehappo, energia-aineenvaihduntamolekyyli.
entsyymi	Biologinen katalyytti.
substraatti	Entsyymiin sitoutuva aine.
-aasi	Entsyymin tunnuspäätte, entsyymin nimen alkuosa viittaa yleensä substraattiin.
inhiboida	Estää, heikentää tai hidastaa entsyymiä.
eksitoida	Nopeuttaa tai helpottaa entsyymiä.
adenylaattikinaasi	Entsyymi, joka katalysoi ADP:n ja ATP:n sekä AMP:n välistä reaktiota.

fosfofruktokinaasi	Entsyymi, joka katalysoi glykolyysin kolmatta reaktiota.
glykogeenifosforylaasi	Entsyymi, joka katalysoi glykogeenin hajotusta.
kreatiinikinaasi	Entsyymi, joka katalysoi kreatiinin ja ATP:n ja vastaavasti kreatiinifosfaatin ja ADP:n välistä reaktiota.
pyruvaattikinaasi	Entsyymi, joka katalysoi glykolyysin viimeistä reaktiota.

Kuviot

- Kuvio 1. Yksinkertaistus lihassolun merkittävimmistä energiantuottoreiteistä. Nuoli osoittaa pääasiallisen reaktiosuunnan. Suorakulmio kuvastaa reaktiosarjaa tai vastaavaa. Tutkielma keskittyy punaisella rajattuihin osiin. 3
- Kuvio 2. Havainnollistus eläinsolusta. Solua täyttää solulima. Lähde: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Elainsolu.png> 5
- Kuvio 3. Havainnollistus poikkijuovaisesta lihassolusta. Suurimman osan solua täyttävät myofibrillit, joissa solun supistuminen ja energiankäyttö tapahtuu. Muut elimet ovat pakkautuneet reunalle ja myofibrillien väliin jäävään tilaan, jota täyttää sarkoplasma eli solulima. Myofibrils = myofibrillit; Nucleus = tuma; Mitochondria = mitokondriot; Sarcolemma = solukalvo; Sarcoplasmic reticulum = sarkoplasmakalvosto (solulimakalvosto). Lähde: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blausen_0801_SkeletalMuscle.png 6
- Kuvio 4. Glykolyysin reaktiot. Nuoli kuvastaa pääasiallista reaktiosuuntaa. Substraatit ylhäältä alas ja vasemmalta oikealle ovat suomeksi: glukoosi, glukoosi-6-fosfaatti, fruktoosi-6-fosfaatti, fruktoosi-1,6-bifosfaatti, dihydroksiasetonifosfaatti, glyseraldehydi-3-fosfaatti, 1,3-bifosfoglyseraatti, 3-fosfoglyseraattiksi, 2-fosfoglyseraattiksi, fosfoenolipyruvaatiksi, pyruvaatti. Entsyymit ylhäältä alas ovat suomeksi: heksokinaasi, fosfoheksaosi-isomeraasi, fosfofruktokinaasi, aldolaasi A, trioosifosfaatti-isomeraasi, glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi, fosfoglyseraattikinaasi, fosfoglyseraattimutaasi, enolaasi, pyruvaattikinaasi. Kuvassa ei näy glykogeeniä eikä glykogeenifosforylaasia, joka katalysoi glykogenolyysiä. Lähde: <http://biochem.co/2010/02/glycolysis/> 8
- Kuvio 5. Yksinkertaistettu esitys Lambethin ja Kushmerickin kehittämästä mallista (Lambeth ja Kushmerick 2002). Kaksisuuntainen nuoli kuvastaa reversiibeliä reaktiota. Reaktion vieressä on sitä katalysoivan entsyymin englanninkielinen nimi lyhennettynä. GLY = glykogeeni; PYR = pyruvaatti; LAC = laktaatti; ATPase = ATPaasi; PCr = kreatiinifosfaatti; CK = kreatiinikinaasi; ADK = adeny-laattikinaasi. 17

Taulukot

- Taulukko 1. Energialähteiden riittävyys ($\frac{\text{min}}{70\%V_{O_2\text{max}}}$) ja maksimiteho ($\frac{\text{mmolATP}}{\text{kgd.m.}} \frac{1}{\text{s}}$) (Pul-linen 2011), alkuperäinen lähde Sahlin et al. 1985 7

Sisältö

1	JOHDANTO	1
2	ESITIETOJA	4
2.1	Solusta suppeasti	4
2.2	Lihassolusta lyhyesti	4
2.3	Glyko(geno)lyysi	5
3	LUURANKOLIHASSOLUN GLYKO(GENO)LYYSIN SIMULOIMINEN DIF- FERENTIAALIYHTÄLÖILLÄ.....	9
3.1	Mallintamisen vaatimukset	9
3.2	Mallintamismenetelmistä	12
3.3	Nykymallien todenmukaisuus	14
3.4	Glyko(geno)lyysimallien soveltamista ja laajentamista	15
4	YHTEENVETO.....	18
	LÄHTEET	19

1 Johdanto

Solun aineenvaihduntaa on hankala tutkia kokeellisesti, sillä kemialliset reaktiot ovat nopeita ja niitä tapahtuu paljon (Reece ym. 2011). Lisäksi reaktioita on hankala mitata elävästä solusta. In vitro -tutkimuksissa on puolestaan ongelmana, etteivät tulokset välttämättä ole suoraan johdettavissa in vivo -tilanteeseen. Tietokonemallinnus voisi tarjota ratkaisun tähän ongelmaan.

Glykolyysi on keskeinen luurankoliuksen energiantuottoreitti (McArdle, Katch ja Katch 2010). Sen avulla lihassolu voi tuottaa energiaa ilman happea. Lisäksi sen lopputuotteen, pyruvaatin, avulla voi mitokondrio tuottaa lisää energiaa hapen avulla. Glykokeenista voi tuottaa energiaa selvästi nopeammin kuin rasvahapoista ja toisaalta selvästi kauemmin kuin kreatiinifosfaattivarastoista. Glykokeenista saa myös enemmän energiaa kulutettua happea kohden kuin rasvahapoista. (McArdle, Katch ja Katch 2010.) Glykogenolyysillä ja glykolyysillä on näin ollen suuri merkitys monessa urheilulajissa, esimerkiksi kaikilla olympia- ja mm-kilpailujen juoksumatkoilla, mutta myös jokapäiväisessä elämässä.

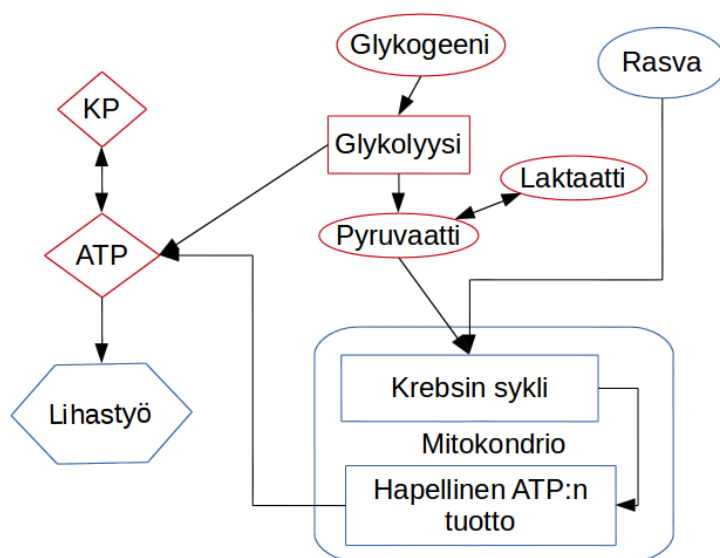
Solun aineenvaihdunnan simuloiminen ei ole helppoa, sillä siinä on lukuisia eri tavoin vaikuttavia tekijöitä (Reece ym. 2011). Reaktiot vaikuttavat toisiinsa monimutkaisten verkostojen välityksellä. Reaktioiden lopputuotteet saattavat inhiboida tai eksitoida useampaa reaktiota. Glykolyysiin vaikuttavat esimerkiksi solun energiankäyttö (ADP:n ja AMP:n määrä (McArdle, Katch ja Katch 2010; Schmitz ym. 2013), pH ja hapensaanti (McArdle, Katch ja Katch 2010). Eri solutyypeillä vaikutukset ovat eri suuruisia (Schmitz ym. 2013). Glykolyysin simulaation tulisi olla mahdollisimman tarkka ja laajennettava, mutta kuitenkin käyttökelpoisen nopea.

Solun aineenvaihdunnan simuloimiseksi on kehitetty stokastisia ja deterministisiä malleja, joilla molemmilla on etunsa ja haittansa. Luurankoliuksen glykolyysin simulointiin on kuitenkin käytetty toistaiseksi vain deterministisiä malleja. Garfinkel, Frenkel ja Garfinkel (1968) mallinsivat glykolyysin käyttäen differentiaaliyhtälöitä, mutta sen jälkeen mallia ei laajennettu kymmeneen vuosiin, ennen kuin Lambeth ja Kushmerick rakensivat suljetun mallinnuksen glykokeenistä laktaatiksi 2000-luvun alussa (Lambeth ja Kushmerick 2002). Lam-

bethin ja Kushmerickin mallinnus sisälsi kokeellisten mittausten avulla muodostetut differentiaaliyhtälöt jokaiselle reaktiolle, ja jokainen reaktio mallinnettiin reversiibeliksi. Vinnakota, Kemp ja Kushmerick (2006) laajensivat tätä vuonna 2002 julkaistua mallia lisäämällä reaktioon liittyvän happamuuden nousun eli protonien määrän lisääntymisen vaikutuksen. Jokaiseen biokemialliseen reaktioon vaikuttaa pH-taso (Vinnakota, Kemp ja Kushmerick 2006), joten laajennus todenmukaisti, mutta myös monimutkaisti mallia selvästi.

Molempia mainittuja 2000-luvulla kehitettyjä simulointimalleja on käytetty myös muissa tutkimuksissa. Liguzinski ja Korzeniewski (2006) totesivat tutkimuksessaan, että fysiologisesti tarkkaan simulointiin on otettava huomioon vaikutukset jokaiseen glykolyysin välivaiheen entsyymiin. He käyttivät tutkimuksessaan mallia, jonka olivat kehittäneet Lambeth ja Kushmerick (2002). Samaa mallia käyttivät pohjanaan myös Schmitz ym. (2010) pari vuotta myöhemmin julkaistussa tutkimuksessaan, jossa he tutkivat glykolyyttisen energiantuoton vaimenemista tilanteessa, jossa lihas passivoituu. Mallia, jonka julkaisivat Vinnakota, Kemp ja Kushmerick (2006), on myös käytetty ainakin kahdesti glykolyysin tutkimiseen.

Tämän tutkielman tarkoituksena on tutkia luurankolihasen glykolyysin simuloimista differentiaaliyhtälöillä ja tarkastella simuloinnin soveltuvuutta ilmiön mallintamiseen yksinään ja osana solun aineenvaihduntaa. Soveltuvuudessa otetaan huomioon, antavatko nykyiset simulaatiomallit empiirisiä mittauksia vastaavia tuloksia, antaako mallintaminen mahdollisuuden uuteen tietoon ja millaista laskenta-aikaa simulointi vaatii. Laajempaan näkökulmana on korkean intensiteetin liikunnan aiheuttama väsymys, jolloin merkittäviä seikkoja ovat etenkin solun energiantuottonopeus ja happamuus, mutta ei hapen käyttö. Kuviossa 1 on esitetty tutkielman aiheen kannalta olennaiset osat lihaksen energiantuottomekanismeista.



Kuvio 1. Yksinkertaistus lihassolun merkittävimmistä energiantuottoreiteistä. Nuoli osoittaa pääasiallisen reaktiosuunnan. Suorakulmio kuvastaa reaktiosarjaa tai vastaavaa. Tutkielma keskittyy punaisella rajattuihin osiin.

2 Esitietoja

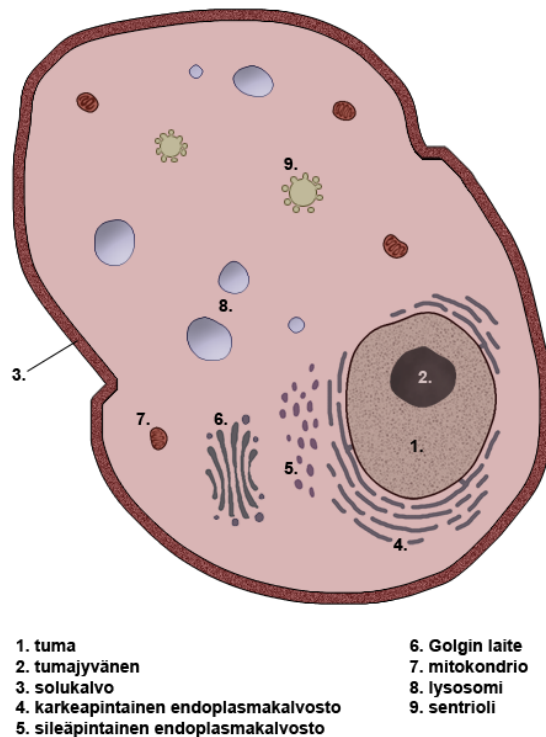
Seuraavissa aliluvuissa käsitellään tutkielman ymmärtämisen kannalta olennaisia fysiologisia (solu)biologisia käsitteitä lyhyesti. Biologian ja fysiologian näkökulmasta kyse on lähinnä perustiedosta, joten lukija voi halutessaan etsiä lisätietoja Internetistä.

2.1 Solusta suppeasti

Eläinsolu (kuvio 2) koostuu solukalvosta, solulimasta, perintöaineksesta (DNA), entsyymeistä ym. ja erilaisista soluelimistä, joista mainittakoon solulimakalvosto, tuma sekä mitokondrio (Reece ym. 2011). Solukalvo ympäröi solua, solulimakalvosto osallistuu proteiinisynteesiin ja solulima täyttää solun. Solu käyttää energianlähteenään adenosiinitrifosfaattia (ATP), ja se voi tuottaa sitä hapettomasti (kreatiinifosfaatista tai) glykolyysin avulla. Jos solulla on mitokondrioita, voivat ne tuottaa ATP:a hapen avulla rasvasta, hiilihydraatista, proteiinista tai alkoholista saatavien molekyylien avulla. ATP:a käytettäessä (hydrolysoitaessa) syntyy epäorgaanista fosfaattia (P_i) ja adenosinidifosfaattia (ADP). Kahdesta ADP-molekyylistä voidaan muodostaa yksi ATP- ja yksi AMP-molekyyli (adenosiinimonofosfaatti) tai toisin päin.

2.2 Lihassolusta lyhyesti

Lihassolussa (kuvio 3) on luvussa 2.1 mainittujen solun perusrakenteiden lisäksi proteiini-komplekseja, jotka aikaansaavat solun muodon muutoksen kautta liikkeen (Tapana 2010). Lihassoluja on ihmisellä kolmea tyyppiä: sileää lihassolua, sydänlihassolua ja poikkijuovaista lihassolua (Karhumäki ym. 2006). Sileää lihaskudosta löytyy monista sisäelimistä (Karhumäki ym. 2006). Luurankolihakset saavat aikaan tahdonalaiset liikkeet ja muodostuvat poikkijuovaisesta lihassolusta (Karhumäki ym. 2006). Lihastyypeistä luurankolihakset on luonnollisesti helpoin tutkia, ja se onkin glykolyysin ja glykogenolyysin sääntelyn tutkimisessa eniten käytetty lihassolutyyppi (Vinnakota, Kemp ja Kushmerick 2006). Tämä tutkimus keskittyy luurankolihasoluun, joten muut tyypit jäävät maininnan tasolle.



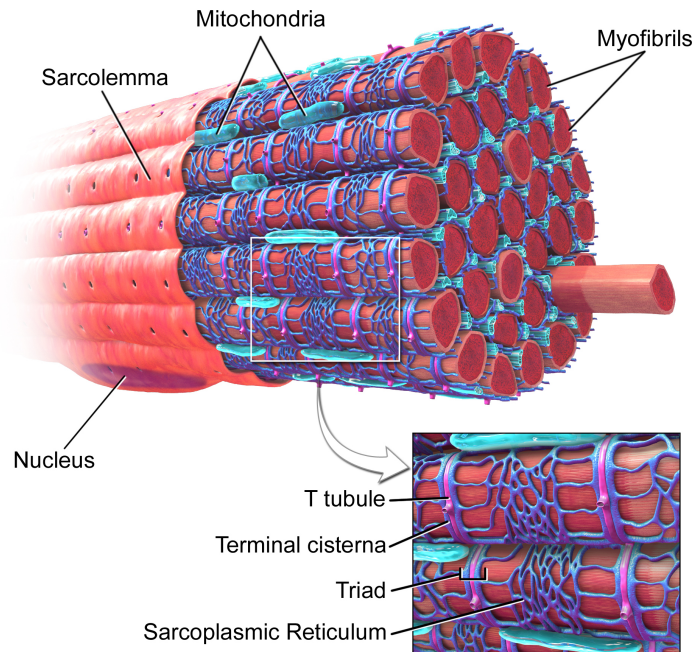
Kuvio 2. Havainnollistus eläinsolusta. Solua täyttää solulima. Lähde: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Elainsolu.png>

Luurankolihas-solun pääenergianlähteet ovat glukoosi eli rypälesokeri, glykogeeni ja rasvahapot (McArdle, Katch ja Katch 2010). Glykogeeni on glukoosin varastomuoto (McArdle, Katch ja Katch 2010). Kreatiinifosfaattia solu tuottaa muista energianlähteistä, ja sen ajatellaan toimivan puskurina ATP:n tuoton ja kulutuksen välillä tilanteissa, joissa kulutuksen voimakkuus vaihtelee nopeasti (McArdle, Katch ja Katch 2010). Eräs arvio energianlähteiden riittävyksistä ja maksimitehoista näkyy taulukossa 1 (Pullinen 2011).

2.3 Glyko(geno)lyysi

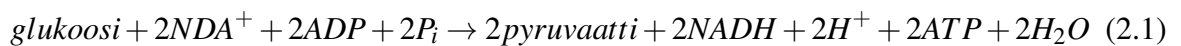
Glykolyysi on solulimassa (lihassolun tapauksessa sarkoplasmassa) tapahtuva kymmenen entsyymin katalysoiman reaktion sarja, jossa glukoosimolekyylistä saadaan energiaa, joka varastoidaan ATP-molekyyleihin (Tapana 2010). Glykolyysin reaktiot ovat reversiibeilejä,

Skeletal Muscle Fiber

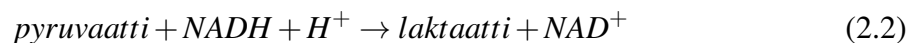


Kuvio 3. Havainnollistus poikkijuovaisesta lihassolusta. Suurimman osan solua täyttävät myofibrillit, joissa solun supistuminen ja energiankäyttö tapahtuu. Muut elimet ovat pakkautuneet reunalle ja myofibrillien väliin jäävään tilaan, jota täyttää sarkoplasma eli solulima. Myofibrils = myofibrillit; Nucleus = tuma; Mitochondria = mitokondriot; Sarcolemma = solukalvo; Sarcoplasmic reticulum = sarkoplasmakalvosto (solulimakalvosto). Lähde:http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blausen_0801_SkeletalMuscle.png

mutta osaa käänteisreaktioista katalysoi eri entsyymi. Glykolyysin nettoreaktio on



Mikäli happea ei ole saatavilla, muodostuu pyruvaatista laktaattia seuraavan reaktioyhtälön mukaisesti:

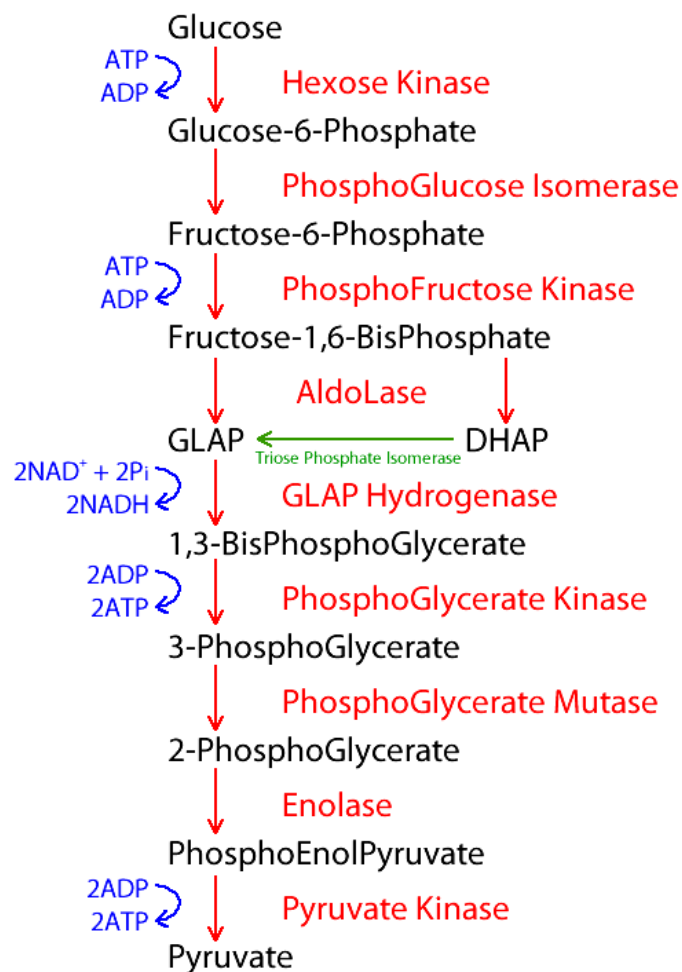


Luurankolihas käyttää glukoosin lähteenään pääasiassa glykogeenia, jota se pilkkoo glykogenolyysiksi kutsussa reaktiossa glukoosi-1-fosfaatiksi, joka jatkaa glykolyyttiseen reaktioketjuun (McArdle, Katch ja Katch 2010). Glykogenolyysin kautta aloitettu glykolyysi tuot-

Taulukko 1. Energialähteiden riittävyys ($\frac{min}{70\%V_{O_2max}}$) ja maksimiteho ($\frac{mmolATP}{kgd.m. s}$) (Pullinen 2011), alkuperäinen lähde Sahlin et al. 1985

	Riittävyys	Maksimiteho
Rasvat	10600	1,4
Hiilihydraatit (aerobinen)	93	2,7
Hiilihydraatit (anaerobinen)	0,9–6,9	5,2
Kreatiinifosfaatti	0,5	8,6
ATP	0,03	11,2

taa glukoosimolekyyliä kohden yhden ATP:n enemmän kuin glukoosin kautta aloitettu ja on siten edullisempi (McArdle, Katch ja Katch 2010). Kuvio 4 esittää glykolyysin eri vaiheet. Sanaa "glyko(geno)lyysi" käytetään tässä tutkielmassa glykogenolyysin kautta aloitusta glykolyysistä.



Simplified Glycolysis diagram. Molecule names contain extra capitals to illustrate components. 21/02/2010 followchemistry.wordpress.com

Kuvio 4. Glykolyysin reaktiot. Nuoli kuvastaa pääasiallista reaktiosuuntaa. Substraattit ylhäältä alas ja vasemmalta oikealle ovat suomeksi: glukoosi, glukoosi-6-fosfaatti, fruktoosi-6-fosfaatti, fruktoosi-1,6-bifosfaatti, dihydroksiasetonifosfaatti, glyseraldehydi-3-fosfaatti, 1,3-bifosfoglyseraatti, 3-fosfoglyseraatiksi, 2-fosfoglyseraatiksi, fosfoenolipyruvaatiksi, pyruvaatti. Entsyymit ylhäältä alas ovat suomeksi: heksokinaasi, fosfoheksososiisomeraasi, fosfofruktokinaasi, aldolaasi A, trioosifosfaatti-isomeraasi, glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi, fosfoglyseraattikinaasi, fosfoglyseraattimutaasi, enolaasi, pyruvaattikinaasi. Kuvassa ei näy glykogeneeniä eikä glykogeenifosforylaasia, joka katalysoi glykogenolyysiä. Lähde: <http://biochem.co/2010/02/glycolysis/>

3 Luurankolihasolun glyko(geno)lyysin simuloiminen differentiaaliyhtälöillä

Seuraavat aliluvut käsittelevät luurankolihasolun glyko(geno)lyysin mallinnusongelmia ja 2000-luvulla saatuja simulointituloksia. Osa ongelmista on luonnollisesti yleisempiä, ja koskee esimerkiksi aineenvaihdunnan simuloimista yleensä, ja osa on enemmän solutyypikohtaisia. Soluilmioihin liittyvää satunnaisuutta käsitellään luvussa 3.2, muita biologisia tai kemiallisia tekijöitä luvussa 3.1.

3.1 Mallintamisen vaatimukset

Empiiristen kokeiden ongelmat heijastuvat vahvasti simulaatioon. Empiiriset mittaustulokset, joihin parametrien arvot perustuvat, ovat luonnollisesti virhealttiita. Eri kudostyyppien ja eläinlajien soluista tehtävät mittaukset antavat eri lukemia (esim. Vinnakota ym. (2010)), eikä kaikkia malleissa tarvittavia mittauksia ole useinkaan tehty juuri tutkittavalle kudostai eläintyypille (esim. Vinnakota, Kemp ja Kushmerick (2006)). Usein reaktioiden aktiivisuudet on mitattu vain toiseen (tässä tapauksessa lyyttiseen) suuntaan (Cornish-Bowden ja Cárdenas 2000), mutta käänteisreaktion nopeus on kuitenkin arvioitavissa ns. Haldanen lausekkeella (kuten tekivät esimerkiksi Lambeth ja Kushmerick (2002)), joten yksisuuntaisen mittauksen aiheuttama ongelma on vähäinen.

Elävän lihaksen ja laboratorion olot poikkeavat usein ratkaisevasti toisistaan. Siinä, missä (tietyn) lämpötilan vaikutus reaktioihin voidaan arvioida (Schmitz ym. 2013), on molekyylien vuorovaikutukset haasteellisempaa huomioida. Esimerkiksi Schmitz ym. (2010) havaitsivat, että vaikka heidän käyttämänsä malli tuotti hyviä tuloksia in vitro -tilanteessa, ei tilanne ollut kaikilta osin sama in vivo -tilanteessa, sillä AMP:n konsentraatio ei muuttunut elävässä solussa samalla tavalla.

Vaikka siis glyko(geno)lyysi itsessään on varsin lyhyt ja suoraviivainen reaktio (ks. kuvio 4), ei sen mallintaminen osana luurankolihasolun toimintaa ole helppoa, sillä siihen vaikuttaa monia tekijöitä. Esimerkiksi ATP, ADP ja AMP vaikuttavat glykolyysin reaktionopeuksiin

(Campbell ja Farrell 2006; Schmitz ym. 2010). Entsyymikatalysoidun reaktion kineettiset parametrit voivat muuttua myös happamuuden vaikutuksesta (Vinnakota, Kemp ja Kushmerick 2006). Lämpötila vaikuttaa reaktioihin eri tavoin, ja energiantuoton hukkalämmön seurauksena lämpötila yleensä nousee, mutta toisaalta elimistö myös kuljettaa sitä pois esimerkiksi verenkierron avulla. Käytännössä lämpötila voidaan olettaa melko vakioksi.

Fysiologiseen oikeellisuuteen pyrkivässä mallinnuksessa on luonnollisesti kiinnitettävä huomio reaktiosarjan välituotteisiin. Jotta glykolyysin välituotteiden määrä saadaan mallinnettua oikealle tasolle, eli melko vakiosuuruiseksi, tarvitaan muiden kuin glykolyysin reaktioihin suoraan liittyvien molekyylien (*ATP, ADP, AMP, P_i, NADH* ja *NAD⁺*) palautevaikutusta välireaktioihin (Liguzinski ja Korzeniewski 2006).

Käänteisreaktion huomioimista voidaan pitää pääsääntöisesti tärkeänä, sillä sen huomioimisella voi olla yllättäviä vaikutuksia (Cornish-Bowden ja Cárdenas 2000). Vinnakota, Kemp ja Kushmerick (2006) suosittelivatkin mallintamaan jokaisen reaktion reversiibeliksi. Kyseinen mallinnus voidaan kuitenkin jättää tekemättä, jos reaktio on selvästi toiseen suuntaan vahvempi (tasapainovakio esimerkiksi 5×10^5), ja mallinnuksessa on olemassa takaisinkytkentä (irreversiibelin) reaktion yli (Cornish-Bowden ja Cárdenas 2000). Takaisinkytkennän mallintamista voidaankin pitää välttämättömänä, mutta käänteisreaktion joissain tapauksissa ei. Toisaalta reversiibelit reaktiot antavat mahdollisuuden mallin validoimiseen termodynamiikan avulla (Lambeth ja Kushmerick 2002). Kaikkien käänteisreaktioiden mallintamissuosituksista, jonka Vinnakota, Kemp ja Kushmerick (2006) antavat, voidaan siis pitää hyvin perusteltuna.

Lihassolun energian tuotto ja kulutus eivät tapahdu välttämättä kovinkaan lähellä toisiaan (katso rakenteen havainnollistus kuvassa 3), mutta Vinnakota ym. (2010) toteavat tutkimuksensa nojalla, ettei se käytännössä haittaa glykolyysin mallintamista, ainakaan mikäli sen ei tarvitse aktivoitua voimakkaasti. Tämän huomioon ottamisen tarpeellisuus (intensiivisen) liikunnan tutkimisen yhteydessä jäi heidän tutkimuksessaan kuitenkin selvittämättä.

Joitain vähemmän merkittäviä fysiologian vastaisia seikkoja voidaan joka tapauksessa jättää huomiotta. Esimerkiksi glykokeenin määrän voidaan olettaa olevan vakio, mikäli tutkitaan lyhyen aikavälin glyko(gen)lyysia (Lambeth ja Kushmerick 2002). Vinnakota, Kemp

ja Kushmerick (2006) jättivät huomiotta pH:n vaikutuksen kreatiinikinaasiin ja adenylaattikinaasiin, sillä he totesivat käytännön vaikutuksen olemattomaksi. 2000-luvulla kehitetyistä simulaatiomalleista löytyy monia muitakin yksinkertaistuksia.

Eri tekijöiden huomioimisen tärkeyttä voidaan arvioida kahdella tavalla. Herkkyysanalyysin avulla voidaan haarukoida, kuinka herkkä tulos on parametrien arvojen muutoksille. Se ei kuitenkaan ota huomioon yhdisteiden määrien vaihteluvälien suuruuksia; esimerkiksi ADP:n määrä voi vaihdella yli 50-kertaisesti lihastyön yhteydessä (Lambeth ja Kushmerick 2002). Tähän ongelmaan auttaa puolestaan faktorianalyysi (Lambeth ja Kushmerick 2002), mutta on huomioitava, että nämä analyysit kuluttavat merkittävästi laskenta-resursseja. Esimerkiksi Lambeth ja Kushmerick (2002) käyttivät siksi fraktionaalifaktorianalyysia (two-level fractional factorial design analysis), sillä se vaati huomattavasti vähemmän (2^4 vs. 2^8) ajokertoja kuin tavallinen faktorianalyysi (two-level factorial design analysis) olisi vaatinut. Tämä tutkielma ei kuitenkaan pureudu näihin analyyseihin syvemmin.

Tutkielmassa oli tarkoituksena tarkastella laskennan vaativuutta, mutta yhdessäkään löydetyssä luurankolihassolun glykolyysin simuloimiseen tähtäävässä tutkimuksessa ei mainittu asian suhteen mitään konkreettista. Vinnakota, Kemp ja Kushmerick (2006) laittoivat simulaationsa lähdekoodin saataville Internetiin, mutta tämän tutkielman tekohetkellä se oli jo ilmeisesti poistettu. Fu, Sabnis ja Harrison (2013) kuitenkin analysoivat kehittämänsä stokastis-deterministisen algoritmin (josta tarkemmin luvussa 3.2) leivinhiivan (*Saccharomyces cerevisiae*) glykolyysillä, joka käsittää 36 reaktiota. Analyysi tehtiin pöytäkoneella, jossa oli suorittimena Intel 15-750 ja muistia 8 Gt. 10 000 sekunnin ($\Delta t = 0,001s$) simuloimiseen kului tutkijoiden kehittämällä algoritmilla 32,37 s, mutta verrokkina käytetty stokastinen menetelmä ei kyennyt glykolyysiä simuloimaan. Tutkimuksessa verrattiin myös erään geeniverkoston simuloimisaikoja. 100 000 sekunnin simuloimiseen kului sekamallilla 67,514 s ja verrokkimallilla 82,844 s. Käytetyt mallit ja algoritmit eivät ole samanlaisia kuin tähän mennessä luurankolihaksen simuloimisessa käytetyt, mutta tulosten perusteella voidaan silti todeta, ettei laskenta-aika ole mikään ongelma, jos simulaation ajaa vain kerran.

Olemassa olevat luurankolihaksen glykolyysimallit itsessään ovat siis sen verran yksinkertaisia, että niiden laskeminen määritetyillä parametrien arvoilla on varsin vauhdikasta (katso myös Vinnakota ym. (2010)). Schmitz ym. (2010) käyttivät Monte Carlo -menetelmää

laskiessaan glyko(geno)lyysimallinsa antamia tuloksia yhteensä 5000 erilaisella parametrien arvoyhdistelmällä. Laskenta-ajan suhteen ongelma muodostuikin pikemminkin suuresta määrästä sellaisia parametreja, joiden arvoa ei tunneta tarkasti, kuin itse mallin simuloinnin raskaudesta. Parametreihin liittyvän epävarmuuden vuoksi niitä arvioitaessa joudutaan tekemään suuri määrä ajoja. Chong ym. (2012) kehittivät parametrien arviointialgoritmin, jota he testasivat leivinhiiavan glykolyysiin. Uusi algoritmi peittosi verrokkialgoritmit sekä nopeudessa että tarkkuudessa, joskin nopeusparannus toiseen verrokkiin oli vain noin 4%.

3.2 Mallintamismenetelmistä

Luurankolihaksen glykolyysin simulointimallit perustuvat tällä hetkellä klassisiin ainemääräreaktionopeusyhtälöihin, jotka ovat deterministisiä (Lambeth ja Kushmerick 2002; Vinnakota, Kemp ja Kushmerick 2006). Näin ollen myös simulointimallit, jotka perustuvat tavallisiin differentiaaliyhtälöihin, ovat deterministisiä (Sabnis ja Harrison 2009; Zwieten ym. 2011; Fu, Sabnis ja Harrison 2013). Tässä suhteessa mallit eivät ole fysiologisesti todennukaisia, sillä ne eivät kykene ottamaan huomioon solun aineenvaihduntareaktioihin liittyvää heiluntaa; esimerkiksi entsyymi katalysoi reaktiota vain, mikäli sen kohdalle osuu sopivasti tarvittavat substraatit (Tapana 2010). Erityisesti (lähinnä) pienillä konsentraatioilla deterministinen malli ei anna oikeita tuloksia, sillä heilunta on suurta suhteessa keskimääräiseen reaktionopeuteen. (Sabnis ja Harrison 2009).

Aineenvaihdunnan simuloimiseksi on myös kehitetty ns. stokastisia menetelmiä, jotka ottavat siihen liittyvän satunnaisuuden huomioon (Fu, Sabnis ja Harrison 2013). Molekyylien määrän kasvaessa sattuman osuus kuitenkin pienenee (esim. Sabnis ja Harrison (2009)), ja koska luurankolihaksen energiankulutus on levossakin varsin suurta (millimoolin suuruusluokkaa, Vinnakota, Kemp ja Kushmerick (2006)), pitäisi determinististen mallien olla riittäviä sen energiantuoton mallintamiseen.

Zwieten ym. (2011) huomauttavat kuitenkin, että uusimpien tietojen mukaan myös glykolyysin tyypiset reaktiosarjat ovat hyvin lokeroituneita jopa solulimassa, ja glykolyysin osalta tämä pätee usein ainakin kasvi- ja alkueliösoluihin. Heidän mukaansa lokeroitumisilmiö vähentää huomattavasti mahdollisia samanaikaisia molekyylien vuorovaikutuksia, mikä saat-

taa aiheuttaa suurta satunnaisuutta. Toisaalta he toteavat tulostensa nojalla, että glykolyysin tapauksessa reaktioiden reversibiliteetti ja palautemekanismit vaimentavat merkittävästi tilastollista heiluntaa, minkä nojalla tavallisia differentiaaliyhtälömalleja voidaan pitää perusteltuina glykolyysin simuloimisessa.

Deterministiset mallit ovat varsin tehokkaita laskennallisesti, kun taas stokastisissa malleissa on ongelmana niiden hitaus (Fu, Sabnis ja Harrison 2013). Stokastisten mallien hitaus johtuu paljolti vaatimuksesta generoida suuria määriä satunnaislukuja sekä suorittaa useita simulaatioita (Sabnis ja Harrison 2009). Glykolyysin mallintamisen kannalta on myös ongelmallista, että reaktiot noudattavat Michaelis–Menten-tyyppistä kinetiikkaa. Koska stokastiset mallit vaativat alkeisreaktioita, on tyypillinen glykolyysin entsyymien katalysoima reaktio hajotettava mallissa useampaan osaan, mikä paitsi aiheuttaa mittausongelmia, myös lisää laskenta-aikaa entisestään (Sabnis ja Harrison 2009).

Mikäli (osittain) stokastisille malleille tulee kuitenkin tarve (ks. esim. Zwieten ym. (2011)), mutta laskenta-aika tuottaa ongelmia, tarjoaa mahdollisen ratkaisun leivinihiivan glykolyysillä testattu "risteymämalli" (crossover method), jonka kehittivät Fu, Sabnis ja Harrison (2013). Kyseinen malli lisää satunnaisuutta muuten deterministiseen malliin siten, että se ottaa joustavasti satunnaisuuden huomioon lähinnä, kun sitä pienillä konsentraatioilla tarvitaan (Sabnis ja Harrison 2009). Malli vähentää vaativien simulaatioiden laskenta-aikaa puhtaasti stokastisiin malleihin nähden ja, toisin kuin stokastisten ja determinististen mallien hybridit, soveltuu myös sellaisiin tilanteisiin, joissa konsentraatio voi simulaation aikana vaihdella hyvin pienestä suureen (Sabnis ja Harrison 2009).

Yksinkertaistetut mallit, jotka tarkastelevat ainoastaan alku- ja lopputuotteita, eivät puolestaan tietenkään anna niiden simuloimasta reaktio(sarja)sta uutta tietoa. Niilläkin on kuitenkin paikkansa, kun halutaan tutkia tarkemmin tiettyä ilmiötä osana laajempaa kokonaisuutta. Esimerkiksi Vinnakota ym. (2010) käyttivät glykolyysin tutkimisen apuna yksinkertaistettua empiiristä mallia mitokondrion toiminnasta, ja mallia voidaan pitää käyttötarkoitukseensa riittävän tarkkana. Todellisuudessa mitokondrion toiminta on varsin monimutkaista, mutta melko suljettua (Tapana 2010).

3.3 Nykymallien todenmukaisuus

Luurankolihasen glykolyysiä on simuloitu toistaiseksi vain differentiaaliyhtälömalleilla, ja kaikki nykyiset mallit perustuvat malliin, jonka julkaisivat Lambeth ja Kushmerick vuosituhannen alussa. Malli sisälsi glyko(geno)lyysin lisäksi yhtälöt adenylaattikinaasille, kreaatiinikinaasille ja ATPaasille (kuva 5). Ilman ATPaasia malli muodostaa suljetun systeemin, mutta sen tasapaino on kaukana fysiologisesta tilasta. Lambeth ja Kushmerick (2002) eivät varsinaisesti verranneetkaan mallia empiirisiin tuloksiin. Sen sijaan he vahvistivat mallinsa periaatteellisen toimivuuden simuloimalla glyko(geno)lyysiä, kunnes se saavutti tasapainotilan (jonka suljettu systeemi aina saavuttaa). ATPaasin lisäämisellä ja parilla muulla muunnoksella simulaatio kuitenkin saatiin fysiologisesti mielekkääksi.

Vinnakota, Kemp ja Kushmerick (2006) lisäsivät Lambethin ja Kushmerickin malliin positiivisten vetyionien eli protonien huomioimisen. Protonit aiheuttavat happamuuden, ja happamuudella on merkittävä vaikutus useisiin biokemiallisiin reaktioihin (Campbell ja Farrell 2006). Malliaan Vinnakota, Kemp ja Kushmerick (2006) vertasivat empiirisiin in vitro -tuloksiin, jotka oli saanut aiemmin Scopes (1973). Tulokset olivat suurimmalta osin joko hyvin lähellä vertailutuloksia tai oikean suuntaisia niihin nähden. Huomionarvoista on, että tutkijoiden täytyi tuloksiinsa säätää vain muutamaa parametria, ja tutkimuksen päätavoitteena oli osoittaa mallin periaatteellinen toimivuus. Mallissa oli myös jokin verran yksinkertaistuksia, joiden vaikutuksen tutkimuksen tekijät katsoivat vähäisiksi. Malliin käytetty data oli kerätty in vitro -kokeista siten, että se oli riippumaton mallin tuloksien vertailuun käytetyn datan kanssa.

In vivo -tilanteeseen sovellettu pH:n dynaamisen vaikutuksen huomioiva glyko(geno)lyysimalli ei kuitenkaan antanut samassa määrin mittauksia vastaavia tuloksia (Vinnakota ym. 2010), ja vahvisti siten osaltaan, ettei lopullisia päätelmiä voi välttämättä tehdä in vitro -kokeiden nojalla. Mallin laajentaminen mm. kalsium-kalmoduliinin huomioon ottavaksi antoi myöhemmin empiiristen mittausten mukaiset, eli virhemarginaalin sisään mahtuvat, tulokset (Schmitz ym. 2013).

3.4 Glyko(geno)lyysimallien soveltamista ja laajentamista

Glykolyysin simuloimista 2000-luvulla voidaan pitää varsin onnistuneena. Se on vahvistanut hypoteeseja, jotka pelkästään empiirisiin kokein olisi hyvin vaikea todentaa (esim. Schmitz ym. (2013)). Tyypillisesti tutkimuksissa on tehty simulaatioissa käytetystä datasta riippumaton empiirinen koe, jonka tuloksiin simulaatiota on verrattu.

Vinnakota ym. (2010) vahvistivat mallillaan oikeaksi hypoteesin, jonka mukaan happamuuden lähde lihassolussa on ATPaasi. Laajalle levinnyt käsitys glykolyysistä happamuuden aiheuttajana siis kumottiin; glykolyyttinen ATP:n tuotto ei itsessään aiheuta solun happamoitumista (protonien määrän kasvua), sillä pyruvaatista muodostuu hyvin tehokkaasti laktaattia, joka sitoo glukoosista vapautuneet protonit (Vinnakota ym. 2010). Sen sijaan happamuutta vähentää tutkijoiden mukaan mitokondrion happea käyttävä energiantuottotapa siten, että protonien tuotto ja käyttö on tasapainossa hapellisen energiantuoton oloissa.

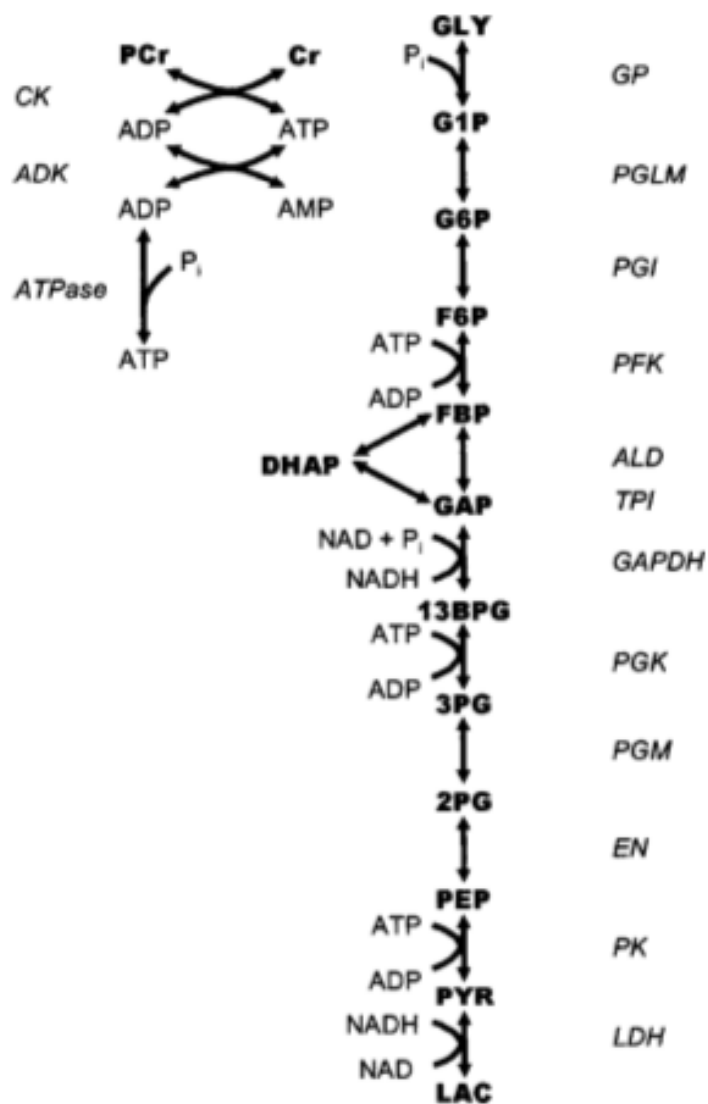
Lambeth ja Kushmerick (2002) totesivat glykolyysin analysoimisen suljettuna systeiminä olevan hedelmätöntä, sillä reaktiosarjan tasapainotila on kaukana fysiologisista rajoista. Vaikka eristettyjen reaktioiden simuloiminen ei annakaan välttämättä fysiologisesti oikeita tuloksia (ks. esim. Vinnakota ym. (2010)), huomauttavat kuitenkin Beard, Bassingthwaighte ja Greene (2005), että sellainen voi silti antaa olennaista uutta tietoa tutkittavasta ilmiöstä.

Schmitz ym. (2010) tekivät yhdistetyn kokeellisen ja simulaatiotutkimuksen glykolyysin säätelystä tilanteessa, jossa lihas lopettaa energiankäytön (liikkeen tuottamisen). Malli ei ottanut huomioon happamuutta. Verrokkina toimineessa empiirisessä kokeessa tämä otettiin huomioon siten, että tuloksia tarkasteltiin vain niiltä osin, kuin epäorgaanisen fosfaatin, kreaattifosfaatin, ADP:n ja AMP:n määrät olivat lähellä lepotasoa. Simulaatio osoitti, että happamuus ei riitä selittämään glykolyysin vaimenemista liikunnan yhteydessä, vaan ainakin fosfofruktokinaasiin ja pyruvaattikinaasiin on kohdistuttava muitakin säätelymekanismeja.

Myöhemmin osittain sama tutkimusryhmä (Schmitz ym. 2013) tutki glykolyysin säätelyä yhdistämällä jälleen empiirisen kokeen simulointiin. Tutkijat käyttivät pohjanaan uudempaa suljetun glyko(geno)lyysin mallia (Vinnakota, Kemp ja Kushmerick 2006) muutamin muokkauksin, joista mainittakoon simulaation perusteella erään entsyymiyhtälön (glykogeenifosforylaasi) korvaaminen empiirisiin tuloksiin, sekä edellä mainitun fosfofruktokinaasin yhtälön

vaihtaminen in vivo -ympäristöön sopivammaksi. Simulaatio vahvisti toimivaksi hypoteesin, jonka mukaan glykolyysin tutkimuksessa rajatun käyttäytymisen selittää lihassupistukseen liittyvän kalsium-kalmoduliinin vaikutus fosfofruktokinaasin toimintaan.

Vinnakota ym. (2010) saivat samansuuntaisen tuloksen kuin Schmitz ym. (2010) tutkimuksessaan, jossa he yhdistivät hiiren kahden erityyppisen (ns. nopean ja hitaan) lihaksen empiiriset tutkimustulokset simulointiin. He osoittivat että AMP ei ole riittävä glykolyysin palautemekanismi elävässä lihassolussa, jos lihas on aktiivinen. Tutkijat tulivat johtopäätökseen, että lihassupistukseen liittyvä kalsiumionin toiminta on tärkeä glyko(geno)lyysin säätelymekanismi.



Kuvio 5. Yksinkertaistettu esitys Lambethin ja Kushmerickin kehittämästä mallista (Lambeth ja Kushmerick 2002). Kaksisuuntainen nuoli kuvastaa reversiibeliä reaktiota. Reaktion vieressä on sitä katalysoivan entsyymin englanninkielinen nimi lyhennettynä. GLY = glykogeeni; PYR = pyruvaatti; LAC = laktaatti; ATPase = ATPaasi; PCr = kreatiinifosfaatti; CK = kreatiinikinaasi; ADK = adenylyattikinaasi.

4 Yhteenveto

Differentiaaliyhtälömallinnukset näyttäisivät soveltuvan hyvin luurankolihasolun glyko(geno)lyysin mallintamiseen deterministisyyden periaatteellisesta epäfysiologisuudesta huolimatta. Ne ovat kohtalaisen nopeita laskea, ja tarkkuuteen vaikuttaa pikemminkin mallin laajuus, parametrien arvojen saatavuus (mittaustarkkuus ja lähde) ja parametrien arviointi kuin itse mallien puutteet.

Jos tavoitteena on uuden tiedon saaminen, voidaankin tässä käsiteltyjä deterministisiä differentiaaliyhtälöitä pitää minimivaatimuksena. Jäljittely voi onnistua hyvin yksinkertaisillakin malleilla riittävän tarkasti, mutta se ei tietenkään tuo kyseisestä ilmiöstä uutta tietoa. Toki voi hyvin riittää mallintaa kohteena oleva reaktio tarkasti ja muut hyvinkin yksinkertaisesti, joten niilläkin on paikkansa.

Tarkastelluissa luurankolihasen glyko(geno)lyysiä simuloivissa tutkimuksissa ei otettu juurikaan kantaa laskennan vaatimuksiin. Laskenta-ajan suhteen suurimpana ongelmana voidaan kuitenkin pitää parametrien arviointia. Empiirisiin mittaustuloksiin liittyy aina jonkinasteinen epätarkkuus, ja toisaalta etenkin elävässä solussa sattumallakin saattaa olla merkittävä vaikutus, minkä vuoksi käytettäville parametreille saadaan yleensä jonkinlainen melko suurikin vaihteluväli.

Toinen ongelma on ylipäättään löytää mitattuja arvoja mallien vaatimille parametreille. Tutkimuksissa käytetyt parametrit on vaihtelevasti kerätty eri nisäkäslajeilla tehdyistä in vivo ja in vitro -kokeista. Parametrien arvot voivat vaihdella lajikohtaisesti.

Kaiken kaikkiaan 2000-luvulla kehitetyt simulaatiomallit ovat vahvistaneet muutamia empiirisesti hyvin vaikeasti todennettavia hypoteeseja, joten simuloimista voidaan pitää onnistuneena.

Lähteet

- Beard, Daniel A., James B. Bassingthwaite ja Andrew S. Greene. 2005. "Computational modeling of physiological systems". *Physiological Genomics* 23 (1): 1–3. ISSN: 1094-8341. doi:10.1152/physiolgenomics.00117.2005.
- Campbell, Mary K., ja Shawn O. Farrell. 2006. *Biochemistry*. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole.
- Chong, C. K., M. S. Mohamad, S. Deris, S. Shamsir, A. Abdullah, Y. W. Choon, L. E. Chai ja S. Omatu. 2012. *Using an improved differential evolution algorithm for parameter estimation to simulate glycolysis pathway*. Nide 151 AISC, 709–716. Advances in Intelligent and Soft Computing.
- Cornish-Bowden, A., ja ML Cárdenas. 2000. "10 Irreversible reactions in metabolic simulations: how reversible is irreversible?"
- Fu, G., A. Sabnis ja R. W. Harrison. 2013. "A deterministic-stochastic crossover algorithm for simulation of complex biochemical systems". Teoksessa *2013 IEEE 3rd International Conference on Computational Advances in Bio and Medical Sciences, ICCABS 2013*.
- Garfinkel, D., R. A. Frenkel ja L. Garfinkel. 1968. "Simulation of the detailed regulation of glycolysis in a heart supernatant preparation". *Computers and Biomedical Research* 2 (1): 68–91.
- Karhumäki, Eliisa, Mari Lehtonen, Kari Nieminen ja Marja Syrjäkallio-Ylitalo. 2006. *Päästä varpaisiin*. Helsinki: Edita.
- Lambeth, M. J., ja M. J. Kushmerick. 2002. "A computational model for glycogenolysis in skeletal muscle". *Annals of Biomedical Engineering* 30 (6): 808–827.
- Liguzinski, P., ja B. Korzeniewski. 2006. "How to keep glycolytic metabolite concentrations constant when ATP/ADP and NADH/NAD⁺ change". ID: 1, *Systems Biology, IEE Proceedings* 153 (5): 332–334.
- McArdle, William D., Frank I. Katch ja Victor L. Katch. 2010. *Exercise Physiology, Energy, Nutrition and Human Performance*. Baltimore: Lippincott Williams et Wilkins.

- Pullinen, Teemu. 2011. *Kuormitusfysiologia 1 kurssin luentokalvot 2011*. Alkuperäinen lähde Sahlin et al. 1985.
- Reece, Jane B., Lisa A. Urry, Michael L. Cain, Steven A. Wasserman, Peter V. Minorsky ja Robert B. Jackson. 2011. *Campbell Biology*. San Francisco, CA: Pearson Benjamin Cummings.
- Sabnis, A., ja R. W. Harrison. 2009. "A novel deterministic-stochastic crossover method for simulating biochemical networks". Teoksessa *2009 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine, BIBM 2009*, 315–320.
- Schmitz, J. P. J., W. Groenendaal, B. Wessels, R. W. Wiseman, P. A. J. Hilbers, K. Nicolay, J. J. Prompers, J. A. L. Jeneson ja N. V. W. van Riel. 2013. "Combined in vivo and in silico investigations of activation of glycolysis in contracting skeletal muscle". *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 304 (2): C180–C193.
- Schmitz, J. P. J., N. A. W. Van Riel, K. Nicolay, P. A. J. Hilbers ja J. A. L. Jeneson. 2010. "Silencing of glycolysis in muscle: Experimental observation and numerical analysis: Experimental Physiology-Research Paper". *Experimental physiology* 95 (2): 380–397.
- Scopes, R. K. 1973. "Studies with a reconstituted muscle glycolytic system. The rate and extent of creatine phosphorylation by anaerobic glycolysis". *Biochemical Journal* 134 (1): 197–208.
- Tapana, Pentti. 2010. *Elävä solu*. Helsinki: Gaudeamus.
- Vinnakota, K. C., J. Rusk, L. Palmer, E. Shankland ja M. J. Kushmerick. 2010. "Common phenotype of resting mouse extensor digitorum longus and soleus muscles: Equal ATPase and glycolytic flux during transient anoxia". *Journal of Physiology* 588 (11): 1961–1983.
- Vinnakota, K., M. L. Kemp ja M. J. Kushmerick. 2006. "Dynamics of muscle glycogenolysis modeled with pH time course computation and pH-dependent reaction equilibria and enzyme kinetics". *Biophysical journal* 91 (4): 1264–1287.
- Zwieten, D. A. J. Van, J. E. Rooda, D. Armbruster ja J. D. Nagy. 2011. "Simulating feedback and reversibility in substrate-enzyme reactions". *European Physical Journal B* 84 (4): 673–684.