

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ

**ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ
ΣΤΗΝ ΙΣΟΜΕΤΡΙΚΗ ΤΑΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ
ΜΥΙΚΩΝ ΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ t-Jump.**

της Πηνελόπης Κ. Αμοιρίδου

Μεταπτυχιακή Διατριβή που υποβάλλεται στο καθηγητικό σώμα για τη μερική
εκπλήρωση των υποχρεώσεων απόκτησης του μεταπτυχιακού τίτλου του
Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Άσκηση και Υγεία» του Τμήματος
Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Εγκεκριμένο από το καθηγητικό σώμα

1^{ος} Επιβλέπων καθηγητής: Καρατζαφέρη Χριστίνα

2^{ος} Επιβλέπων καθηγητής: Κουτεντάκης Ιωάννης

3^{ος} Επιβλέπων καθηγητής: Γιάκας Ιωάννης

2014

© ΑΜΟΙΡΙΔΟΥ ΠΗΝΕΛΟΠΗ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η αξιολόγηση της μυϊκής λειτουργίας με βάση απομονωμένα μυϊκά παρασκευάσματα (πχ δεσμίδες μυϊκών ινών ή απομονωμένες ίνες) συνήθως πραγματοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η επίδραση όμως της θερμοκρασίας στις λειτουργικές παραμέτρους του μυός και συγκεκριμένα στην ισομετρική τάση είναι σημαντική. Η μελέτη της επίδρασης αυτής αποτελεί πεδίο ευρείας επιστημονικής έρευνας με διαφορετικές προσεγγίσεις όσον αφορά την μεθοδολογία και την τεχνική από κάθε μελετητή. Η τεχνική των αλμάτων θερμοκρασίας σε απομεμβρανωμένες μυϊκές ίνες αποτελεί μια τεχνική των τελευταίων είκοσι ετών με μεγάλη συμβολή στο συγκεκριμένο πεδίο έρευνας. Επί το πλείστον η τεχνική αυτή πραγματοποιείται με άλματα θερμοκρασίας σε χαμηλές, μη φυσιολογικές θερμοκρασίες [πχ 10 προς 15, 15 προς 22 έως το πολύ 25 βαθμών Κελσίου ($^{\circ}\text{C}$)]. Για την αποτίμηση της λειτουργίας του μυός σε φυσιολογικές θερμοκρασίες χρησιμοποιούνται προβλέψεις με βάση μαθηματικούς υπολογισμούς. Επειδή, κάποιες πρόσφατες μεμονωμένες μελέτες με άλματα ως τους 30 $^{\circ}\text{C}$ απέρριψαν αποτελέσματα παλαιότερων μελετών που είχαν πραγματοποιηθεί μόνο σε χαμηλές θερμοκρασίες οι οποίες απείχαν κατά πολύ από την φυσιολογική υπάρχει αναζωπυρωμένο ενδιαφέρον για την βελτίωση των τεχνικών αλμάτων θερμοκρασίας και την δυνατότητα για μέτρηση της μυϊκής λειτουργίας σε θερμοκρασίες που πλησιάζουν την φυσιολογική ($>30^{\circ}\text{C}$).

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ισομετρική τάση απομονωμένων μυϊκών ινών σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών με την τεχνική των αλμάτων θερμοκρασίας φθάνοντας σε υψηλότερες τιμές από ό,τι συνήθως πραγματοποιούνται. Η μελέτη αυτή αποτελεί την πρώτη μελέτη τέτοιου είδους που πραγματοποιείται στο εργαστήριο ΚΕΑΦΑ-τομέας Φυσιολογίας και Μηχανικής του Μυός της ΣΕΦΑΑ του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Έτσι, ένα προσδοκώμενο όφελος της εργασίας ήταν η επιτυχής εγκατάσταση της συγκεκριμένης πειραματικής προσέγγισης στο συγκεκριμένο εργαστήριο.

Μεθοδολογία: Η μελέτη έλαβε την έγκριση της Εσωτερικής Επιτροπής Δεοντολογίας του ΣΕΦΑΑ, ΠΘ. Χρησιμοποιήθηκαν μυϊκές ίνες από ψοίτη σκελετικό μυ κοινών Ευρωπαϊκών κονίκλων, οι οποίοι θυσιάστηκαν ακολουθώντας τους διεθνείς κανόνες ευθανασίας. Μετά την συλλογή του δείγματος, δεσμίδες ινών υπέστησαν χημική επεξεργασία σε διάλυμα 50% γλυκερόλης και 120 mM KAc, 50mM MOPS, 5mM MgAc₂, 4mM EGTA, pH 7 για 24 ώρες στους 4 $^{\circ}\text{C}$ ώστε το σαρκεύλημμα να γίνει διαπερατό και κατόπιν αποθηκεύθηκαν σε ίδιας σύστασης φρέσκο διάλυμα στους -20 $^{\circ}\text{C}$ έως την μηχανική τους αξιολόγηση. Επιμέρους μυϊκές ίνες απομονώθηκαν ανατομικά από τις δεσμίδες παρουσία γλυκερόλης στους 4 $^{\circ}\text{C}$. Η κάθε ίνα προσαρτήθηκε σε ειδικό δυναμόμετρο SI Heidelberg/WPI και πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της ισομετρικής της τάσης με πλήρη ενεργοποίηση στους 10 $^{\circ}\text{C}$. Κατόπιν αξιολογήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην ισομετρική τάση με άλματα θερμοκρασίας χρησιμοποιώντας ως αρχική θερμοκρασία αυτή των 10 $^{\circ}\text{C}$ και ως δεύτερη μια υψηλότερη θερμοκρασία, διαφορετική κάθε φορά. Στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκαν ως δεύτερες θερμοκρασίες οι θερμοκρασίες των 15, 20, 30 και 35 $^{\circ}\text{C}$ δημιουργώντας έτσι 4 ζεύγη αλμάτων θερμοκρασίας κατά τα οποία καταγράφηκε η ισομετρική τάση. Το βασικό διάλυμα ακαμνίας περιείχε σε mM: 120 KAc, 50 MOPS, 5 MgAc₂, 1 EGTA, pH 7. Το διάλυμα χάλυσης επιτεύχθηκε με την προσθήκη 5 mM ATP. Πλήρης ενεργοποίηση επιτεύχθηκε με την προσθήκη 1,1 mM CaCl₂.

Αποτελέσματα: Αξιολογήθηκαν 122 απομεμβρανωμένες μυϊκές ίνες με μέσο μήκος 2,26 mm (SD=0,67) και μέση διάμετρο 83,2 μm (SD=20,3). Ο έλεγχος κανονικότητας (Tests of Normality Kolmogorov-Smirnov) έδειξε ότι τα δεδομένα της μεταβολής της τάσης (αρχική – τελική) δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Έτσι η επίδραση της θερμοκρασίας στην ισομετρική τάση των μυϊκών ινών εξετάστηκε χρησιμοποιώντας μη παραμετρικό τεστ Kruskal Wallis. Βρέθηκε λοιπόν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση της θερμοκρασίας στην ισομετρική τάση. Στην συνέχεια εκτελέστηκε μη παραμετρικό τεστ για ανεξάρτητα δείγματα Mann Whitney για να εντοπιστούν οι διαφορές ανάμεσα στις 4 συνθήκες μεταβολής (ανάλυση post hoc). Πραγματοποιήθηκαν 6 τεστ Mann Whitney για συγκρίσεις μεταξύ των 4 συνθηκών. Για να αποφευχθεί πιθανό σφάλμα τύπου α λόγω των πολλαπλών συγκρίσεων πραγματοποιήθηκε διόρθωση Bonferroni [διαιρώντας το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ($p=0,05$) με τον αριθμό των συγκρίσεων (6)]. Έτσι το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας για αυτές τις συγκρίσεις ορίστηκε το $0,05/6= 0,008$. Με βάση τα παραπάνω η μεταβολή της τάσης με το άλμα 10-15 $^{\circ}\text{C}$ δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά από την μεταβολή τάσης στην συνθήκη 10-20 $^{\circ}\text{C}$ ($p>0,008$) ενώ διέφερε στατιστικά σημαντικά από την συνθήκη 10-30 $^{\circ}\text{C}$ και 10-35 $^{\circ}\text{C}$, $p<0,008$. Επίσης η μεταβολή της τάσης στην συνθήκη 10-20 $^{\circ}\text{C}$ διέφερε στατιστικά σημαντικά από την συνθήκη 10-30 $^{\circ}\text{C}$ και 10-35 $^{\circ}\text{C}$, $p<0,008$. Τέλος η μεταβολή της τάσης κατά την συνθήκη 10-30 $^{\circ}\text{C}$ δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά από την συνθήκη 10-35 $^{\circ}\text{C}$ ($p>0,008$).

Συμπεράσματα: Παρατηρήθηκε συνολικά σημαντική επίδραση της θερμοκρασίας με διαφοροποιήσεις στα διάφορα επίπεδα θερμοκρασίας που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αποτυπώνοντας την σημαντική επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη ισομετρικής τάσης. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν με επιτυχία μετρήσεις σε φυσιολογική θερμοκρασία 35 $^{\circ}\text{C}$. Για πρώτη φορά πραγματοποιήθηκε μελέτη αλμάτων θερμοκρασίας σε απομεμβρανωμένες μυϊκές ίνες στο εργαστήριο ΚΕΑΦΑ της ΣΕΦΑΑ του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας συμφωνούν με την διεθνή βιβλιογραφία φανερώνοντας ότι η μέθοδος εγκαταστάθηκε με επιτυχία στο εργαστήριο φυσιολογίας της ΣΕΦΑΑ και θέτοντας τα θεμέλια για την έναρξη νέων έγκυρων μελετών με την μέθοδο των απομεμβρανωμένων μυϊκών ινών και ειδικότερα των αλμάτων θερμοκρασίας στο συγκεκριμένο εργαστήριο.

Λέξεις κλειδιά: απομονωμένες μυϊκές ίνες, σκελετικός μυς, άλματα θερμοκρασίας, ισομετρική τάση, μυϊκή συστολή

ABSTRACT

Introduction: Usually assessments of muscle's functional parameters as performed on isolated skinned muscle fibres are restricted in low, unphysiological temperatures, due to the sensitivity of the preparation. The effect of temperature on the functional parameters of muscle, especially on isometric tension, is a field of broad scientific research with different methodological and technical approaches. The technique of temperature jumps (t-jump) in skinned muscle fibers is a technique of the last twenty years with significant contribution in this specific scientific field as it allows for rapid and repeated assessments of skinned fiber mechanical properties. This technique is usually performed with temperature jumps in low, non physiological temperatures [e.g. 10 to 15, 15 to 22 or up to 25 degrees Celcius ($^{\circ}\text{C}$)]. For the assessment of muscle function in physiological temperatures, predictions based on mathematical calculations are used. Some recent isolated studies with jumps up to 30 $^{\circ}\text{C}$ have rejected results from previous studies which had been performed only in low temperatures, far below the physiological ones, and therefore there is a revived interest in improvement of t-jump techniques and measurement of muscle function in temperatures approaching the physiological temperature ($>30^{\circ}\text{C}$).

Aim: The purpose of this study was to estimate the effect of temperature on isometric tension of skinned muscle fibers in a broad spectrum of temperatures using the technique of t-jump, reaching higher temperatures than usually tested. This is the first study using t-jumps that has been conducted in the Muscle Physiology and Mechanics Laboratory of the Center of Research and Evaluation of Human Performance (CREHP) at the School of Physical Education and Sport Science (SPESS) of the University of Thessaly. One of the expected outcomes of our study was the successful installation of the particular experimental system in the aforementioned laboratory.

Methods: Psoas skeletal muscle fibers from the Common European Rabbit have been used. The study had received the approval of the Internal Ethics Committee of the DPESS, University of Thessaly. The animals were sacrificed according to international rules of euthanasia. After sample collection bundles of muscle fibres were chemically skinned in a solution consisting of 50% glycerol and 120 mM KAc, 50mM MOPS, 5mM MgAc₂, 4mM EGTA, pH 7 for 24 hours at 4 $^{\circ}\text{C}$. Afterwards the bundles were stored in fresh solution of identical composition at -20 $^{\circ}\text{C}$ until their mechanical testing. Muscle fibers were anatomically isolated from the bundles in glycerol solution at 4 $^{\circ}\text{C}$. Each muscle fibre was attached to a special dynamometer (SI Heidelberg/WPI) and its isometric tension was measured upon activation at 10 $^{\circ}\text{C}$. The effect of temperature on tension was assessed with t-jumps from the basal temperature of 10 $^{\circ}\text{C}$ and to a second higher temperature different each time. In this study we used 4 different temperatures, 15, 20, 30 και 35 $^{\circ}\text{C}$. We thus recorded isometric tension of muscle fibers in 4 different temperature jumps. The basic rigor solution consisted of (mM): 120 KAc, 50 MOPS, 5 MgAc₂, 1 EGTA, pH 7. Relaxing solution was achieved with addition of 5mM ATP. Activating solution was achieved with addition of 1,1 mM CaCl₂.

Results: 122 skinned muscle fibers with mean length 2,26mm (SD=0,67) and mean diameter 83,2 μm (SD=20,3) have been examined. The change in tension due to a t-jump was calculated as delta-changes (to account for inevitable baseline variation). Application of the normality test Kolmogorov-Smirnov showed that the delta-change data did not follow a normal distribution. So the impact of temperature on isometric

tension of muscle fibers was tested using the non-parametric Kruskal Wallis test. A significant main effect of temperature was found ($p < 0.05$). Subsequently 6 non-parametric Mann Whitney for independent samples test were performed to assess the differences between the four conditions. To avoid possible type α error due to multiple comparisons a Bonferroni correction has been performed [by dividing the level of statistic significance (0,05) to the number of comparisons (6)]. The new level of statistic significance was set as $0,05/6 = 0,008$. According to this new level, the tension change with the condition 10-15 °C did not differ significantly from the condition 10-20 °C ($p > 0,008$), while it differed significantly from the conditions 10-30 °C and 10-35 °C ($p < 0,008$). Additionally the tension change with the condition 10-20 °C differed significantly from the condition 10-30 °C and 10-35 °C ($p > 0,008$). Finally the condition 10-30 °C did not differ significantly from the condition 10-35 °C ($p > 0,008$).

Conclusions: In general a significant main effect of temperature was observed on isometric tension over a broad spectrum of values. Measurements in the physiological temperature of 35 °C were successfully performed. This was the first fully study using t-jumps in skinned muscle fibers that was performed in the Laboratory of CREHP at the SPESS of the University of Thessaly. The findings of our study are in accordance to the limited international literature, adds to it by expanding to a higher than before temperature and show that the experimental system was successfully installed in the Laboratory of Physiology of SPESS. This sets the basis for new reliable studies using the method of skinned muscle fibers and especially the technique of t-jump in this laboratory.

Keywords: *skinned muscle fibers, striated muscle, temperature jumps, isometric force, muscle contraction.*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους αυτούς που έπαιξαν ουσιαστικό ρόλο στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Στην επιβλέπουσα καθηγήτρια κυρία Χριστίνα Καρατζαφέρη ουσιαστική της καθοδήγηση, το ειλικρινές ενδιαφέρον και την πολύτιμη βοήθειά της σε κάθε βήμα της διατριβής μου, από το σχεδιασμό μέχρι την υλοποίηση, τη συγγραφή αλλά και την παρουσίαση, καθώς και την υποστήριξη της σε επίπεδο διαπροσωπικών σχέσεων και επιστημονικών προβληματισμών.

Ευχαριστώ τον υπεύθυνο του τομέα Κινησιολογίας κ. Γιώργο Σακκά και συνολικά το ΙΕΤΕΘ/ΕΚΕΤΑ για την χρήση του εξειδικευμένου εξοπλισμού μικροδυναμομετρίας απομονωμένων μυϊκών ινών που φιλοξενείται στο εργαστήριο ΚΕΑΦΑ του ΤΕΦΑΑ/ΣΕΦΑΑ, ΠΘ.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη Δρ Νατάσα Καλύβα (πρώην μέλος της ομάδας Φυσιολογίας και Μηχανικής του Μυός) η οποία που συνέβαλε στην αρχική μου εκπαίδευση.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην υποψήφια διδάκτορα Γεωργία Μήτρου, για την ηθική υποστήριξή της και τη συμβολή της στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης βοήθεια της τόσο κατά την συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων όσο και στην τελική προετοιμασία του κειμένου.

Ευχαριστώ επίσης τους υπεύθυνους καθηγητές κύριο Ιωάννη Κουτεντάκη και Ιωάννη Γιάκα και τους καθηγητές και το προσωπικό άλλων επιστημονικών πεδίων που ήταν πάντα πρόθυμοι να με βοηθήσουν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τη γραμματέα του μεταπτυχιακού προγράμματος κυρία Μαρία Κουτσιανίτη για τη άμεση εξυπηρέτηση σε κάθε γραφειοκρατική διαδικασία.

Τέλος από καρδιάς ευχαριστώ το σύζυγό μου Γιώργο για την υπομονή, συμπαράσταση, αγάπη και συνεχή κατανόηση που έδειξε όλο το χρονικό διάστημα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT.....	5
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	7
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Σκοπός.....	10
1.2 Σημαντικότητα της ερευνητικής μελέτης.....	10
1.3 Ερευνητικές υποθέσεις.....	11
1.4 Περιορισμοί έρευνας.....	11

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	
2.1 Δομή και φυσιολογία του σκελετικού μυός.....	12
2.2 Μυϊκή ίνα.....	13
2.3 Οι πρωτεΐνες των μυϊκών ινών.....	18
2.4 Τύποι μυϊκών ινών.....	34
2.5 Η υπόθεση των συρόμενων νηματίων-ο κύκλος της εγκάρσιας γέφυρας...37	
2.6 Είδη μυϊκής συστολής.....	41

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

Η ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗ ΜΥΙΚΗ ΤΑΣΗ

3.1 Λειτουργικές –μηχανικές ιδιότητες του σκελετικού μυός.....	42
3.1.1 Μυϊκή δύναμη.....	42
3.1.2 Μυϊκά δυναμόμετρα.....	44
3.2 Επίδραση της θερμοκρασίας στις χημικές αντιδράσεις και στις λειτουργικές ιδιότητες του σκελετικού μυός.....	45
3.3 Μοντελοποίηση της επίδρασης της θερμοκρασίας.....	45
3.3.1 Συντελεστής Q10.....	46
3.3.2 Εξίσωση Arrhenius.....	46
3.3.3 Εξίσωση Van't Hoff.....	48
3.4 Πρότυπα μελέτης επίδρασης της θερμοκρασίας στη συστολή του σκελετικού μυός.....	48
3.5 Η επίδραση της θερμοκρασίας στη μυϊκή συστολή.....	50

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

4.1 Προετοιμασία μυϊκών ινών.....	55
-----------------------------------	----

4.2 Διαλύματα.....	55
4.3 Διαχωρισμός μυϊκών ινών.....	55
4.4 Σύστημα μελέτης t-jump για απομεμβρανωμένες μυϊκές ίνες.....	56
4.5 Περιγραφή πειράματος.....	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΤΟ	
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	64
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	69
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1.....	79
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2.....	80
ΕΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΒΙΟΗΘΙΚΗΣ & ΔΕΟΝΤΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ	
ΣΕΦΑΑ ΤΡΙΚΑΛΩΝ	
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3.....	81

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μύες είναι μοριακές μηχανές που μετατρέπουν την χημική ενέργεια από τη διάσπαση του ATP σε κινητική μέσα από το μηχανισμό των συρόμενων νηματίων. Μπορούν να επιτύχουν κίνηση σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 0 μέχρι 40 °C περίπου, ωστόσο η απόδοσή τους δεν είναι ίδια σε κάθε μία από αυτές. Αυτές οι διαφορές στην απόδοση των μυών σχετίζονται με αρχές της θερμοδυναμικής, που οδηγούν σε συγκεκριμένες μεταβολές των μυών και καταγράφηκαν στη διεθνή βιβλιογραφία μέσα από μελέτες (Woledge, Barclay, & Curtin, 2009). Η μυστηριώδης αυτή αλληλεπίδραση ανάμεσα στη θερμοκρασία και τις λειτουργικές ιδιότητες των μυών έχει περιγραφεί σε πολλές ερευνητικές εργασίες, καθώς απασχολεί την επιστημονική κοινότητα.

Κατά τη διάρκεια του προηγούμενου αιώνα οι ερευνητές αναρωτήθηκαν αν αυξάνοντας τη θερμοκρασία σε έναν μυ τι επίδραση θα έχει αυτό στις λειτουργικές ιδιότητές του. Για παράδειγμα θα αυξηθεί η δύναμη που παράγει; Ή θα αυξηθεί η μέγιστη ταχύτητα συστολής; Απάντηση σε αυτά τα ερωτήματα προσπάθησαν έκτοτε να δοθούν με πειραματικές διατάξεις είτε *in vitro* είτε *in vivo*, σε πολλά είδη μυών, αλλά και σε όλα τα επίπεδα μελέτης από μακροσκοπικό μέχρι μικροσκοπικό, και παρασκευάσματα που εκτείνονταν από την μελέτη ολόκληρου οργανισμού έως την μελέτη της αλληλεπίδρασης απομονωμένων πρωτεϊνών.

1.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ισομετρική τάση απομονωμένων μυϊκών ινών σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών με την τεχνική των αλμάτων θερμοκρασίας φθάνοντας σε υψηλότερες τιμές από ό,τι συνήθως πραγματοποιούνται. Έτσι στα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε ως ανώτερη θερμοκρασία καταγραφής της ισομετρικής τάσης τους 35 °C.

1.2 Σημαντικότητα της ερευνητικής μελέτης

Η μυϊκή συστολή βασίζεται στην ενζυματική δράση της μυοσινικής ATPάσης. Όπως κάθε ένζυμο, η δραστηριότητα της αυξάνει με την άνοδο της θερμοκρασίας (και αντίθετων μειώνεται με την πτώση της θερμοκρασίας). Έτσι η δύναμη και ταχύτητα συστολής αυξάνουν με την αύξηση της θερμοκρασίας, ενώ αυτά τα μηχανικά μεγέθη μειώνονται με την πτώση της θερμοκρασίας. Η μυϊκή λειτουργία αποτιμάται με ένα εύρος πειραματικών προσεγγίσεων: από απομονωμένες σαρκομερικές πρωτεΐνες έως και την άσκηση όλου του σώματος. Οι απομονωμένες μυϊκές ίνες με διαπερατό σαρκεϊλήμμα (αλλιώς απομεμβρανωμένες) διατηρούν πλήρη σαρκομερική οργάνωση (και άρα ταύτιση με τις μηχανικές ιδιότητες ολόκληρου μύος) αλλά επιτρέπουν την άμεση διάχυση διάφορων οργανικών και ανόργανων παραγόντων διευκολύνοντας την μελέτη της επίδρασής τους χωρίς να απαιτούν ηλεκτρική διέγερση. Λόγω του εύθραυστου των απομονωμένων μυϊκών ινών η μηχανική τους αξιολόγηση πραγματοποιείται σε επί το πλείστον χαμηλές θερμοκρασίες. Είναι όμως ένα πολύ

χρήσιμο παρασκεύασμα αφού επιτρέπουν την μελέτη διαφόρων παραγόντων (συμπεριλαμβανομένων και φαρμακευτικών ουσιών) στην λειτουργία των μυών. Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν την ανάγκη πραγματοποίησης μελετών σε πιο κοντινές στο φυσιολογικό θερμοκρασίες διότι μόνο έτσι μπορεί να αποκαλυφθεί η πραγματική διάσταση κάποιων μηχανισμών λειτουργίας του μυός. Με τη χρήση αλμάτων θερμοκρασίας (t-jump) μπορούν να μελετηθούν οι ιδιότητες των μυϊκών ινών σε θερμοκρασίες που υπό άλλες συνθήκες θα προκαλούσαν φθορές στις ίνες και θα τις καθιστούσαν ακατάλληλες για πειραματικό υλικό. Έτσι το παρασκεύασμα των απομονωμένων μυϊκών ινών καθίσταται 'ρεαλιστικό' και χρήσιμο για την μελέτη των μηχανισμών της λειτουργίας των μυών είτε με στόχο την κατανόηση των μηχανισμών βελτιστοποίησης της αθλητικής απόδοσης είτε με στόχο την κατανόηση της επίδρασης χρόνιων παθολογικών καταστάσεων στην μυϊκή λειτουργία, ή της σύνδεσης της μηχανικής απόδοσης του μυός με την υγεία.

1.3 Ερευνητικές υποθέσεις

Με βάση τους σκοπούς της έρευνας που αναφέραμε διαμορφώσαμε τις παρακάτω ερευνητικές υποθέσεις:

1. Η θερμοκρασία επηρεάζει στατιστικά σημαντικά την παραγωγή ισομετρικής τάσης των απομεμβρανωμένων μυϊκών ινών μετά από ενεργοποίηση με Ca^{++} .
2. Υπάρχουν θερμοκρασίες στις οποίες υπάρχει μεγαλύτερη επίδραση της θερμοκρασίας στην ισομετρική τάση.
3. Η μελέτη της επίδρασης της ισομετρικής τάσης σε πειράματα απομεμβρανωμένων μυϊκών ινών με την τεχνική t-jump σε θερμοκρασίες που προσεγγίζουν την φυσιολογική είναι χρήσιμη ώστε να διαπιστώσουμε αν τα ευρήματά μας είναι συμβατά με αυτά που προκύπτουν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες.
4. Τα ευρήματά του εργαστηρίου μας συμβαδίζουν με τα διεθνή βιβλιογραφικά δεδομένα.

1.4 Περιορισμοί μελέτης

Δεν υπήρχαν περιορισμοί στην παρούσα μελέτη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

2.1 Δομή και φυσιολογία του σκελετικού μυός

“...to move things is all that mankind can do, for such the sole executant is muscle, whether in whispering a syllable or in felling a forest...” (Kandel, Schwartz, & Jessel, 2000)

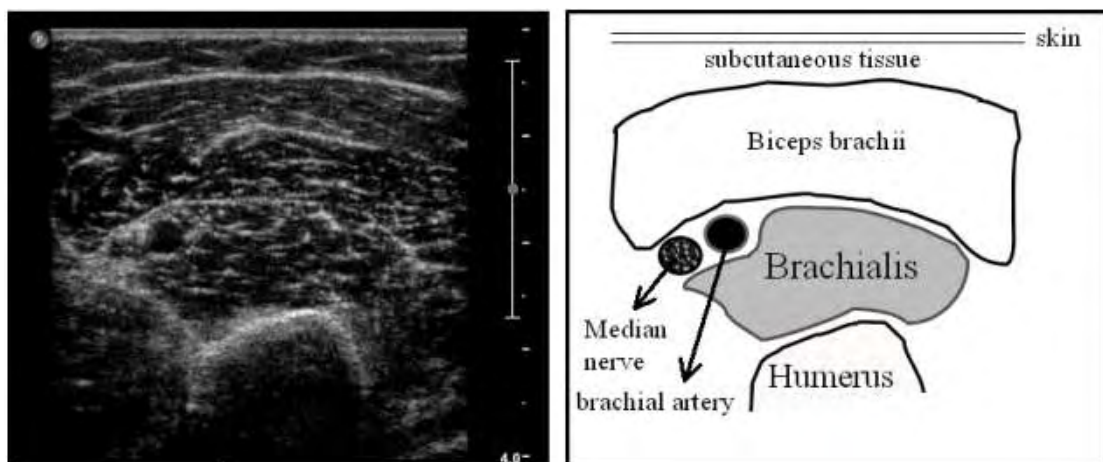
Charles Sherrington, 1924

Το κύριο χαρακτηριστικό που διαφοροποιεί τα ζώα από τα φυτά είναι η δυνατότητα των πρώτων να επιτελούν ακριβείς και εκούσιες κινήσεις των μελών του σώματός τους. Το πρόβλημα της επιλογής του πότε και πώς να κινηθούν είναι σε μεγάλο βαθμό η κινητήρια δύναμη πίσω από την εξέλιξη του νευρικού συστήματός τους. Η εκτέλεση ωστόσο κινήσεων στα περισσότερα ζώα επιτελείται από εξειδικευμένα κύτταρα, τα μυϊκά κύτταρα ή μυϊκές ίνες.

Υπάρχουν τρία είδη μυών : οι σκελετικοί, οι οποίοι συμβάλλουν στην επιτέλεση των κινήσεων, οι λείοι μύες, οι οποίοι χρησιμεύουν σε εσωτερικές λειτουργίες όπως η περισταλση και η αιματική ροή και ο καρδιακός μυς, που αποτελεί την αντλία ροής του αίματος (Kandel et al., 2000).

Οι σκελετικοί μύες συνδέονται με τα οστά. Μέσω αυτής της σύνδεσης και με τη συστολή τους επιτυγχάνεται η κίνηση. Έτσι τα ηλεκτρικά ερεθίσματα που άγονται στους μύες από τα κινητικά νεύρα μετατρέπονται σε μηχανική ενέργεια. Οι ιδιότητες των σκελετικών μυών που συμβάλλουν σε αυτή τη διαδικασία είναι η διεγερσιμότητα, η συσταλτικότητα και η ελαστικότητα. Η διεγερσιμότητα των σκελετικών μυών αφορά στην ικανότητα του μυός να αποκρίνεται σε ερεθίσματα νευροδιαβιβαστών. Συσταλτικότητα είναι η δυνατότητα του μυός να βραχύνεται, διαδικασία η οποία σε μοριακό επίπεδο θα εξηγηθεί παρακάτω. Τέλος η ελαστικότητα σημαίνει την ικανότητα του μυός να επανέρχεται στις διαστάσεις που είχε προηγουμένως, όταν απελευθερωθεί από την τάση που εφαρμόστηκε στα άκρα του (Κλεισούρας, 2004).

Η πρόσφυση των μυών στα οστά γίνεται με τους τένοντες. Τα κύρια μέρη του μυός είναι η έκφυση, η κατάφυση και η γαστέρα, η οποία περιβάλλεται από ένα συνδετικό υμένα το περιμύιο. Προσεκβολές του περιμύιου σχηματίζουν το έσω περιμύιο. Το έσω περιμύιο γύρω από κάθε μυϊκή ίνα σχηματίζει ένα δίκτυο από λεπτές προσεκβολές το ενδομύιο, που φέρει τα αγγεία και τα νεύρα και χρησιμεύει για τη συνοχή και τη θρέψη των μυϊκών ινών (Γκίμπα-Τζιαμπίρη, 1999).



Εικόνα 1. Φυσιολογικά ευρήματα υπερηχογραφικής μέτρησης του δικέφαλου βραχιόνιου μυός και των γύρω ιστών στα δύο τρίτα της απόστασης από το ακρώμιο μέχρι την πρόσθια αγκωνιαία πτυχή του αριστερού άνω άκρου. Η δεξιά εικόνα απεικονίζει σχηματικά τις διάφορες ανατομικές δομές. skin-δέρμα, subcutaneous tissue-υποδόριος ιστός, biceps brachii-δικέφαλος βραχιόνιος, brachialis-πρόσθιος βραχιόνιος, humerus-βραχιόνιο οστό, median nerve-μέσο νεύρο, brachial artery-βραχιόνια αρτηρία. (Pillen, 2010)

2.2 Μυϊκή ίνα

Οι γραμμωτές μυϊκές ίνες αποτελούν τη δομική μονάδα των σκελετικών μυών. Είναι πολυπύρηννα κύτταρα με κυλινδρικό σχήμα, μήκος 4-15cm και πλάτος 10-100μ (Γκίμπα-Τζιαμπίρη, 1999). Κάθε μυϊκή ίνα σχηματίζεται κατά την ανάπτυξη του εμβρύου με τη συγχώνευση ενός αριθμού αδιαφοροποίητων μονοπύρηννων κυττάρων, τα οποία ονομάζονται μυοβλάστες. Ο σχηματισμός των μυϊκών ινών συμπληρώνεται μέχρι τη γέννηση, ενώ συνεχίζουν να αυξάνουν σε μέγεθος με την ανάπτυξη του παιδιού (Vander, Luciano, Τσακόπουλος, & Sherman, 2001).

Μετά τη γέννηση δεν υπάρχει δυνατότητα δημιουργίας νέων μυϊκών ινών από διαίρεση ήδη υπαρχόντων ινών, παρά μόνο από αδιαφοροποίητα κύτταρα που ονομάζονται δορυφόρα κύτταρα (Vander et al., 2001).

Κάθε γραμμωτή μυϊκή ίνα αποτελείται από τα εξής στοιχεία:

-Σαρκεΐλημα

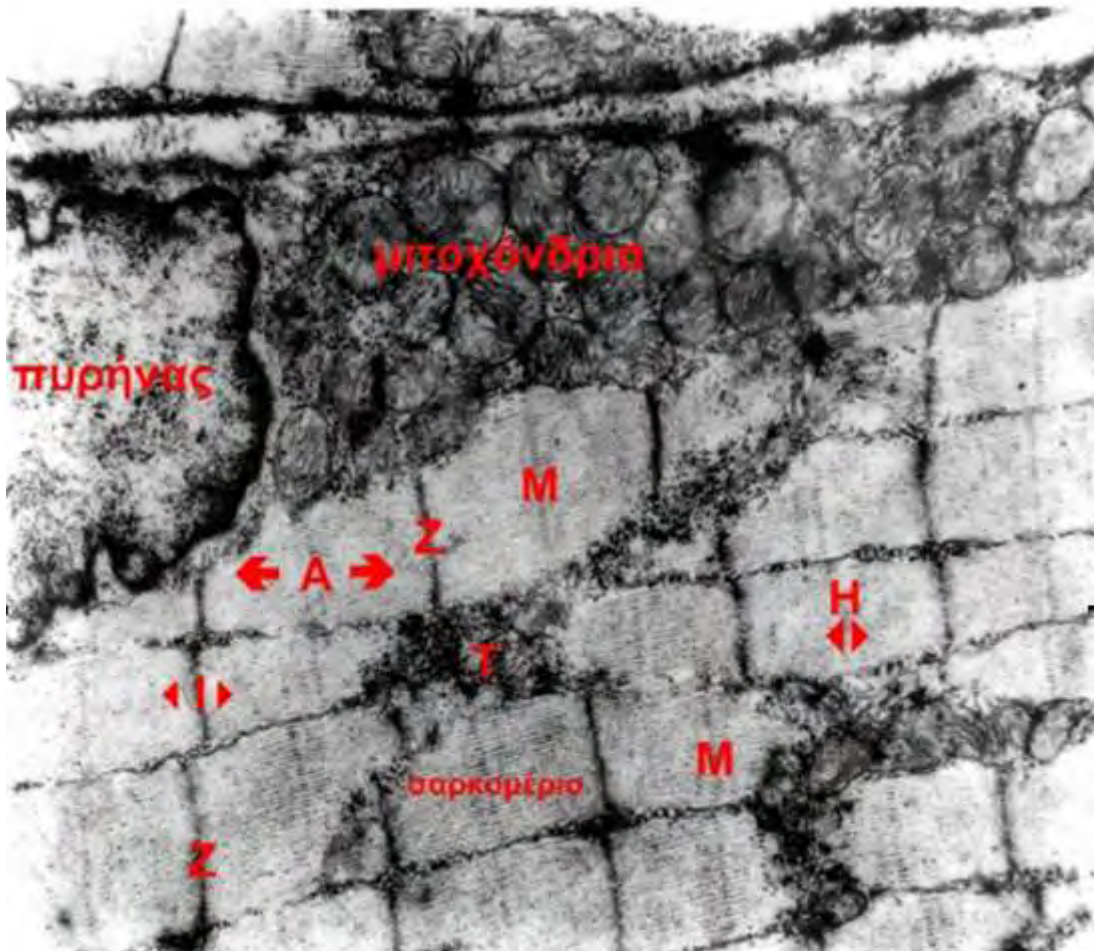
Είναι ένας λεπτός ελαστικός υμένας που περιβάλλει κάθε μυϊκή ίνα και ακολουθεί τις μεταβολές του σχήματός της κατά τη συστολή της. Το σαρκεΐλημα επεκτείνεται πέρα από τα δύο άκρα των μυϊκών ινών και μετατρέπεται στις τενόντιες ίνες. Το σαρκεΐλημα έχει πολλαπλή χρησιμότητα. Δεν προστατεύει μόνο το σαρκόπλασμα, αλλά χάρη στις ιδιότητες του άγεται το δυναμικό ενέργειας κατά μήκος της μυϊκής ίνας και έτσι διεγείρεται ο μυς (Γκίμπα-Τζιαμπίρη, 1999; Κλεισούρας, 2004).

Το σαρκεΐλημα αποτελείται από μία πραγματική κυτταρική μεμβράνη, την πλασματική μεμβράνη, και από μία λεπτή στιβάδα πολυσακχαριτιδικού υλικού παρόμοιου με αυτό που περιβάλλει τα αιμοφόρα τριχοειδή (Bloom & Fawcett, 1975).

-Σαρκόπλασμα

Πρόκειται για το πρωτόπλασμα των μυϊκών κυττάρων μέσα στο οποίο περιέχονται οι πυρήνες, τα οργανίδια, οι πρωτεΐνες συστολής, ένζυμα, λίπη και γλυκογόνο.

ΓΡΑΜΜΩΤΗ ΜΥΪΚΗ ΙΝΑ



Εικόνα 2 . Κάθε παραλληλόγραμμο αποτελεί ένα σαρκομέριο, που αφορίζεται από δύο γραμμές Ζ. Η γραμμή Ζ βρίσκεται στο κέντρο της ζώνης Ι. Στο κέντρο του κάθε σαρκομερίου διακρίνεται η γραμμή Μ, η οποία αμφοτερόπλευρα περιβάλλεται από μία λεπτή διαφανέστερη ταινία Η. Η μεγάλη κεντρική ανισότροπη ζώνη Α περιλαμβάνει όλο το μήκος των ινιδίων της μυοσίνης και εκατέρωθεν τμήμα των ινιδίων της ακτίνης που εκπορεύονται από τις γραμμές Ζ. Διακρίνονται ακόμη πυρήνας μυϊκού κυττάρου, μιτοχόνδρια και Τ σωληνάριο (Κεραμέως-Φόρογλου, 1984)

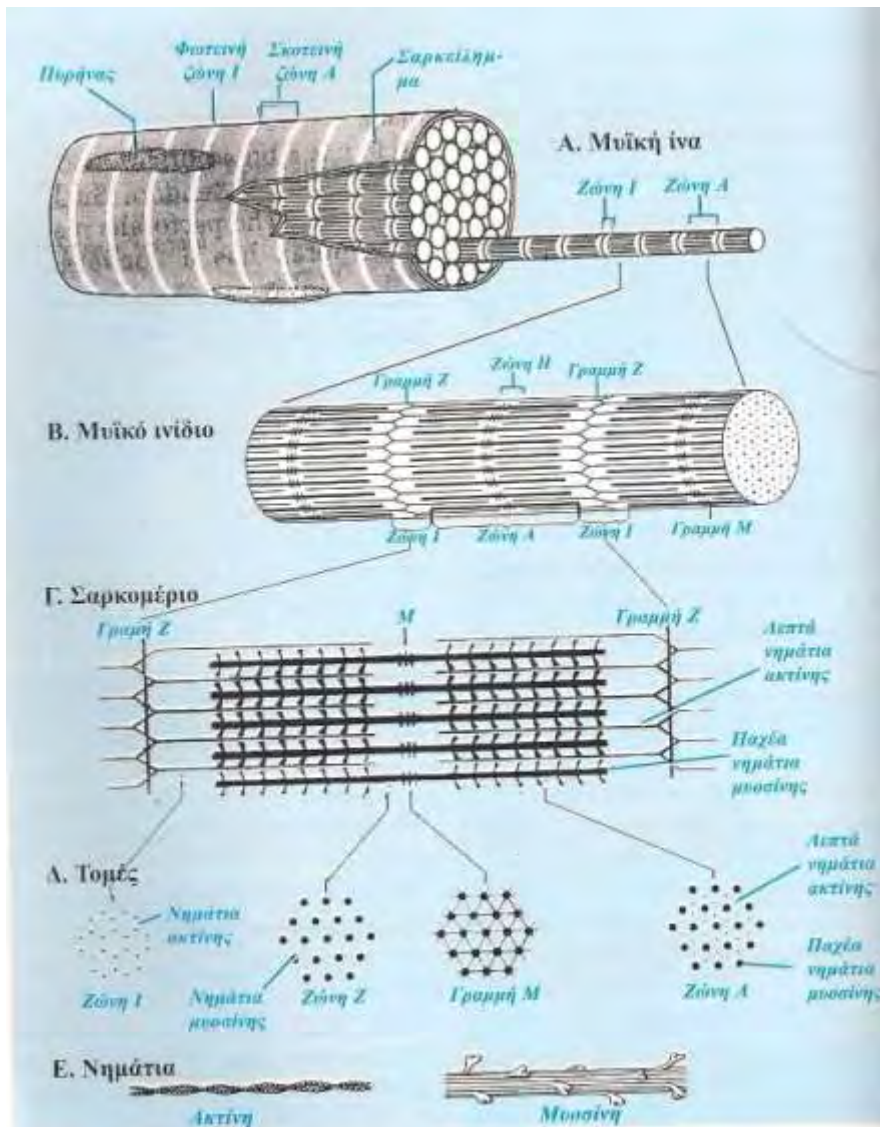
-Μυϊκά ινίδια

Είναι το κυριότερο στοιχείο της μυϊκής ίνας και αντιστοιχεί στο διαφοροποιημένο τμήμα του πρωτοπλάσματος, ενώ το αμετάπλαστο τμήμα σχηματίζει το σαρκόπλασμα. Κάθε μυϊκή ίνα περιέχει άφθονα μυϊκά ινίδια (*fibrils*), τα οποία είναι λεπτότατα, συστατά και φέρονται παράλληλα προς τον επιμήκη άξονά της (Γκίμπα-Τζιαμπίρη, 1999). Κάθε μυοϊνίδιο αποτελείται από παχιά και λεπτά νημάτια τοποθετημένα σε επαναλαμβανόμενο σχέδιο κατά μήκος του. Τα παχιά νημάτια αποτελούνται σχεδόν εξολοκλήρου από *μυοσίνη* –μία εκ των πρωτεϊνών συστολής. Τα λεπτά νημάτια που έχουν τη μισή διάμετρο από τα παχιά, αποτελούνται από τις πρωτεΐνες *ακτίνη*, *τροπονίνη* και *τροπομυοσίνη*.

Η βασική μονάδα σε αυτό το επαναλαμβανόμενο σχέδιο ονομάζεται **σαρκομέριο**. Εξαιτίας της ειδικής αυτής οργάνωσης κατά μήκος των μυϊκών ινών παρατηρείται στο μικροσκόπιο μία συνεχής εναλλαγή από φωτεινές και σκοτεινές ζώνες, στις οποίες οφείλεται η εγκάρσια γράμμωση των μυϊκών ινών. Οι ζώνες αυτές ανάλογα με την οπτική συμπεριφορά που παρουσιάζει το διερχόμενο φως ονομάζονται **I** (ισότροπη=φωτεινή) και **A** (ανισότροπη=σκοτεινή) (Vander et al., 2001; Γκίμπα-Τζιαμπίρη, 1999).

Φωτεινή ζώνη I. Αποτελείται μόνο από λεπτά νημάτια ακτίνης και διαπερνάται στο μέσον της από μία λεπτή σκοτεινή ταινία το δίσκο ή γραμμή **Z** επάνω στην οποία προσφύονται με τα άκρα τους τα νημάτια της ακτίνης. Το τμήμα της μυϊκής ίνας που βρίσκεται μεταξύ δύο δίσκων **Z** ονομάζεται σαρκομέριο και αποτελεί τη στοιχειώδη συστατική μονάδα της μυϊκής ίνας. Το φυσιολογικό μήκος του κάθε σαρκομερίου είναι 1,5-3,5μm. Μία μυϊκή ίνα με μήκος ηρεμίας 4cm έχει περίπου 20.000 σαρκομέρια στη σειρά (Kandel et al., 2000).

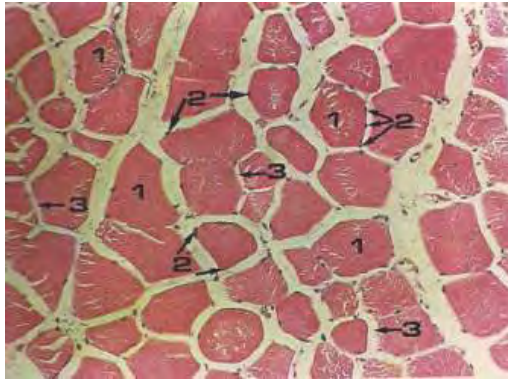
Σκοτεινή ζώνη A. Αποτελείται από τα παχέα νημάτια μυοσίνης και από τμήμα των λεπτών νηματίων της ακτίνης. Στο κέντρο της ζώνης **A** υπάρχει μόνο μυοσίνη και εμφανίζεται μία πιο διαυγής περιοχή, ζώνη **H**, στο μέσο της οποίας υπάρχει η σκοτεινή γραμμή **M**, που αντιστοιχεί στο κέντρο του σαρκομερίου.



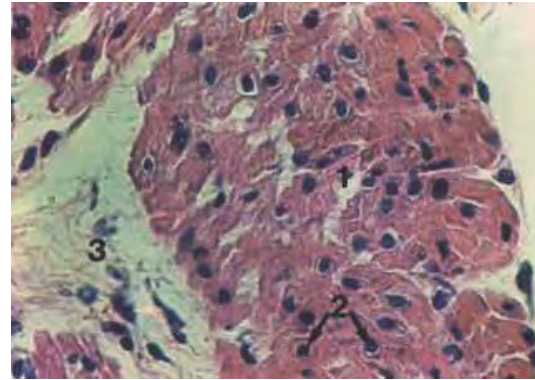
Εικόνα 3 . Σχηματική παράσταση της δομής των σκελετικών μυών. Α. μυϊκή ίνα, Β. μυϊκό ινίδιο, Γ. σαρκομέριο, Δ. τομές διαφόρων σημείων του σαρκομερίου, Ε. νημάτια ακτίνης και μιοσίνης (Γκίμπα-Τζιαμπίρη, 1999) p136

-Πυρήνες

Είναι πολυάριθμοι και βρίσκονται στην περιφέρεια των γραμμωτών μυϊκών ινών. Στους λείους μύες και στον καρδιακό μυ υπάρχει ένας πυρήνας στο κέντρο του κυττάρου.



Εικ.4



Εικ.5

Εικόνα 4. Γραμμωτός μυϊκός ιστός. 1.γραμμωτή μυϊκή ίνα σε εγκάρσια διατομή, 2.πυρήνες γραμμωτών μυϊκών ινών, 3.ενδομύιο. Χρώση Αιματοξυλίνη-Εωσίνη x 200

Εικόνα 5. Λείος μυϊκός ιστός. 1.λεία μυϊκή ίνα σε εγκάρσια διατομή, 2.πυρήνες λείων μυϊκών ινών, 3.χαλαρός μυϊκός ιστός. Χρώση Αιματοξυλίνη-Εωσίνη x 775 (Κεραμέως-Φόρογλου, 1984) σελ 89, σελ 95

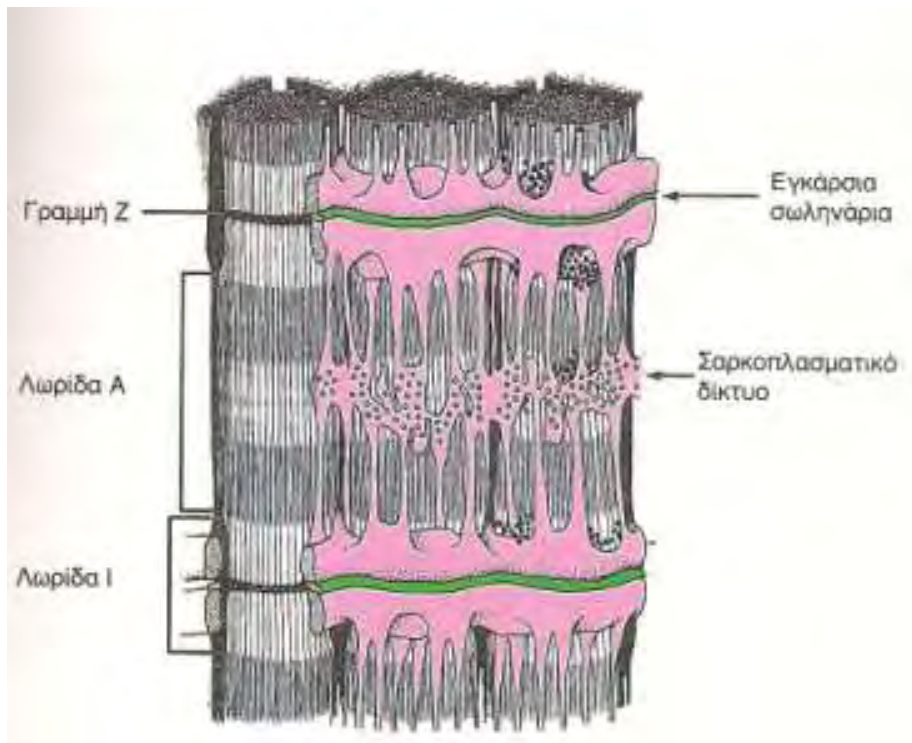
Οι γραμμωτές μυϊκές ίνες λόγω του ότι έχουν πολυάριθμους πυρήνες χαρακτηρίζονται ως συγκυτιακά κύτταρα ή συγκύτια (*cyncytium*) (ετυμολογία ελληνικής προέλευσης συν+κύτος) (*Mosby's medical dictionary*, 2009). Ο μεγάλος αριθμός των πυρήνων των γραμμωτών μυϊκών ινών οφείλεται στο γεγονός ότι προκύπτουν από τη συνένωση πρόδρομων κυττάρων, που λέγονται μυοβλάστες. Ο καρδιακός μυς αν και αποτελείται από μονοπύρνα κύτταρα θεωρείται ως ένας μεγάλος συγκυτιακός ιστός λόγω των συνδέσεων των κυττάρων μεταξύ τους.

-Το σαρκοσωληνωτό σύστημα

Βρίσκεται μέσα στο σαρκόπλασμα και σχηματίζεται από εγκολλώσεις του σαρκελήμματος. Πρόκειται για ένα σύνθετο σύστημα σωληναρίων που περιλαμβάνει:

α. το δίκτυο των εγκάρσιων ή T σωληναρίων. Αποτελείται από σωληνάκια που φέρονται εγκάρσια προς τις μυϊκές ίνες. Το σύστημα T χρησιμεύει ως οδός διάδοσης του δυναμικού δράσεως προς το εσωτερικό του μυϊκού κυττάρου.

β. το σαρκοπλασματικό δίκτυο. Αποτελεί εξειδικευμένο ενδοπλασματικό δίκτυο, που αποτελείται από τα παράλληλα σωληνάκια και τις πλάγιες ή τελικές δεξαμενές, που φέρονται παράλληλα προς τα T σωληνάκια. Δύο διαδοχικές πλάγιες δεξαμενές με το μεταξύ τους T σωληνάριο δημιουργούν ένα σχηματισμό που λέγεται τριάδα. Σε κάθε σαρκομέριο υπάρχουν δύο τριάδες, μία σε κάθε ζώνη I και μία σε κάθε ζώνη A (Γκίμπα-Τζιαμπίρη, 1999).

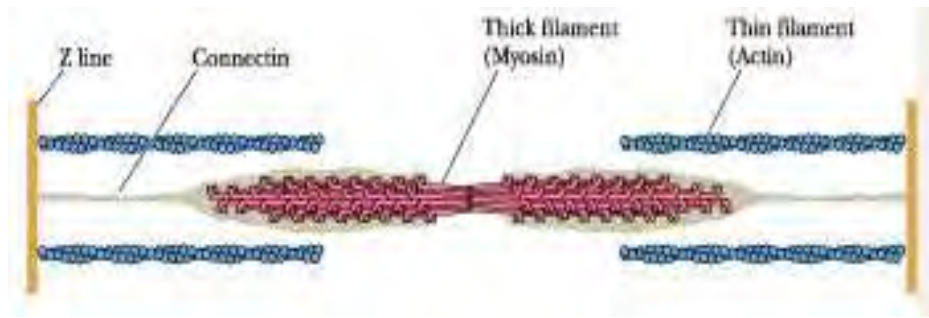


Εικόνα 6. Απεικονίζονται τα εγκάρσια σωληνάρια ή σύστημα Τα (πράσινο χρώμα) ως συνέχεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, ενώ το σαρκοπλασματικό δίκτυο απελευθερώνει Ca^{+2} στο σαρκόπλασμα επιτρέποντας την αλληλεπίδραση ακτίνης και μυοσίνης. (Μούγιος, 1996) p29

2.3 Οι πρωτεΐνες των μυϊκών ινών

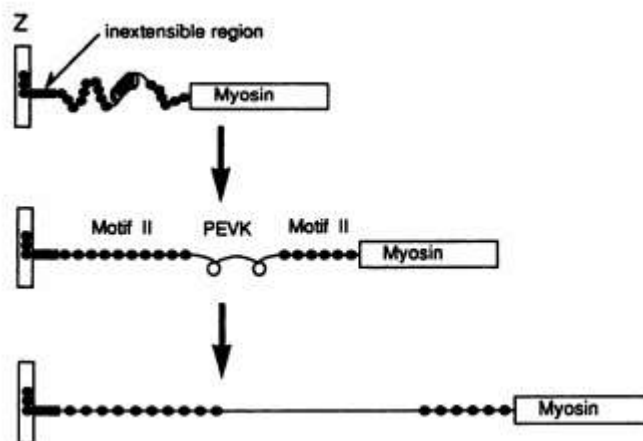
- Πρωτεΐνες του σαρκομερίου

- i. **Τιτίνη (Titin or Connectin).** Αποτελεί μία γιγαντιαία ελαστική πρωτεΐνη του σαρκομερίου των γραμμωτών μυϊκών ινών περίπου 3 MDalton. Είναι το πιο μεγάλο, μέχρι στιγμής γνωστό, μεμονωμένο πολυπεπτιδίο. Η τιτίνη περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1977 (Maruyama, Kimura, & Ohashi, 1977; Maruyama, 1997) και πήρε το όνομά της από την ελληνική λέξη Τιτάνας (γιγαντιαία θεότητα) (Maruyama, 1997). Μεταλλάξεις στα γονίδια έκφρασης της τιτίνης έχουν μελετηθεί λόγω του ότι έχουν συσχετισθεί με νόσους όπως η διατακτική μυοκαρδιοπάθεια και το σκληρόδερμα (Itoh-Satoh et al., 2002; Machado, Sunkel, & Andrew, 1998; Siu et al., 1999).



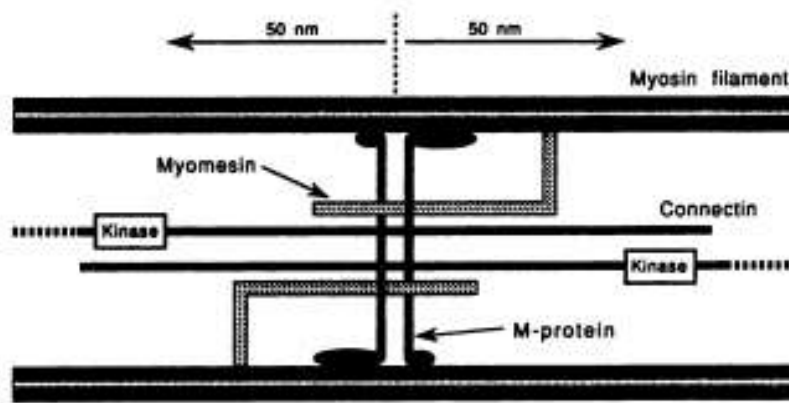
Εικόνα 7. Σχηματοποίηση της διάταξης της ελαστικής πρωτεΐνης τιτίνης (connectin or titin) στο σαρκομέριο ενός σκελετικού μυός. Τα ινίδια αυτά της τιτίνης παράγουν την παθητική δύναμη επαναφοράς που έχουν τα μυϊκά ινίδια όταν εκτείνονται πέραν του φυσικού τους μήκους (Ohtsuki, Maruyama, & Ebashi, 1986).

Το μόριο της τιτίνης ξεκινά από τη ζώνη Z και συνδεδεμένη με τη μυοσίνη φτάνει και καταλήγει πέρα από τη γραμμή M, που είναι το κέντρο του σαρκομερίου. Η σύνδεση της τιτίνης με τη μυοσίνη γίνεται στην ουρά και όχι στην κεφαλή της μυοσίνης (Maruyama et al., 1977). Τέλος οι ελαστικές ιδιότητες του μορίου της έχουν αποδοθεί στη δομή του τμήματος του μορίου που εντοπίζεται στη ζώνη I και περιγράφεται στην παρακάτω εικόνα, όπου φαίνεται το τμήμα αυτό του μορίου να διπλώνεται και έπειτα να ξεδιπλώνεται



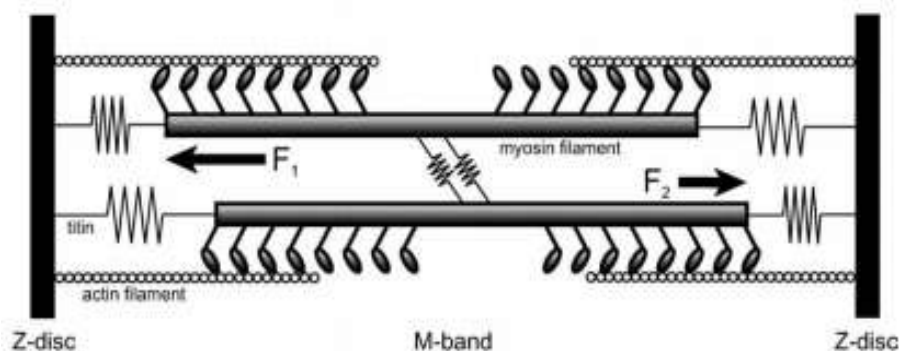
Εικόνα 8. Απεικονίζεται η τίτινη όπως αυτή είναι αναδιπλωμένη και τεντώνεται στη ζώνη I. Φαίνεται μία περιοχή κοντά στη γραμμή Z που δεν έχει δυνατότητα να εκταθεί (inextensible region) (Gautel & Goulding, 1996).

- ii. **Μυομεσίνη και M πρωτεΐνη.** Οι δύο πρωτεΐνες, οι οποίες αναλαμβάνουν το ρόλο να συνδέσουν τη μυοσίνη με τη ζώνη M είναι η μυομεσίνη και η M-πρωτεΐνη. Αποτελούν μέλη της ευρύτερης υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών (Nave, Fürst, & Weber, 1989; Schoenauer et al., 2005).



Εικόνα 9. Η διαμόρφωση της τιτίνης (connectin), της μυομεσίνης (myomesin) και της M-πρωτεΐνης (M-protein) στη γραμμή M του σαρκομερίου (Obermann et al., 1996).

Θεωρείται ότι η περιοχή που αντιστοιχεί στη γραμμή M, η οποία είναι ένας εγκάρσιος σχηματισμός του σαρκομερίου, συμβάλλει στη σταθερότητα του δικτύου των παχιών νηματίων. Η μυομεσίνη που αποτελεί πρωτεΐνη της περιοχής αυτής αποδείχθηκε ότι βοηθά σε αυτό σχηματίζοντας αντιπαράλληλα διμερή, τα οποία συνδέουν γειτονικά (απέναντι) παχιά νημάτια μυοσίνης (Schoenauer et al., 2005).



Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση του ρόλου της περιοχής της γραμμής-M στη σύσπαση του σαρκομερίου. Οι εγκάρσιες γέφυρες ασκούν δυνάμεις προς αντίθετες κατευθύνσεις (F_1, F_2), οι οποίες είναι άνισες, οδηγώντας σε σταδιακή απόκλιση των παχέων νηματίων από το κέντρο του σαρκομερίου κατά τη σύσπαση. Αυτό εν μέρει περιορίζεται από τα νημάτια της περιοχής M, που εξισορροπούν αυτές τις αποσταθεροποιητικές δυνάμεις. Παρατηρούμε τα αντιπαράλληλα διμερή της μυομεσίνης (Agarkova, Ehler, Lange, Schoenauer, & Perriard, 2003).

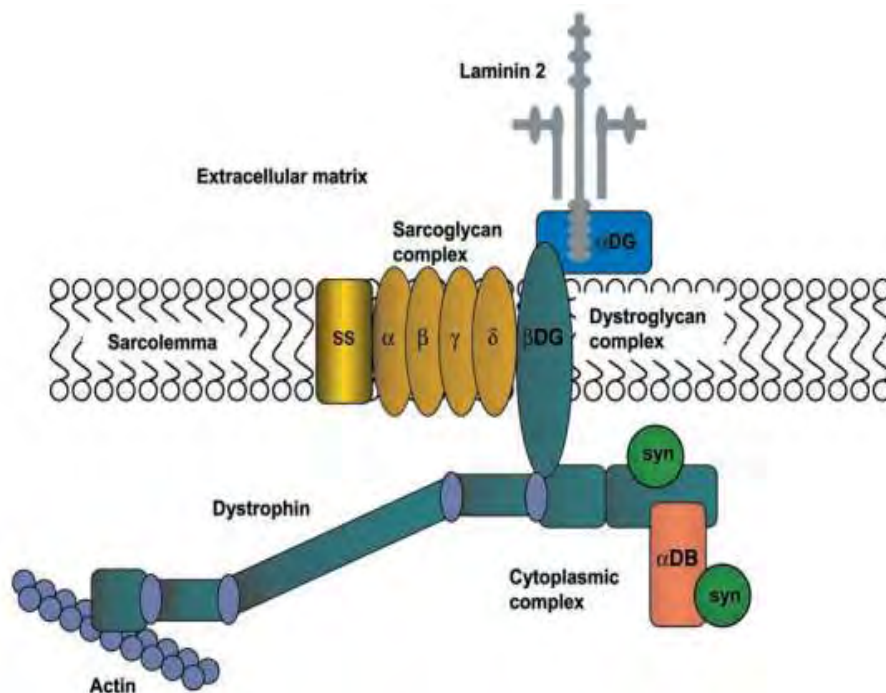
- iii. **α -Ακτινίνη.** Η α -ακτινίνη είναι μία πρωτεΐνη που ανήκει στη υπεροικογένεια των σπεκτρινών και πιο συγκεκριμένα στην οικογένεια των πρωτεϊνών που συνδέονται με την ακτίνη (actin binding proteins) (όπως π.χ η βιλίνη και φιβρίνη) με αποτέλεσμα η ακτίνη να τοποθετείται στο χώρο σε παράλληλες δέσμες.



Εικόνα 11 . Η α-ακτινίνη συνδέει την ακτίνη σε παράλληλη διάταξη των νηματίων της.

Υπάρχει σε μυϊκά κύτταρα, αλλά και σε μη-μυϊκά κύτταρα σε σημεία όπου η ακτίνη «αγκυροβολεί» σε ενδοκυττάρια δομές. Η μόνη ξεκάθαρη διαφορά των ισομορφών της α-ακτινίνης είναι ότι στα μη μυϊκά κύτταρα η σύνδεση της α-ακτινίνης με την ακτίνη είναι ευαίσθητη στην επίδραση του ασβεστίου, ενώ η ίδια σύνδεση στα μυϊκά κύτταρα δεν επηρεάζεται από το ασβέστιο (Burridge & Feramisco, 1981). Υπάρχει με τη μορφή διμερούς με αντιπαράλληλη διάταξη και είναι 94-103 kDalton (Blanchard, Ohanian, & Critchley, 1989). Φέρει ένα N-άκρο με το οποίο συνδέεται με την ακτίνη, ένα C-άκρο με το οποίο συνδέεται με το ασβέστιο και ενδιάμεσα μία ραβδωτή περιοχή, η οποία έχει αναλαμβανόμενες τριπλές έλικες (επαναλήψεις σπεκτρίνης). Οι ισομορφές της α-ακτινίνης των μυών δεν επηρεάζονται από το ασβέστιο καθώς το άκρο που αντιστοιχεί στη θέση σύνδεσης του ασβεστίου είναι ανενεργό (Virel & Backman, 2004).

- iv. **Δυστροφίνη.** Είναι μία κυτταροσκελετική πρωτεΐνη 427kDalton που ανήκει στην οικογένεια της β-σπεκτρίνης/α-ακτινίνης (Koenig, Monaco, & Kunkel, 1988). Ταυτοποιήθηκε πρώτη φορά από τον L.M kunkel το 1987 (Hoffman, Brown, & Kunkel, 1987). Χαρακτηρίζεται από ένα NH₂ άκρο το οποίο συνδέεται με την ακτίνη. Στο άλλο της άκρο COOH συνδέεται με μία σειρά άλλων πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη δυστροφίνη (dystrophin associated proteins) (Blake, Weir, Newey, & Davies, 2002).



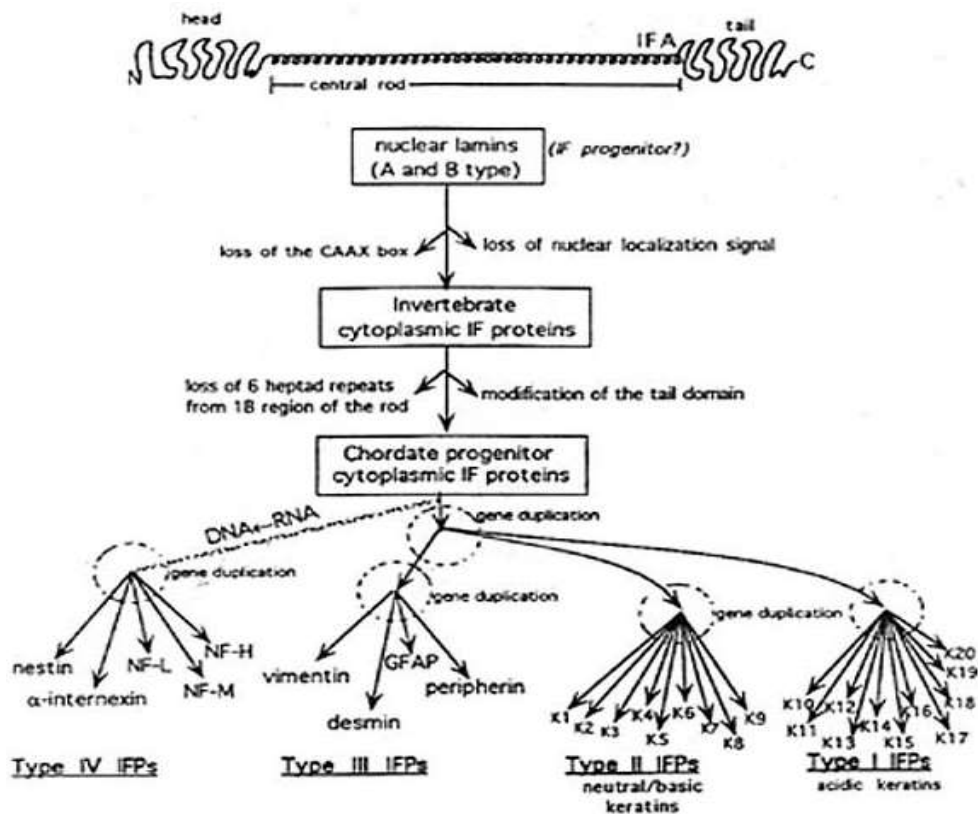
Εικόνα 12 . Σύμπλεγμα πρωτεϊνών σχετιζόμενες με τη δυστροφίνη (DPC dystrophin protein complex) σε σκελετικό μυ. Απεικονίζεται η δυστροφίνη, η οποία συνδέεται στο NH₂ άκρο της με την ακτίνη. Στο COOH άκρο της η δυστροφίνη συνδέεται με μία σειρά μεμβρανικών πρωτεϊνών , οι οποίες ταξινομούνται στο υποσύμπλεγμα της δυστρογλυκάνης (subcomplex of dystroglycan), της σαρκογλυκάνης-σαρκοσπάνης (sarcoglycan-sarcospan subcomplex) και το κυτταροπλασματικό πρωτεϊνικό υποσύμπλεγμα (cytoplasmic subcomplex) (Blake et al., 2002).

Από τις μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με τη λειτουργική της σημασία θεωρείται ότι συμβάλλει στη σταθερότητα του σαρκεϊλήμματος και στην αποφυγή της διάσπασης της μυϊκής ίνας κατά τη συστολή. Στα συμπεράσματα αυτά συμβάλλουν τα εξής δεδομένα: η μοριακή δομή της δυστροφίνης, η θέση της στη μυϊκή ίνα κάτω από το σαρκεϊλήμμα και η ευθραυστότητα των μυϊκών κυττάρων που στερούνται δυστροφίνης (Pasternak, Wong, & Elson, 1995). Μεταλλάξεις της δυστροφίνης προκαλούν ανωμαλίες στη λειτουργία των μυών με κλινικά αποτελέσματα που εντάσσονται σε μία ομάδα νοσημάτων που λέγονται δυστροφίες. Οι πιο γνωστές από αυτές είναι η μυϊκή δυστροφία Duchenne και η μυϊκή δυστροφία Becker (Hoffman et al., 1987).

- v. **Σπεκτρίνη και Αγκυρίνη** . Η σπεκτρίνη είναι μία πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού και βρίσκεται στη εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης με την οποία συνδέεται με τη βοήθεια της αγκυρίνης. Η σπεκτρίνη και η αγκυρίνη ταυτοποιήθηκαν πρώτη φορά στα ερυθρά αιμοσφαίρια και υπάρχουν εκτός από τα μυϊκά κύτταρα και σε πολλούς άλλους τύπους κυττάρων. Υπάρχουν δύο τύποι σπεκτρίνης (α και β), ενώ μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί δύο υπότυποι της σπεκτρίνης α (αI και αII) και πέντε υπότυποι της σπεκτρίνης β (I-V) που παίρνουν το όνομά τους κατά χρονολογική σειρά ανακάλυψής τους. Η σπεκτρίνη αρχικά πολυμερίζεται

σχηματίζοντας τετραμερή από 2α και 2β μόρια σπεκτρίνης. Τα τετραμερή αυτά διατάσσονται σε πεντάγωνα ή εξάγωνα στη εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Θεωρείται ότι συμβάλλει στη σταθερότητα και στη διαμόρφωση του σχήματος της κυτταρικής μεμβράνης του ερυθροκυττάρου, ωστόσο ο ρόλος αυτός δεν έχει αποδειχθεί για το μυϊκό κύτταρο. Όμως βρέθηκε ότι στο καρδιακό μυϊκό κύτταρο ευνοεί τη σταθεροποίηση μεταξύ των δομών της κυτταρικής μεμβράνης και του σαρκομερίου. Τέλος οι μεταλλάξεις στα γονίδια της αγκυρίνης έχουν σχετιστεί κυρίως με αιματολογικά νοσήματα (V. Bennett & Stenbuck, 1979; Hammarlund, Davis, & Jorgensen, 2000; Huh, Glantz, Je, Morrow, & Kim, 2001).

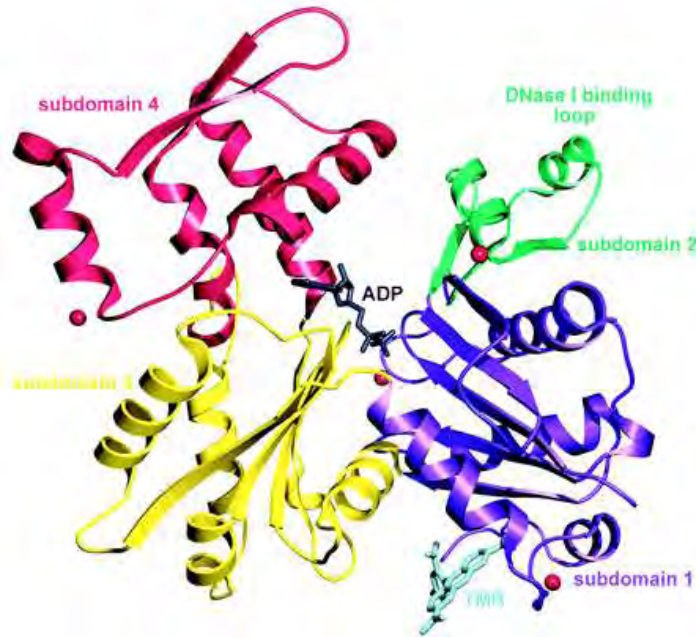
- vi. **Δεσμίνη.** Είναι μία πρωτεΐνη του σαρκομερίου, που απομονώθηκε και περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1976. Είναι πρωτεΐνη μέσου μεγέθους τύπου III 100 Å και MB περίπου 50.000 (Lazarides & Hubbard, 1976). Υπάρχουν και άλλες μέσου μεγέθους πρωτεΐνες (intermediate filament protein / IF) όπως η νεστίνη, περιφερίνη και βιμεντίνη, όμως η δεσμίνη απαντάται αποκλειστικά στα μυϊκά κύτταρα (σκελετικού, λείου και καρδιακού μύος) και στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δεσμίνης βρέθηκαν γύρω από τον πυρήνα, γύρω από τη γραμμή Z και στα κοσταμέρια (costamere) στους γραμμωτούς μύες και στα πυκνά σωμάτια (dense bodies) στους λείους μύες. Τριανταπέντε χρόνια μετά την ταυτοποίηση της δεσμίνης παραμένει ακόμη ασαφής ο ρόλος και οι λειτουργίες της. Ως πιθανότερες θεωρούνται η γένεση των μυϊκών ινιδίων (myofibrillogenesis), στήριξη του μυϊκού κυττάρου και του σαρκομερίου, τοπογραφία των μιτοχονδρίων, έκφραση γονιδίων και ενδοκυττάρια σηματοδότηση (Costa, Escalera, Cataldo, Oliveira, & Mermelstein, 2004). Οι μελέτες που την αφορούν έχουν γίνει κυρίως με πειραματόζωα. Η δεσμίνη και οι γονιδιακές της εκφράσεις σχετίζονται με διάφορες μυοπάθειες (Paulin & Li, 2004).



Εικόνα 13. Η οικογένεια των IF (intermediate filaments) στην οποία ανήκει η δεσμίνη (<http://www.xenbase.org/xenbase/original/cell/cyto/XIF-1.htm>, n.d.)

-Πρωτεΐνες συστολής του σαρκομερίου

- i. **Ακτίνη.** Η ακτίνη είναι το κύριο συστατικό των λεπτών νηματίων (thin filaments). Είναι μία σφαιροειδής πρωτεΐνη (G-ακτίνη) με M.B. 43.000. Η G-ακτίνη αποτελείται από τέσσερα υποτιμήματα από τα οποία το τμήμα 1 και 3 είναι μεγαλύτερα και το 2 και 4 είναι μικρότερα. Τα τμήματα 1 και 3 αποτελούνται από β πτυχωτά πενταπλά φύλλα που περιβάλλονται από α-έλικες. Τα τμήματα 2 και 4 αποτελούνται κυρίως από μικρότερα β πτυχωτά φύλλα και πολύ λιγότερο από α-έλικες. Στο κέντρο υπάρχει μία πτυχή που σχηματίζεται από διαχωρισμό του μορίου σε δύο μισά. Εικ.14.
In vivo η G-ακτίνη πολυμερίζεται και σχηματίζει μία ινώδη αλυσω που μοιάζει με κομπολόι, την F-ακτίνη. Τα μονομερή της ακτίνης είναι έτσι τοποθετημένα είναι έτσι τοποθετημένα, ώστε να δίνουν την εντύπωση ενός περιδέραιου με δύο σειρές από χάντρες τυλιγμένες η μία γύρω από την άλλη. Η F-ακτίνη αποτελεί τον κορμό κάθε λεπτού νηματίου και ενσωματώνει σε ειδικές θέσεις του μορίου της από ένα ADP, θέσεις που ονομάζονται ενεργές θέσεις σύνδεσης και αποτελούν τα σημεία όπου οι κεφαλές της μυοσίνης συνδέονται με την ακτίνη.

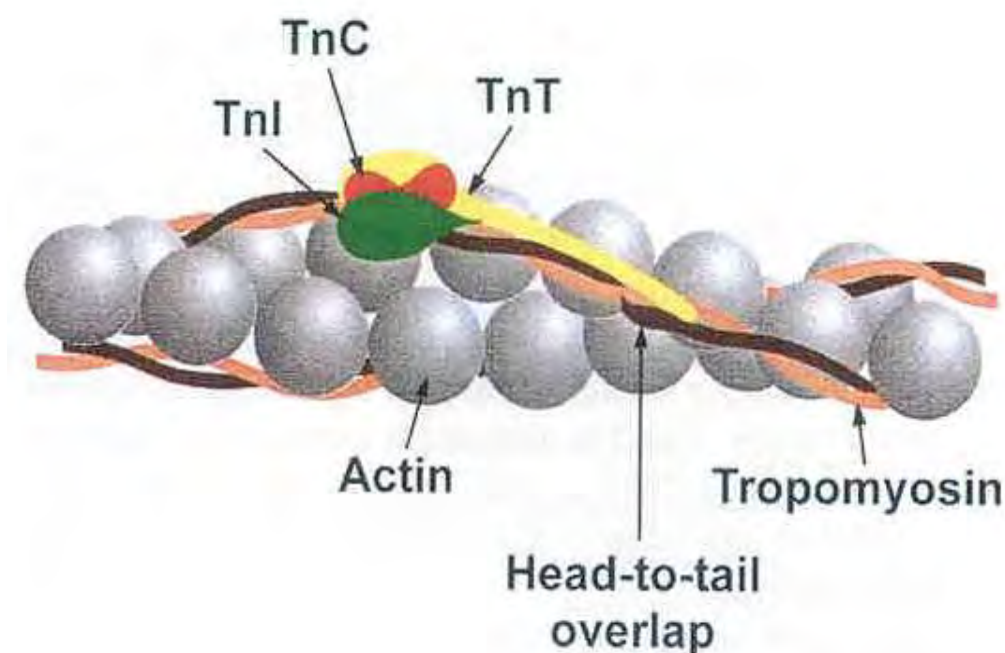


Εικόνα 14. Δομή της G ακτίνης. Το υποτομήμα 1 και 2 του μορίου χωρίζεται από το υποτομήμα 3 και 4 σχηματίζοντας μια εσωτερική πτυχή. Στην πτυχή αυτή μπορεί να συνδεθεί ένα ADP ή ένα APT και ένα δισθενές κατιόν. (Otterbein, Graceffa, & Dominguez, 2001)

Η F-ακτίνη είναι ένας ισχυρός ενεργοποιητής της μυοσίνης αυξάνοντας κατά 200 φορές τη δράση της ως ATPάση. Αυτό γίνεται όχι αυξάνοντας ταχύτητα υδρόλυσης του ATP, αφού η μυοσίνη μπορεί αυτόνομα να υδρολύσει ATP, αλλά αυξάνοντας την ταχύτητα απομάκρυνσης των προϊόντων ADP και P_i . Σε αυτή την ενεργοποίηση της μυοσίνης οφείλει και το όνομά της η ακτίνη (act).

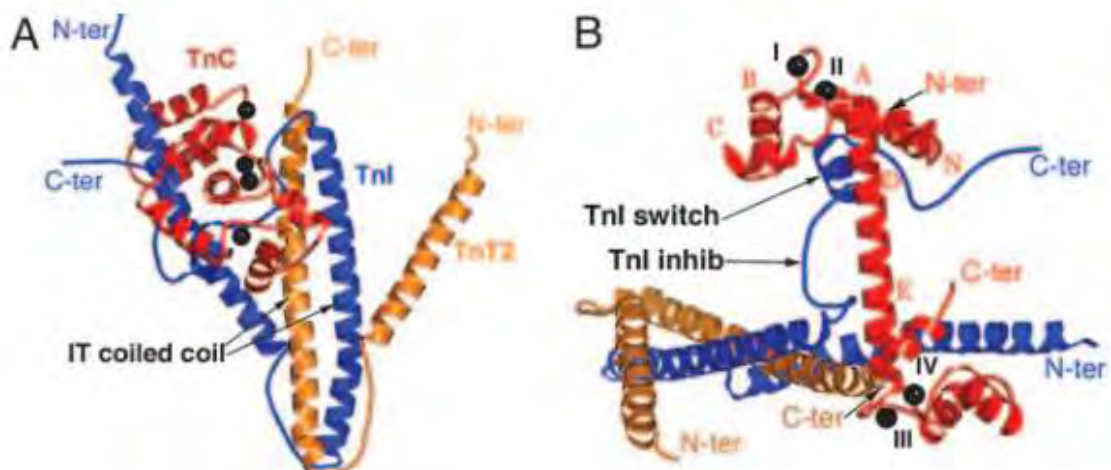
Υπάρχουν τουλάχιστον έξι ισομορφές της ακτίνης που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα. Οι ισομορφές της ακτίνης σχετίζονται με διαφορετικές συσπαστικές ιδιότητες. Για παράδειγμα στους γραμμωτούς μύες υπάρχει ένας τύπος ακτίνης που διαφέρει από αυτόν που βρίσκουμε στον καρδιακό μυ και αυτοί με τη σειρά τους διαφέρουν από διάφορες άλλες μορφές ακτίνης που βρίσκουμε στους λείους μύες ή σε άλλα μη-μυϊκά κύτταρα (Davidson & Sittman, 1999; Μούγιος, 1996).

- ii. **Τροπομυοσίνη.** Το 1946 ο Bailey ανακάλυψε την τροπομυοσίνη. Είναι μία πρωτεΐνη με M.B. 70.000 και αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές υπομονάδες, α και β, οι οποίες περιστρέφονται η μία γύρω από την άλλη με αποτέλεσμα να σχηματίζεται ένας ραβδωτός-σπειροειδής σχηματισμός (*rod shaped coiled-coil structure*). Τα μόρια της τροπομυοσίνης συνδέονται με διάταξη κεφαλή προς ουρά (*head to tail*). Ο σχηματισμός αυτός περιβάλλει ελικοειδώς την ακτίνη και αποκλείει τις θέσεις σύνδεσής της με την μυοσίνη. Υπάρχει ένα μόριο τροπομυοσίνης για κάθε επτά μονομερή ακτίνης με τα οποία συνδέεται (Davidson & Sittman, 1999).



Εικόνα 15. Απεικονίζεται η μοριακή διαμόρφωση της ακτίνης, τροπομοσίνης και τροπονίνης σκελετικού μυός (Gordon, Homsher, & Regnier, 2000) γκρι-ακτίνη, πράσινο-τροπονίνη I, κόκκινο-τροπονίνη C, κίτρινο-τροπονίνη T, καφέ-α υπομονάδα τροπομοσίνης, ροζ-β υπομονάδα τροπομοσίνης.

- iii. **Τροπονίνη.** Το 1963 ο Ebashi ανακάλυψε την ύπαρξη της τροπονίνης, ενώ το 1971 ο Greaser και Gergely απέδειξαν ότι αποτελείται από τρία συστατικά. Είναι μία σφαιροειδής πρωτεΐνη (MB 73.000), που αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές υπομονάδες (C, I, T) και εναποτίθεται κατά μήκος των νηματίων της ακτίνης. Υπάρχει ένα σύμπλεγμα τροπονίνης για κάθε τροπομοσίνη. Το σύμπλεγμα της τροπονίνης σε σύνδεση με την τροπομοσίνη μεσολαβεί στη ρύθμιση της συστολής μέσω των ιόντων Ca^{+2} . Κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα του συμπλέγματος της τροπονίνης παρουσιάζει διαφορετική δράση που είναι απαραίτητη για τη συνολική λειτουργία του συμπλέγματος. Έτσι η τροπονίνη T είναι αυτή που συνδέεται με την τροπομοσίνη, η τροπονίνη I είναι αυτή που συνδέεται με την ακτίνη και τέλος η τροπονίνη C είναι αυτή που συνδέεται με το Ca^{+2} (Davidson & Sittman, 1999).

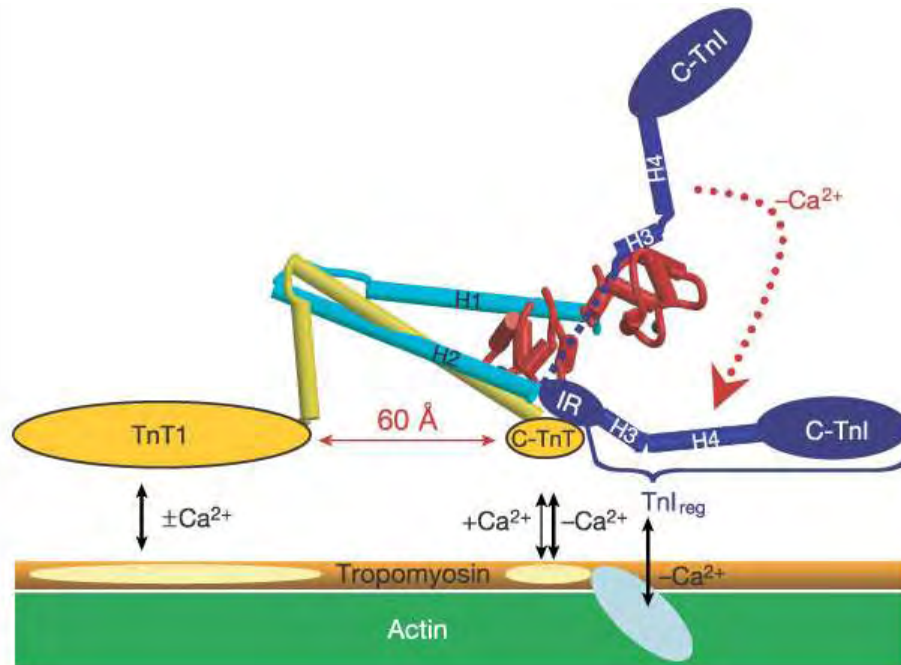


Εικόνα 16. Η δομή της σκελετικής πρωτεΐνης σε δύο προσανατολισμούς. Οι υπομονάδες της τροπονίνης είναι χρωματισμένες ως εξής: πορτοκαλί TnT2, μπλε TnI και κόκκινο TnC. Οι μαύρες σφαίρες συμβολίζουν το ασβέστιο. Α. Φαίνεται η γειτνίαση των δύο τμημάτων TnT2 και TnI. Β. Η έλικα της TnC βρίσκεται κάθετα στον άξονα των TnT2 και TnI. (Vinogradova et al., 2005).

Η TnC έχει σχήμα αλτήρα και φέρει ένα αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο. Και στα δύο άκρα υπάρχουν σχηματισμοί EF hand που είναι συνηθισμένοι στις πρωτεΐνες που δεσμεύουν Ca^{++} . Ουσιαστικά πρόκειται για α-έλικες που συνδέονται ενδιάμεσα με ένα βρόγχο που είναι και η θέση σύνδεσης του Ca^{++} . Στη σκελετική ισομορφή TnC υπάρχουν δύο EF hand στο αμινοτελικό άκρο και δύο στο καρβοξυτελικό, ενώ στην καρδιακή TnC υπάρχει μόνο ένα στο αμινοτελικό άκρο. Στο καρβοξυτελικό άκρο στις θέσεις σύνδεσης που σχηματίζονται μπορούν να συνδεθούν τόσο Ca^{+2} όσο και Mg^{+2} . Οι θέσεις αυτές είναι γνωστές ως δομικές θέσεις διότι η σύνδεση Ca^{+2} ή Mg^{+2} σε αυτές προκαλεί δομικές αλληλεπιδράσεις της TnC και TnI και προάγει τη σταθερότητα του μορίου της τροπονίνης. Η χημική συγγένεια των θέσεων αυτών είναι πολύ υψηλότερη για το Ca^{+2} σε σχέση με το Mg^{+2} , για το λόγω αυτό παρουσία Ca^{+2} αυτό συνδέεται με τις θέσεις κατά προτεραιότητα. Σε συνθήκες χαλάρωσης που τα Ca^{+2} αποσύρονται από το σαρκόπλασμα, το Mg^{+2} μπορεί να καταλάβει τις θέσεις σύνδεσης με αποτέλεσμα αυτές πάντα να είναι κατειλημμένες είτε από Ca^{+2} είτε από Mg^{+2} (Zot & Potter, 1982). Επίσης όταν το Mg^{+2} συνδέεται με τις θέσεις σύνδεσης του καρβοξυτελικού άκρου αντιτίθεται στη σύνδεση του Ca^{+2} στο αμινοτελικό άκρο (Pearson, Swartz, & Geeves, 2008). Οι θέσεις σύνδεσης στο αμινοτελικό άκρο έχουν υψηλότερη ειδικότητα αλλά μικρότερη συγγένεια με το Ca^{+2} . Γι' αυτό στις θέσεις αυτές μπορεί να συνδεθεί μόνο Ca^{+2} .

Η TnT έχει ασύμμετρη δομή. Στα θηλαστικά υπάρχουν τριών ειδών TnT. Η T1 των αργών σκελετικών μυών, η T2 των καρδιακών μυϊκών ινών και η T3 των γρήγορων σκελετικών μυών. Οι ισομορφές της TnT εκφράζονται εξειδικευμένα ανά ιστό (Perry, 1998). Η TnI υπάρχει και αυτή σε τρεις ισομορφές-σε γρήγορες και αργές σκελετικές μυϊκές ίνες και καρδιακές ίνες-. Έχει δομή έλικας και είναι γνωστή ως ανασταλτική υπομονάδα της

τροπονίνης. Αυτό συμβαίνει γιατί η TnI αναστέλλει τη δράση της S1 ATPάσης της μυοσίνης παρουσία της τροπομυοσίνης και της τροπονίνης και απουσία του Ca^{+2} . Η ανασταλτική αυτή δράση σταματά όταν το Ca^{+2} συνδέεται με την TnC (Korpe, Hallauer, Karpati, & Hastings, 1989).



Εικόνα 17. Αναπαράσταση του μορίου της τροπονίνης και οι αλληλεπιδράσεις της με την ακτίνη και την τροπομυοσίνη σε παρουσία και απουσία Ca^{+2} . Η TnC είναι κόκκινη, η TnT είναι κίτρινη και η TnI είναι μπλε. Το τμήμα της TnI που υπόκειται σε βασικές δομικές αλλαγές μετά τη σύνδεση του Ca^{+2} στο αμινοτελικό άκρο της TnC φαίνεται ως σκούρο μπλε. Η Ακτίνη και η τροπομυοσίνη είναι πράσινη και καφέ αντίστοιχα (Takeda, Yamashita, Maeda, & Maeda, 2003).

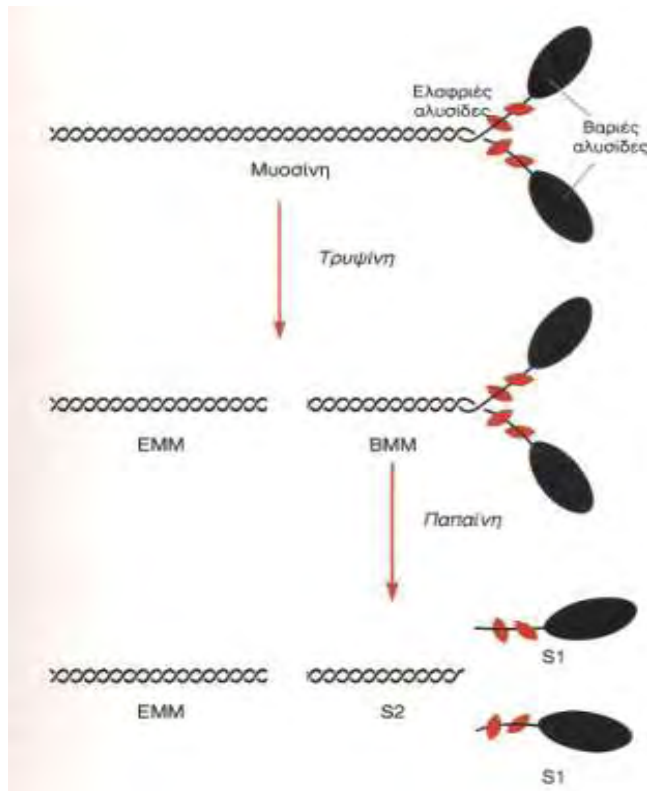
- iv. **Μυοσίνη.** Η μυοσίνη ουσιαστικά είναι μία ATPάση, η οποία μετατρέπει τη χημική ενέργεια σε κατευθυνόμενη κίνηση και ως εκ τούτου μπορεί να χαρακτηριστεί ως μοριακή μηχανή- *molecular motor*. Πιο συγκεκριμένα υδρολύει το ATP σύμφωνα με την αντίδραση $ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i + H^+$. Η ενέργεια που απελευθερώνεται από την υδρόλυση είναι αυτή που τροφοδοτεί και τη μυϊκή συστολή. Το μόριο της μυοσίνης έχει M.B. 480.000 και συνδέεται κατά τη διάρκεια της συστολής με την ακτίνη για να σχηματίσει την ακτομυοσίνη και να επιτύχει τον τελικό σκοπό, την επίτευξη της κίνησης. Η μυοσίνη είναι ασύμμετρη και αποτελείται από δύο βαριές (M.B. 200.000) *heavy chains* και τέσσερις ελαφρές αλυσούς (M.B. 20.000) *light chains*. Η μυοσίνη υπάρχει σε διάφορα σχήματα και μεγέθη.

Έχουν ταυτοποιηθεί 35 υποκατηγορίες μυοσίνης και αναμένεται να βρεθούν και άλλες, όσο η έρευνα προχωράει. Κάθε μία από τις κατηγορίες της μυοσίνης έχει μία ξεκάθαρη δομική απόκλιση (Foth, Goedecke, &

Soldati, 2006). Η μεγάλη ποικιλία των ισομορφών της μυοσίνης που υπάρχουν οφείλεται στο γεγονός ότι συμμετέχουν σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών λειτουργιών. Οι μυοσίνες συνιστούν μία από τις τρεις μεγάλες κατηγορίες κινητικών μορίων και μαζί με τις κινεσίνες και τις δυνεΐνες είναι υπεύθυνες για όλες σχεδόν τις μεγάλης κλίμακας κινήσεις μέσα σε και από τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η πιο γνωστή από τις μυοσίνες είναι η μυοσίνη II, η οποία είναι η κύρια κινητική πρωτεΐνη των μυών. Ωστόσο η ευρύτερη οικογένεια των μυοσινών εμπλέκεται σε ένα μεγάλο φάσμα κινήσεων και διαδικασιών μεταφοράς όπως για παράδειγμα κυστιδιακή μεταφορά, φαγοκύτωση και κυτταρική διαίρεση (Krendel & Mooseker, 2005). Άλλες μυοσίνες φαίνεται να μην έχουν καμία σχέση με τη διαδικασία μεγάλης κλίμακας κινήσεων, αλλά βοηθούν στην παραγωγή και αίσθηση μηχανικών δυνάμεων στο κύτταρο (Coluccio & Geeves, 1999).

Έτσι το 2011 οι Bloemink και Geeves πρότειναν την ταξινόμηση των υποκατηγοριών της μυοσίνης σε τέσσερις τύπους με βάση τη λειτουργία τους. (1) **fast movers**, που χαρακτηριστικά αντιπροσωπεύονται από τη μυοσίνη II των ταχέων μυών των σπονδυλωτών, (2) **slow/efficient force holders**, όπως οι μυοσίνες των βραδέων και λείων μυών των σπονδυλωτών, (3) **strain sensors**, όπως η myo1c και myo1b των θηλαστικών και (4) **gated and processive motors**, όπως η myo5a και myo5b των θηλαστικών. Η ταξινόμηση αυτή προτείνεται με βάση τις βιοκινητικές ιδιότητες των μυοσινών (Bloemink & Geeves, 2011). Το κοινό χαρακτηριστικό όλων αυτών των μορίων ωστόσο είναι μία περιοχή κοντά στο N άκρο (N terminus) των βαρέων αλυσών της μυοσίνης περίπου 840 αμινοξέων, που θα περιγραφεί παρακάτω και έχει αναγνωριστεί ως κινητική περιοχή (motor domain).

Οι βασικές ιδιότητες της μυοσίνης σε σχέση με την παραγωγή κίνησης έχουν αποδοθεί σε συγκεκριμένες περιοχές του μορίου της. Η ταυτοποίηση αυτών των περιοχών πειραματικά και σε αρχικά στάδια έγινε με τη βοήθεια πρωτεολυτικών ενζύμων, που λέγονται πρωτεάσες. Έτσι με κατεργασία της μυοσίνης με τρυψίνη (πρωτεΐνάση του παγκρέατος) προκύπτουν δύο τμήματα, τα οποία ονομάστηκαν ελαφριά (EMM) και βαριά μερομυοσίνη (BMM). Η ελαφριά μερομυοσίνη αποτελεί τον κορμό των παχιών νηματίων, ενώ η βαριά μερομυοσίνη αντιστοιχεί στις γέφυρες σύνδεσης με τα λεπτά νημάτια. Η ελαφριά μερομυοσίνη δεν έχει δραστηριότητα ATPάσης ούτε συνδέεται με την ακτίνη. Η βαριά μερομυοσίνη υδρολύει ATP και συνδέεται με την ακτίνη, αλλά δεν σχηματίζει νημάτια. Παραπέρα επίδραση της παπαΐνης στη βαριά μερομυοσίνη, τη διασπά σε δύο σφαιρικά υποτμήματα (*subfragments*). Αυτά είναι το S1 και το S2 (εικόνα 18). Κάθε κεφαλή S1 περιέχει ένα ενεργό κέντρο ATPάσης, ένα σημείο σύνδεσης με την ακτίνη και δύο ελαφρές αλυσούς (Μούγιος, 1996).



Εικόνα 18. (Μούγιος, 1996) σελ 21. Φαίνεται στο πρώτο σχήμα η δομή της μυοσίνης αποτελούμενη από έξι πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Οι δύο μαύρες που είναι οι βαριές αλυσίδες, σχηματίζουν την ουρά σε α-έλικα και το μεγαλύτερο μέρος των δύο κεφαλών. Οι τέσσερις κόκκινες είναι οι ελαφρές. Στα δύο επόμενα σχήματα φαίνεται το αποτέλεσμα της επίδρασης της τρυψίνης και της παπαΐνης στο μόριο της μυοσίνης.

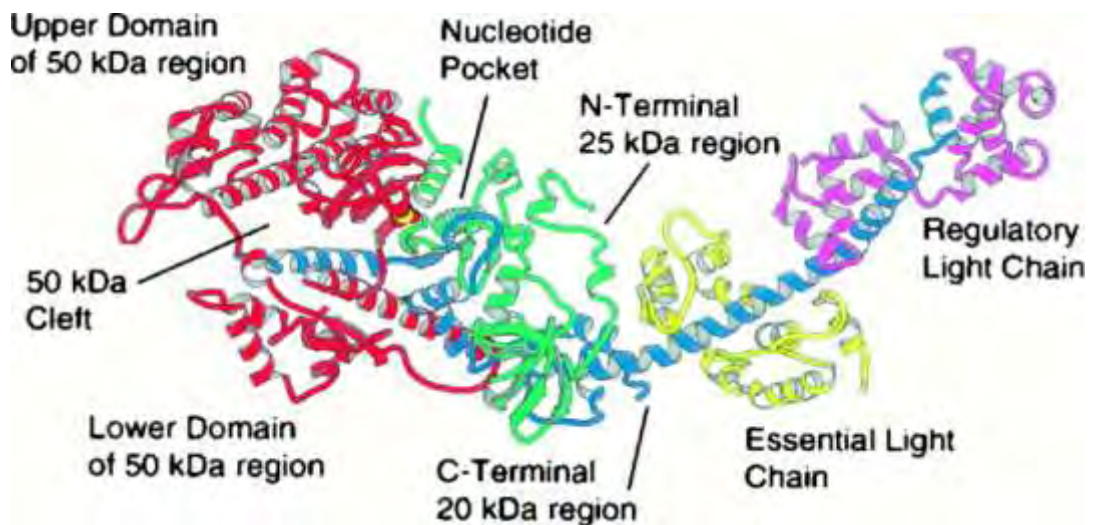
Με βάση την παραπάνω διάσπαση της μυοσίνης σε επιμέρους τμήματα, από τις μελέτες που έγιναν σε αυτά, αλλά και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του μορίου της μυοσίνης, θεωρήθηκε ότι αποτελείται από τρία μέρη:

- την **κεφαλή** (*head domain*)
- το **λαιμό ή βραχίονα** (*neck domain or lever arm*)
- και την **ουρά** (*tail domain*)

Όπως φαίνεται στην εικόνα 18, η κεφαλή αποτελείται από τις (μαύρες) βαριές πολυπεπτιδικές αλυσίδες και θα περιγραφεί αναλυτικότερα αμέσως παρακάτω λόγω του σημαντικού της ρόλου. Ο λαιμός ή βραχίονας αντιστοιχεί στην περιοχή των (κόκκινων) ελαφρών αλυσίδων και αποτελεί συνδετικό τμήμα ανάμεσα στην κεφαλή και την ουρά. Τέλος η ουρά αντιστοιχεί στο τμήμα των βαριών αλυσίδων πέρα από το λαιμό και διατάσσονται σε α-έλικα. Ο λαιμός και η κεφαλή της μυοσίνης σχηματίζουν τις εγκάρσιες γέφυρες (crossbridges) με τις οποίες γίνεται η αλληλεπίδραση ακτίνης-μυοσίνης (Μούγιος, 1996).

Μελετώντας το περισσότερο ενδιαφέρον, από άποψη δράσης στη μυϊκή συστολή, υποτιμήμα S1 βρέθηκαν αναλυτικότερα περιοχές που το απαρτίζουν και παίζουν ουσιαστικό ρόλο στον κύκλο της εγκάρσιας γέφυρας και ιδιαίτερα η περιοχή της κεφαλής που αναφέραμε παραπάνω. Κρύσταλλοι της εγκάρσιας γέφυρας της μυοσίνης απομονώθηκαν για πρώτη φορά από τους Rayment και Winkelmann το 1984. Μελέτες με ηλεκτρονικό

μικροσκόπιο των κρυστάλλων αυτών έδειξαν ότι οι εγκάρσιες γέφυρες είχαν μορφή γυρίνου (tadpole-like form) (Winkelmann, Baker, & Rayment, 1991). Η κρυσταλλογραφική δομή του υποτιμήματος S1 της μυοσίνης σκελετικής ίνας όρνιθας αναφέρθηκε πρώτη φορά το 1993 από τους Rayment et al (Rayment & Rypniewski, 1993). Περιγράφηκε τότε ότι το τμήμα του μορίου χαρακτηρίζεται από ένα μεγάλο αριθμό βαθιών σχισμών (*clefts*) και εσοχών (*pockets*), μία από τις οποίες σχηματίζει τη θέση σύνδεσης των νουκλεοτιδίων (*nucleotide binding site*) π.χ.ATP. Μία δεύτερη κυρίαρχη σχισμή (50kD cleft) χωρίζει την κεφαλή της μυοσίνης σε δύο βασικές περιοχές (upper and lower domain) και εκτείνεται από τη θέση σύνδεσης των νουκλεοτιδίων μέχρι τη θέση σύνδεσης ακτίνης μυοσίνης (Rayment, 1996). Η θέση σύνδεσης ακτίνης και μυοσίνης περιλαμβάνει τμήματα και από τις δύο αυτές περιοχές (upper and lower domain) και αφορά την αλληλεπίδραση των υδρόφοβων αμινοτελικών άκρων τόσο της ακτίνης όσο και της μυοσίνης (Rayment & Holden, 1993). Θεωρείται ουσιαστικά ότι αυτές οι δύο περιοχές (upper and lower domain) εμπλέκονται ενεργά στη σύνδεση ακτίνης και μυοσίνης με το άνοιγμα και κλείσιμο της σχισμής που βρίσκεται ανάμεσά τους (Εικ 19) (Rayment et al., 1993).



Εικόνα 19. Απεικονίζεται η δομή του υποτιμήματος S1 της μυοσίνης σκελετικού μύος όρνιθας, που επιτεύχθηκε με το πρόγραμμα Molscrip (Rayment, 1996).

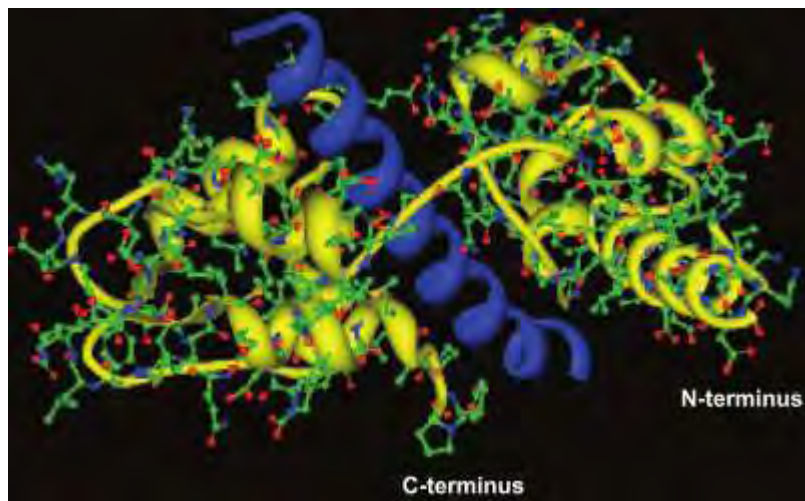
Στη συνέχεια στο βραχίονα (lever arm) της μυοσίνης υπάρχει μία περιοχή που αποτελείται από μία μακριά α-έλικα 8,5nm βαριάς αλύσου, η οποία εμπεριέχει δύο IQ motifs τα οποία σχηματίζουν θέσεις σύνδεσης με τις ελαφρές αλύσους της μυοσίνης. Οι ελαφρές αλύσους της μυοσίνης διακρίνονται σε απαραίτητες ελαφρές αλύσους (*essential light chains- ELC or alkali light chains*) και σε ρυθμιστικές ελαφρές αλύσους (*regulatory light chains- RLC*) (Rayment & Rypniewski, 1993). Ανήκουν στην οικογένεια των EF-hand πρωτεϊνών, που συνδέονται με το Ca^{++} . Οι δύο αυτές κατηγορίες ελαφρών αλυσίδων βοηθούν στην σταθεροποίηση της α-έλικας

της βαριάς αλυσίδας του βραχίονα κάνοντάς την άκαμπτη (Hernandez & Jones, 2007). Τα τελευταία χρόνια επίσης έχει αναθεωρηθεί ο ρόλος των ελαφρών αλυσίδων, οι οποίες πλέον πιστεύεται ότι συμμετέχουν στις δομικές αλλαγές της κεφαλής κατά την αλληλεπίδραση με την ακτίνη, καθώς και σε αυτές που γίνονται κατά την υδρόλυση του ATP (Rayment, 1996).

Απαραίτητες ελαφρές αλυσίδες- ELC

Στην εικόνα 20 φαίνεται με κίτρινο χρώμα η ELC της μυοσίνης του χτενιού και ο τρόπος με τον οποίο συνδέεται με την α -έλικα της MHC, που φαίνεται με μπλέ χρώμα. Διακρίνεται ένα αμινοτελικό (N-terminus) και ένα καρβοξυτελικό άκρο (C-terminus).

Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι κατά τη διάρκεια της μυϊκής σύσπασης, το θετικά φορτισμένο αμινοτελικό άκρο της ELC συνδέεται απευθείας με το αρνητικά φορτισμένο καρβοξυτελικό άκρο της F-ακτίνης (Hernandez & Jones, 2007; Timson, Trayer, & Trayer, 1998).

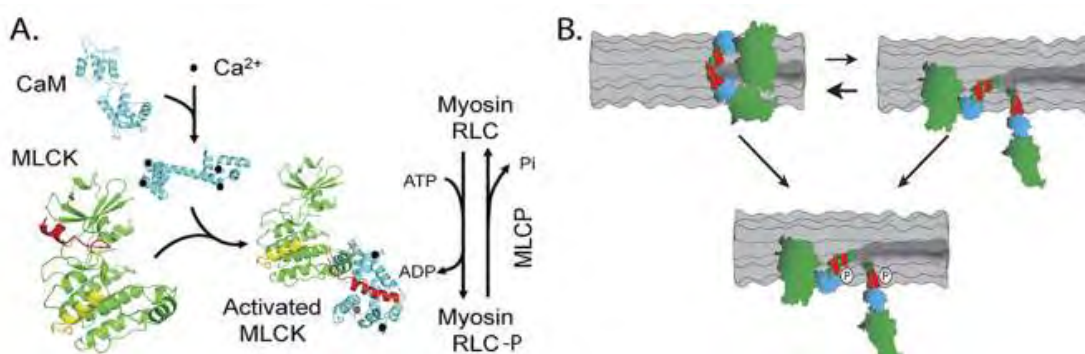


Εικόνα 20. Σχηματική αναπαράσταση της απαραίτητης ελαφράς αλυσίδας της μυοσίνης (ELC) σε σχέση με την περιοχή της α -έλικας IQ motif της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης. Η κρυσταλλική δομή της περιοχής των RLC του χτενιού (Hernandez & Jones, 2007; Houdusse & Cohen, 1996).

Σε μία ανασκόπηση του Timson το 2003 υποστηρίζεται ότι η αλληλεπίδραση της ELC με την ακτίνη μπορεί δυνητικά να επηρεάσει τη λειτουργία της μυοσίνης ως κινητική μονάδα τροποποιώντας την σύνδεση της κεφαλής της μυοσίνης (S1) με την ακτίνη και με τον τρόπο αυτό αλλάζει όλη την κινητική του κύκλου της εγκάρσιας γέφυρας (Timson, 2003).

Ρυθμιστικές ελαφρές αλυσίδες- RLC

Όσον αφορά τις RLC έχει φανεί ότι η φωσφορυλίωσή τους, ενώ δεν έχει καμία σημαντική επίδραση στη λειτουργία της μυοσίνης ως ATPάσης, αλλάζει τις ιδιότητες της μυοσίνης σχετικές με τον κύκλο της εγκάρσιας γέφυρας, επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο τις ιδιότητες της κίνησης. Για παράδειγμα φάνηκε να υπάρχει μία χρονική συσχέτιση ανάμεσα στο βαθμό φωσφορυλίωσης των RLC και στην ενίσχυση της δύναμης σε ισομετρικές κινήσεις σε ταχείς σκελετικούς μύες. Τα ίδια συμπεράσματα έχουν εξαχθεί και για τα κοιλιακά και κολπικά κύτταρα του μυοκαρδίου, όπου η φωσφορυλίωση των RLC αυξάνει την επίδραση του Ca^{++} στον κύκλο της εγκάρσιας γέφυρας και κατά συνέπεια επηρεάζει την παραγωγή δύναμης. (Kamm & Stull, 2011)



Εικόνα 21 . Φωσφορυλίωση (εξαρτώμενη από Ca^{++}) των RLC στους σκελετικούς μύες. **A.** Ανενεργή κινάση των ελαφρών αλυσών της μυοσίνης σκελετικού μύος (skMLCK) επειδή το ρυθμιστικό τμήμα περιλαμβάνει αυτοανασταλτικές αλληλουχίες (κίτρινο) και αλληλουχίες που δεσμεύουν την καλμοδουλίνη (κόκκινο) στην καταλυτική σχισμή ανάμεσα στα N- και C- άκρα του καταλυτικού πυρήνα (πράσινο). Το ασβέστιο (Ca^{++}) δεσμεύεται από τέσσερις περιοχές στην καλμοδουλίνη (CaM) και το σύμπλέγμα δεσμεύεται στο MLCK για να εκτοπίσει το ρυθμιστικό τμήμα από την καταλυτική σχισμή για τη φωσφορυλίωση του RLC. MLCP (myosin light chain phosphatase). **B.** Κεφαλές μυοσίνης γραμμωτού μύος (πράσινο) με τις ELC (μπλε) και RLC (κόκκινο). Η φωσφορυλίωση των RLC αυξάνει την κινητικότητα των κεφαλών της μυοσίνης ώστε να απομακρυνθούν από την επιφάνεια των παχιών νηματίων προς τα λεπτά νηματία ακτίνης στους σκελετικούς και στον καρδιακό μυ. (Kamm & Stull, 2011)

2.4 Τύποι μυϊκών ινών

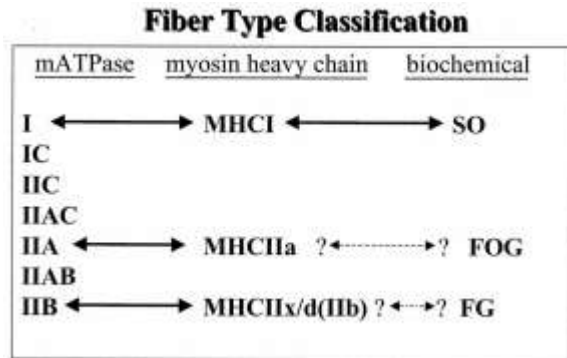
Το 1873 ο Ranvier παρατήρησε ότι μπορεί να συσχετίσει το διαφορετικό χρώμα των διάφορων μηριαίων μυών του κουνελιού με διαφορές στις ταχύτητες συστολής. Το 1962 ο Engel πρότεινε μία ταξινόμηση των μυϊκών ινών σε τύπου I και τύπου II (τύπου I-υψηλή δραστηριότητα ενζύμων αερόβιου μεταβολισμού και χαμηλή δραστηριότητα μυοσινικής ATPάσης και τύπου II- χαμηλή δραστηριότητα αερόβιων ενζύμων και υψηλή δραστηριότητα μυοσινικής ATPάσης) (Engel, 1998). Το 1996 ο Aj. McComas ταξινόμησε στο σύγγραμά του όλες τις μυϊκές ίνες σε βραδείες και ταχείες ανάλογα με την ταχύτητα βράχυνσής τους. Η ταξινόμηση αυτή ανταποκρινόταν και σε μορφολογικές διαφορές όπως για παράδειγμα ότι οι ταχείες μυϊκές ίνες φαίνονταν λευκές σε κάποια είδη που μελετήθηκαν, ενώ οι βραδείες φαίνονταν κόκκινες. Σε δεύτερο χρόνο και μετά από ιστολογικές αναλύσεις βρέθηκε ότι υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στη δραστηριότητα της ATPάσης της μυοσίνης και την ταχύτητα συστολής. Αυτή η ιστοχημική ανάλυση οδήγησε τελικά σε μία αρχική ταξινόμηση των μυϊκών σε τύπου I (βραδείες) και τύπου II (ταχείες).

Ωστόσο έχουμε καταλήξει σήμερα να ταξινομούμε τις μυϊκές ίνες με τρεις διαφορετικές μεθόδους: την ιστοχημική χρώση της μυοσινικής ATPάσης, τις ισομορφές των βαρέων αλύσων της μυοσίνης (MHC) και το βιοχημικό προσδιορισμό των μεταβολικών τους ενζύμων (Scott, Stevens, & Binder-Macleod, 2001; Μούγιος, 1996).

Η ταξινόμηση των μυϊκών ινών με βάση την ευαισθησία της μυοσινικής ATPάσης στο PH οδήγησε σε 7 τύπους ινών, που φαίνονται στην εικόνα 21 και είναι : I, ΙΑ, ΙΒ, ΙΙΑ και πιο πρόσφατα ΙC, ΙΙC, ΙΙΑC, ΙΙΑΒ. Στις ταχείες μυϊκές ίνες (τύπου ΙΙ) του ανθρώπου η ταχύτητα της υδρόλυσης του ATP είναι 2-3 φορές μεγαλύτερη από ότι στις βραδείες (τύπου Ι) λόγω της μεγαλύτερης ενεργότητας της μυοσινικής ATPάσης. Κατά σειρά ενεργότητας της ATPάσης, από τις λιγότερο προς τις περισσότερο ενεργές, οι μυϊκές ίνες είναι οι: Ι, ΙC, ΙΙC, ΙΙΑC, ΙΙΑ, ΙΙΑΒ, και ΙΙΒ. Οι μυϊκές ίνες τύπου Ι έχουν ATPάση της μυοσίνης η οποία έχει μεγαλύτερη ενεργότητα σε όξινο PH, ενώ στις μυϊκές ίνες τύπου ΙΙ η μυοσινική ATPάση είναι περισσότερο ενεργή σε αλκαλικό PH. Οι άλλες κατηγορίες των μυϊκών ινών έχουν ιδιότητες ενδιάμεσες μεταξύ των Ι και ΙΙ μυϊκών ινών (Dubowitz & Pearse, 1960; Scott et al., 2001).

Επίσης οι μυϊκές ίνες με βάση τις ισομορφές των βαρέων αλύσων της μυοσίνης που περιέχουν, ταξινομούνται σε ΜΗCΙ, ΜΗCΙΙα και ΜΗCΙΙβ (ΜΗC_{x/d} στους ανθρώπους) και αντιστοιχούν στην ταξινόμηση με βάση την ATPάση στις Ι, ΙΑ και ΙΙΒ.

Τέλος η τρίτη ταξινόμηση αφορά βιοχημικά κριτήρια και συγκεκριμένα την ποσοτικοποίηση ενζύμων των μυϊκών ινών που αντικατοπτρίζουν τις μεταβολικές τους δυνατότητες. Αυτές οι δυνατότητες αναφέρονται στις αερόβιες/οξειδωτικές και αναερόβιες/γλυκολυτικές δυνατότητες. Έτσι ταξινομούνται σε ταχείας-σύστολης γλυκολυτικές ίνες (fast-twitch glycolytic FG), ταχείας-συστολής οξειδωτικές (fast-twitch oxidative FOG) και βραδείας συστολής οξειδωτικές (slow-twitch oxidative SO) όπως φαίνονται στην εικόνα 18 (Scott et al., 2001).



Εικόνα 22. Σύγκριση των τριών τρόπων ταξινόμησης των μυϊκών ινών: ιστοχημικά με βάση την ATPάση της μυοσίνης (mATPase), με βάση τις βαριές αλυσίδες της μυοσίνης και τέλος βιοχημικά με βάση τα μεταβολικά ένζυμα. Στους ανθρώπους η (MHCIIb) βαριά αλυσίδα της μυοσίνης IIb αναφέρεται ακριβέστερα πλέον ως (MHCIIx/d) IIx/d. Τα ερωτηματικά αναφέρονται στη μικρή συσχέτιση ανάμεσα στις τρεις μορφές ταξινόμησης στις συγκεκριμένες μορφές μυϊκών ινών (Scott et al., 2001).

Στην εικόνα αυτή φαίνεται η αντιστοιχία των κατηγοριών των μυϊκών ινών σε σχέση με την κατηγοριοποίησή τους όπως περιγράφηκε παραπάνω. Έτσι οι μυϊκές ίνες τύπου I αντιστοιχούν στα χαρακτηριστικά της ομάδας MHCI και SO, οι τύπου IIA στις MHCIIa και με μικρότερη συσχέτιση στις FOG και τέλος οι IIB στις MHCIIx/d (ανθρώπινες) ή IIb και με μικρότερη συσχέτιση με τις FG. Αυτό αποδεικνύει ότι όλα τα παραπάνω είναι απλά μια κατηγοριοποίηση για την καλύτερη κατανόηση των ιδιοτήτων των μυϊκών ινών και ότι οι κατηγορίες τους αναφέρονται στις ίδιες μυϊκές ίνες με άλλο όνομα ανάλογα με τον τρόπο προσέγγισής τους (Scott et al., 2001).

Περιληπτικά λοιπόν η ταξινόμηση των σκελετικών μυϊκών ινών μπορεί να απεικονιστεί στον παρακάτω πίνακα 1. Εκεί φαίνεται ότι οι βραδείες ίνες έχουν μικρή ταχύτητα συστολής (μικρότερη από 17mm/sec) και έχουν ερυθρό σκούρο χρώμα λόγω της μεγάλης ποσότητας μυοσφαιρίνης και του μεγάλου αριθμού των μιτοχονδρίων που φέρουν. Οι βραδείες ίνες έχουν υψηλή οξειδωτική ικανότητα και μεγάλη αντοχή στον κάματο. Για το λόγο αυτό ονομάζονται οξειδωτικές και περιβάλλονται από μεγάλο αριθμό αιμοφόρων αγγείων.

Οι ταχείες ίνες παρουσιάζουν μεγάλη ταχύτητα συστολής (περίπου 42mm/sec), είναι ανοιχτόχρωμες και έχουν μεγάλη διάμετρο. Επίσης οι ταχείες μυϊκές ίνες έχουν λιγότερα μιτοχόνδρια, αλλά έχουν μεγαλύτερη ποσότητα γλυκογόνου και γλυκολυτικών ενζύμων. Έτσι χαρακτηρίζονται γλυκολυτικές ίνες (Vander et al., 2001). Παρατηρούμε ότι οι μυϊκές ίνες τύπου IIA αν και έχουν μεγάλη οξειδωτική ικανότητα έχουν ενδιάμεση αντοχή στην κόπωση (Γκίμπα-Τζιαμπίρη, 1999).

Με βάση τα παραπάνω οι γραμμωτές μυϊκές ίνες μπορούν να ταξινομηθούν συνολικά σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Ταξινόμηση σκελετικών μυϊκών ινών			
ιδιότητα	Τύπος I	Τύπος IIa	Τύπος IIb
Ταχύτητα συστολής	μικρή	μεγάλη	πολύ μεγάλη
Δύναμη	μικρή	ενδιάμεση	πολύ μεγάλη
Αντοχή	μεγάλη	ενδιάμεση	μικρή
Ερυθρό χρώμα	ναι	ναι	όχι
Μυοσφαιρίνη	υψηλή	Μέτρια προς υψηλή	χαμηλή
Αιμοφόρα αγγεία	πολλά	ενδιάμεσα	λίγα
Μιτοχόνδρια	πολλά	πολλά	λίγα
Μέγιστη διάρκεια δράσης	ώρες	<30λεπτά	<1λεπτό
Κύριο αποθηκευτικό καύσιμο	τριγλυκερίδια	φωσφοκρεατίνη, γλυκογόνο	φωσφοκρεατίνη, γλυκογόνο
Διάμετρος	μικρή	μεγάλη	μεγάλη
Οξειδωτική ικανότητα	μεγάλη	μεγάλη	μικρή
Γλυκολυτική ικανότητα	μικρή	μεγάλη	μεγάλη

Πίνακας 1. Ταξινόμηση σκελετικών μυϊκών ινών με βάση τα χαρακτηριστικά τους.

Μετά από αυτή την ταξινόμηση θα πρέπει να τονίσουμε ότι η πραγματική λειτουργική μονάδα του μυοσκελετικού συστήματος είναι η κινητική μονάδα (motor unit) (Burke, 1975). Ως κινητική μονάδα ορίζεται ένας α-νευρώνας, ο οποίος εκπορεύεται από το πρόσθιο κέρασ της φαιάς ουσίας του νωτιαίου μυελού με όλες τις μυϊκές ίνες που εννευρώνει. Οι κινητικές μονάδες διαιρούνται σε ομάδες με βάση τα χαρακτηριστικά σύσπασης και κόπωσης των μυϊκών ινών (Mc Comas, 1996). Με βάση την ταχύτητα σύσπασης οι κινητικές μονάδες ταξινομούνται σε βραδείας σύσπασης (S-slow twitch) και ταχείας σύσπασης (F-fast twitch). Οι F κινητικές μονάδες διαιρούνται περαιτέρω σε ταχείας σύσπασης ανθεκτικές στην κόπωση, ταχείας σύσπασης ενδιάμεσες και ταχείας σύσπασης που κοπώνονται εύκολα. Το 1965 ο Elwood Henneman διατύπωσε τη θεωρία της επιστράτευσης των κινητικών νευρώνων και κατ' επέκταση των κινητικών μονάδων γνωστή ως size principle (Henneman, 1957). Η θεωρία αφορά σε έναν μηχανισμό προστασίας του οργανισμού που επιστρατεύει κάθε φορά ανάλογα με τις ανάγκες κάθε κίνησης συγκεκριμένους κινητικούς νευρώνες, άρα και συγκεκριμένες μυϊκές ίνες που ανήκουν στην ίδια κινητική μονάδα με αυτούς τους νευρώνες.

2.5 Η υπόθεση των συρόμενων νηματίων-ο κύκλος της εγκάρσιας γέφυρας (*the sliding filament hypothesis-crossbridge cycle*)

Η υπόθεση των συρόμενων νηματίων (Hanson and Huxley 1954; Huxley and Niedergerke 1954) έχει σήμερα ηλικία 57 ετών και αποτέλεσε τη βάση της σύγχρονης έρευνας για τη μυϊκή συστολή. Η ανακάλυψη των εγκάρσιων γεφυρών της μυοσίνης (Huxley HE 1957) βοήθησε στην κατανόηση του γιατί τα νημάτια «σύρονται». Η μυοσίνη από μόνη της αποτελεί μία ασθενή ΑΤΡάση. Αντίθετα όταν συνυπάρχει με την ακτίνη η ενεργότητά της ως ένζυμο αυξάνεται (Lyman, 1971). Η διαπίστωση αυτή βοήθησε στην κατανόηση του φαινομένου από την άποψη της κινητικής.

Τα τελευταία 20 χρόνια έχουμε καταλήξει ότι η ακτίνη αποτελεί τον πιο παθητικό «συνέταιρο» στην διαδικασία του κύκλου της εγκάρσιας γέφυρας που οδηγεί στη μεταβολή θέσης μεταξύ των νηματίων. Ωστόσο διαδραματίζει το ρόλο του να χορηγεί θέσεις σύνδεσης στη μυοσίνη με τη βοήθεια των πρωτεϊνών τροπονίνη και τροπομυοσίνη και έτσι συντελεί και αυτή εν μέρει στη μυϊκή συστολή.

Η διέγερση των μυϊκών ινών γίνεται από κινητικές ώσεις που φτάνουν στη νευρομυϊκή σύναψη –στο κέντρο της μυϊκής ίνας –και έτσι δημιουργείται το δυναμικό δράσης που διαδίδεται ως προς τα άκρα της ως εκπολωτικό κύμα. Το δυναμικό δράσης μεταδίδεται τόσο στο σαρκείλλημα όσο και στη μεμβράνη του σαρκοσωληνωτού συστήματος.

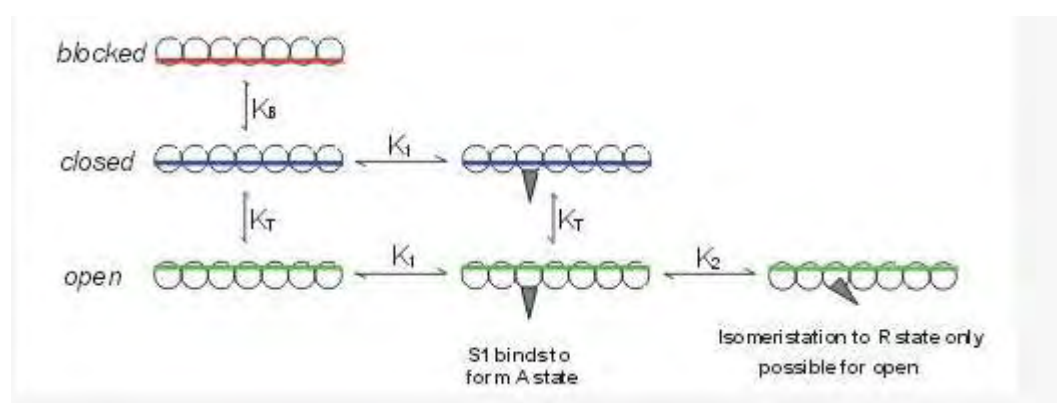
Ο μηχανισμός συστολής των μυϊκών ινών γίνεται με μηχανισμούς που ακολουθούν τις παρακάτω αντιδράσεις:

1. Απελευθέρωση Ca^{++} από τις τελικές δεξαμενές.

Η αλληλεπίδραση της ακτίνης με τη μυοσίνη στο γραμμωτό μυ αρχικά ρυθμίζεται από την αλληλεπίδραση τριών στοιχείων, της τροπομυοσίνης (Tm), της τροπονίνης (Tn) και του Ca^{++} , που είναι γνωστή ως ρύθμιση των λεπτών νηματίων (thin filament regulation). Η διαθεσιμότητα του Ca^{++} στα λεπτά νημάτια είναι καθοριστικό στοιχείο της ρύθμισης λεπτών νηματίων για τη μυϊκή συστολή. Όταν απουσιάζει το ασβέστιο από την TnC, η Tm αναστέλλει τη δέσμευση της μυοσίνης στην ακτίνη ενώ στην παρουσία του Ca^{++} η αλληλεπίδραση της μυοσίνης με την ακτίνη επιτρέπονται. Το μυϊκό κύτταρο δαπανά πολύ μεγάλα ποσά ενέργειας για να εξασφαλίσει ότι το Ca^{++} θα είναι παρόν στα λεπτά νημάτια μόνο όταν απαιτείται. Είναι σημαντικό να υπάρχει Ca^{++} διαθέσιμο για τη μυϊκή συστολή, αλλά είναι εξίσου σημαντική η απόσυρση του Ca^{++} από το σύστημα ώστε να επιτυγχάνεται η μυϊκή χάλαση. Έχει υπολογιστεί ότι το 70% της ενέργειας στα μυϊκά κύτταρα καταναλώνεται κατά τη διάρκεια του κύκλου της εγκάρσιας γέφυρας και το υπόλοιπο 30% ξοδεύεται για τη ρύθμιση της κυκλοφορίας του Ca^{++} μέσα και έξω από το κύτταρο (Hill, 1938).

Με την άφιξη του δυναμικού δράσης οι διάλυτοι Ca^{++} στα T σωληνάκια ανοίγουν και επιτρέπουν την είσοδο του ασβεστίου στο κύτταρο, η οποία στα καρδιακά κύτταρα είναι αυτή που προκαλεί τη περαιτέρω απελευθέρωση του Ca^{++} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο μέσω των υποδοχέων της ρυανοδίνης. Στις σκελετικές ίνες η απελευθέρωση του Ca^{++} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο διεγείρεται απευθείας από την εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης (Lamb, 2002). Την απομάκρυνση του Ca^{++} από το σαρκόπλασμα αναλαμβάνουν οι ΑΤΡάσες του Ca^{++} , οι Na/ Ca^{++} ανιμεταφορείς της σαρκοπλασματικής μεμβράνης και οι μεταφορείς Ca^{++} των μιτοχονδρίων (Bers, 2002).

Οι McKillop και Geeves το 1993 περιέγραψαν τη ρύθμιση των λεπτών νηματίων με το μοντέλο της τριπλής κατάστασης (three state model of thin filament regulation). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο το λεπτό νημάτιο υπάρχει σε τρεις διαφορετικές καταστάσεις που βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία μεταξύ τους: κατάσταση αποκλεισμού (blocked), κλειστή (closed) και ανοιχτή (open). Ισχυρή δέσμευση της ακτίνης με τη μυοσίνη συμβαίνει μόνο στην ανοιχτή κατάσταση. Στην κλειστή κατάσταση η μυοσίνη μπορεί να συνδεθεί ασθενώς με την ακτίνη προάγοντας την μετάβαση του λεπτού νηματίου στην ανοιχτή κατάσταση. Η μετάβαση από την κατάσταση αποκλεισμού στην κλειστή κατάσταση εξαρτάται από την παρουσία του Ca^{++} (σταθερά ισορροπίας K_B) πάνω στις πρωτεΐνες του λεπτού νηματίου, από την οποία εξαρτάται σε μικρότερο βαθμό η μετάβαση από την κλειστή στην ανοιχτή κατάσταση (σταθερά ισορροπίας K_T), όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 23. Three state model of thin filament regulation. Η δραστηριότητα ATPάσης (μυοσίνη) παρατηρείται μόνο στην ανοιχτή κατάσταση κατά τη διάρκεια του ισομερισμού της μυοσίνης στην διάταξη R (rigor conformation) (<http://www.kent.ac.uk/bio/geeves/?tab=research,> n.d.)

2.Ενεργοποίηση.

Για να κινηθεί ο μυς πρέπει να αλληλεπιδράσει η ακτίνη με τη μυοσίνη κάτω από τις απαιτούμενες συνθήκες που αναφέρθηκαν παραπάνω (κατάσταση κλειστή και ανοιχτή). Όταν το κύτταρο είναι σε ηρεμία η αλληλεπίδραση αυτή αναστέλλεται. Η μεγάλη είσοδος Ca^{++} στο κυτταρόπλασμα αίρει την αναστολή αυτή.

α. το Ca^{++} συνδέεται με το υποτιμήμα της τροπονίνης, την τροπονίνη C.

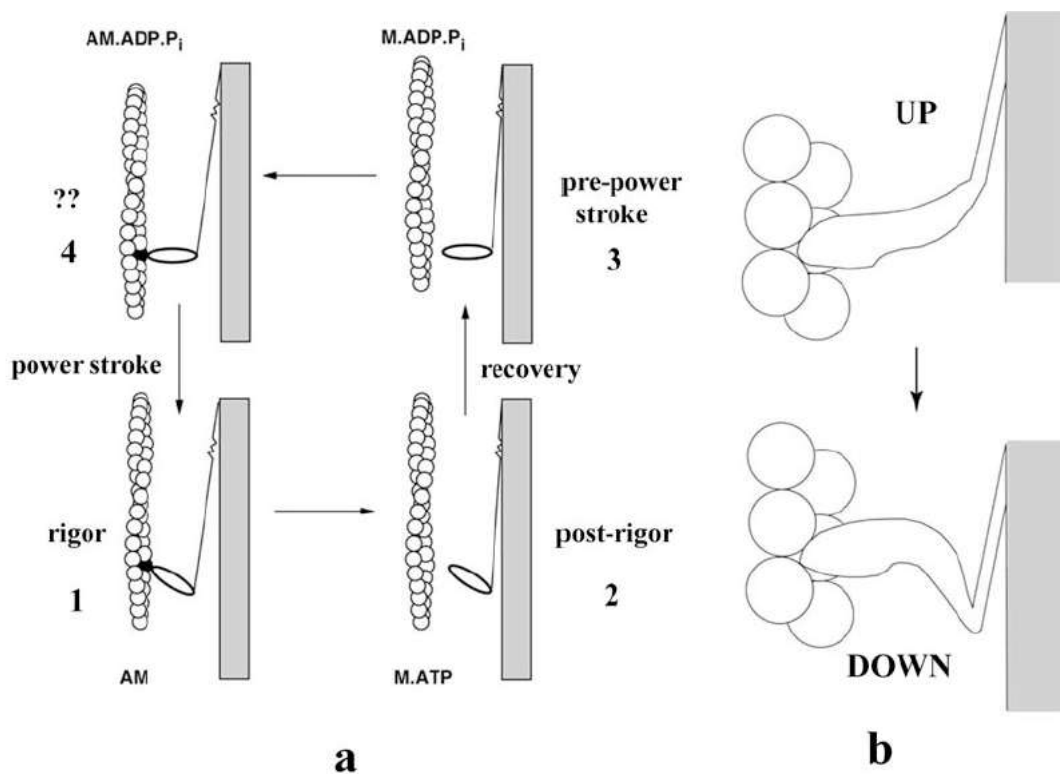
β. η σύνδεσή αυτή αλλάζει τη θέση της τροπομυοσίνης πάνω στην ακτίνη (Huxley, 1972). Σε μελέτες των Poole et al 2006 φάνηκε ότι η τροπομυοσίνη μετακινείται κατά 25° ώστε να αποσυρθεί από τη θέση αποκλεισμού στην κλειστή θέση -μετά την προσθήκη Ca^{++} - επιτρέποντας την ασθενή σύνδεση ακτίνης και μυοσίνης. Στην ανοιχτή θέση μετακινείται κατά 35° από την αρχική θέση αποκλεισμού επιτρέποντας την ελεύθερη και ισχυρή σύνδεση ακτίνης και μυοσίνης (Poole et al., 2006).

γ. η αλλαγή της θέσης της τροπομυοσίνης απελευθερώνει τις θέσεις σύνδεσης της ακτίνης με τη μυοσίνη. Αύξηση της συγκέντρωσης του Ca^{++} από 0,1 σε 10 $\mu\text{mol/L}$ είναι ικανοποιητική για να προκαλέσει ενεργοποίηση όλων των πρωτεϊνών μιας μυϊκής ίνας (Bullock, Boyle, & Wang, 2001).

3.Κύκλος εγκάρσιας γέφυρας-Παραγωγή τάσης.

Ο κύκλος της εγκάρσιας γέφυρας περιλαμβάνει 4 στάδια. Σε κάθε κύκλο υδρολύεται ένα ATP και κάθε φορά έχουμε μετακίνηση της μυοσίνης ως προς την ακτίνη κατά 10nm, ενώ η δύναμη που παράγεται σε κάθε γέφυρα δεν ξεπερνά τα λίγα picoNewton.

Ο κύκλος ξεκινά από τη φάση 1 (βλέπε εικόνα 24a) όπου η μυοσίνη και η ακτίνη είναι στενά συνδεδεμένες (rigor state) και το ATP απουσιάζει. Μόλις το ATP συνδέεται στη θέση σύνδεσής του στη μυοσίνη, που περιγράψαμε παραπάνω, η εγκάρσια γέφυρα της μυοσίνης αποσυνδέεται από την ακτίνη (2)(post rigor state-weak binding). Αμέσως μετά αλλάζει η διαμόρφωση της εγκάρσιας γέφυρας με τέτοιο τρόπο ώστε να αλλάξει η γωνία του βραχίονά της. Η γωνία αυτή έχει υπολογιστεί στις 60° και μάλιστα βρέθηκε ότι η ταχύτητα με την οποία τα νημάτια σύρονται μεταξύ τους σχετίζεται αναλογικά με το μήκος του βραχίονα (A. Bennett, 1984). Η κατάσταση αυτή λέγεται pre-power-stroke δηλ κατάσταση λίγο πριν τη συστολή(3). Στη φάση αυτή γίνεται η υδρόλυση του ATP καθώς ενεργοποιείται η λειτουργία της μυοσίνης ως ATPάση. Έτσι παράγονται τα προϊόντα ADP+Pi. Μόλις γίνεται η σύνδεση της εγκάρσιας γέφυρας με την ακτίνη απελευθερώνονται τα προϊόντα της υδρόλυσης και τα νημάτια ετοιμάζονται για τη διαδικασία μεταβολής της θέσης μεταξύ τους (συρόμενα νημάτια) ώστε να επιτευχθεί κίνηση (4). Στο στάδιο αυτό γίνονται αλλαγές στη διαμόρφωση (conformational changes) της εγκάρσιας γέφυρας για ακόμη μία φορά που είναι γνωστές ως power stroke (εικόνα 24b) (Lyman, 1971).



Εικόνα 24. Ο κύκλος της εγκάρσιας γέφυρας. (α). (Lympn, 1971) Η σύνδεση του ATP στο σύμπλεγμα ακτίνης- μυοσίνης (1) (rigor) οδηγεί σε άμεσο διαχωρισμό της εγκάρσιας γέφυρας από την ακτίνη (2) (post rigor), χωρίς ακόμη να γίνει υδρόλυση του ATP. Στο στάδιο αυτό η εγκάρσια γέφυρα υπόκειται αλλαγή στη διαμόρφωσή της (recovery stroke) ώστε ο βραχίονάς της να βρεθεί στην κατάσταση pre-power-stroke δηλ τη φάση πριν τη σύνδεση με την ακτίνη και το σύρσιμο των νημάτων. Στο στάδιο αυτό (3) ενεργοποιείται η λειτουργία της ATPάσης και γίνεται υδρόλυση. Η σύνδεση της μυοσίνης με την ακτίνη (4) (δεν έχει προσδιοριστεί καλά η δομή στη φάση αυτή) οδηγεί στην απελευθέρωση των προϊόντων της υδρόλυσης (ADP,Pi) και στην κίνηση του βραχίονα της εγκάρσιας γέφυρας (b) UP→DOWN (Cooke, 1986).

4. Φάση χαλάρωσης.

Η χαλάρωση της μυϊκής ίνας συμβαίνει όταν το Ca^{++} αποσύρεται από το κυτταρόπλασμα. Όταν η ενδοκυττάρια συγκέντρωση ασβεστίου πέσει στα $0,1\mu\text{mol/L}$, η τροπονίνη επιστρέφει στην αρχική της συμβατική κατάσταση, αλλάζει η θέση της τροπομυοσίνη εμποδίζοντας τη σύνδεση ακτίνης και μυοσίνης και σταματά ο κύκλος των εγκάρσιων γεφυρών (Bullock et al., 2001).

Κάθε στροφική κίνηση μιας εγκάρσιας γέφυρας με το μηχανισμό που περιγράφηκε παραπάνω λοιπόν προκαλεί μικρή μετατόπιση της μυοσίνης πάνω στην ακτίνη. Για να επιτευχθεί μυϊκή συστολή μακροσκοπικά πρέπει να εκτελούν επαναλαμβανόμενα εκατοντάδες μέχρι χιλιάδες τέτοιες στροφικές κινήσεις. Συνεπώς πρέπει να γίνεται πάνω στην εγκάρσια γέφυρα ανακύκλωση ATP όπως αναφέρθηκε στον κύκλο της εγκάρσιας γέφυρας (Bullock et al., 2001). Στη μεταθανάτια κατάσταση, κατά την οποία δεν μπορεί να γίνει η αντικατάσταση του ATP, επέρχεται η μεταθανάτια ακαμψία.

2.6 Είδη μυϊκής συστολής

Το μηχανικό έργο που παράγεται από τους σκελετικούς μύες στην καθημερινή ζωή είναι αποτέλεσμα συνδυασμού τριών ειδών σύσπασης. Αυτές είναι η ισομετρική, η πλειομετρική και η μειομετρική

Κατά την **ισομετρική συστολή** το μήκος του μυός παραμένει σταθερό. Στη διάρκειά της δεν παράγεται κίνηση ή έργο, αλλά αναφερόμαστε σε μία στατική κατάσταση. Στην ισομετρική συστολή ενεργοποιείται ο κύκλος των εγκάρσιων γεφυρών, αλλά λόγω του μεγάλου φορτίου που ασκείται στο μυ είναι αδύνατον να υπάρξει μετατόπιση της ακτίνης σε σχέση με τη μυοσίνη. Παράδειγμα ισομετρικής συστολής είναι όταν κρατάμε ένα βάρος π.χ. ένα αντικείμενο και δεν το αφήνουμε να πέσει κάτω ή και όταν προσπαθούμε να σηκώσουμε από το έδαφος ένα ασήκωτο βάρος. Η παραγωγή ισομετρικής συστολής για τεχνικούς λόγους είναι η περισσότερο μελετημένη μορφή συστολής.

Η **πλειομετρική συστολή** είναι στοιχείο των καθημερινών μας κινήσεων. Τέτοιες για παράδειγμα είναι να αφήσουμε κάτω μία σακούλα ή να κατεβούμε τις σκάλες μιας πολυκατοικίας. Πλειομετρική συστολή συμβαίνει όταν ενεργοποιείται ο κύκλος των εγκάρσιων γεφυρών, ο μυς ωστόσο επιμηκύνεται αντενεργώντας σε μία εξωτερική επιβάρυνση. Στον τύπο αυτό της συστολής ο μυς λειτουργεί σαν φρένο.

Τέλος στην **μειομετρική συστολή** γίνεται ενεργοποίηση των εγκάρσιων γεφυρών και ο μυς βραχύνεται. Στην περίπτωση αυτή ο μυς υπερνικά την εξωτερική δύναμη που ασκείται πάνω του παράγοντας θετικό μηχανικό έργο.

Στην πραγματικότητα εκτός από κινήσεις που μπορεί να απαιτούν αμιγώς μειομετρική ή πλειομετρική συστολή ενός μυός, σε πολλές περιπτώσεις συνδυασμός αυτών των δύο μορφών συστολής είναι αναγκαίος. Αυτός είναι γνωστός ως πλειομειομετρικός τύπος συστολής. Κατά τη διάρκεια της βάρδιας για παράδειγμα ο γαστροκνήμιος διατείνεται και προενεργοποιείται (πλειομετρική φάση) δρώντας ως φρένο, για να βραχυνθεί και να δώσει ώθηση στη συνέχεια (μειομετρική φάση). Κατά την πρόσκρουση του κάτω άκρου στο έδαφος επίσης τα ελαστικά του στοιχεία διατείνονται αποθηκεύοντας μέρος της κινητικής ενέργειας, την οποία απελευθερώνουν κατά τη μειομετρική φάση καθιστώντας την πιο ισχυρή. Χαρακτηριστική κίνηση που κάνει κατανοητό το φαινόμενο αυτό είναι τα άλματα του καγκουρό (Whipp & Sargeant, 1999).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗ ΜΥΪΚΗ ΤΑΣΗ.

3.1. Λειτουργικές –μηχανικές ιδιότητες του σκελετικού μυός

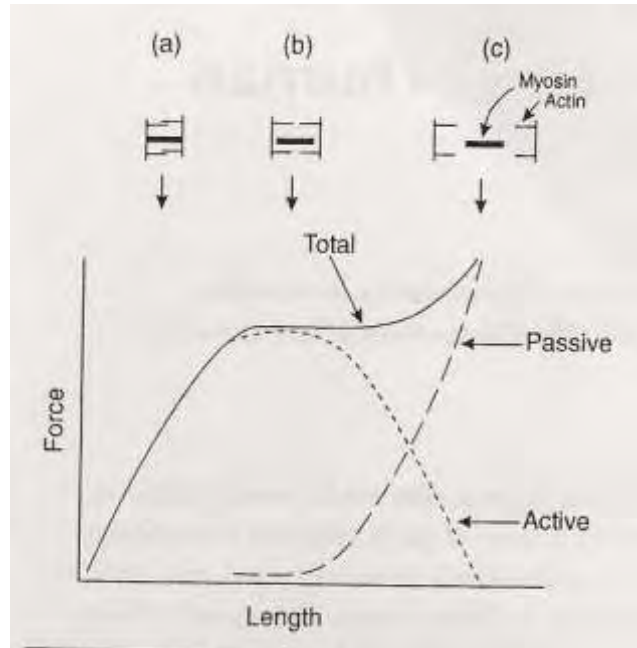
Εφόσον ο κύριος ρόλος του σκελετικού μυός είναι η κίνηση είναι λογικό να αποτιμάται η φυσιολογική του λειτουργία ή η δυσλειτουργία του μέσα από την αξιολόγηση της μηχανικής λειτουργίας του. Δηλαδή μέσα από την αξιολόγηση δυο βασικών μηχανικών μεγεθών, της δύναμης και της ταχύτητας

3.1.1 Μυϊκή δύναμη

Μυϊκή δύναμη είναι η τάση που αναπτύσσεται στα άκρα μίας μυϊκής ίνας, ενός μυ ή μιας ομάδας μυών. Η δύναμη εκφράζεται στο θεμελιώδη νόμο της μηχανικής από τον τύπο $F=m \cdot \gamma$, όπου F = δύναμη σε Newton, m =μάζα σε χιλιόγραμμα (kg) και γ =επιτάχυνση σε m/sec^2 . Η δύναμη που ασκείται στα άκρα ενός μυ σχετίζεται με κάποιες παραμέτρους, οι οποίες καταγράφηκαν ως σχέση μήκους-τάσης του μυός και δύναμης-ταχύτητας μυϊκής συστολής. Αυτοί οι συσχετισμοί ανάμεσα στο μήκος-τάση του μυός και στη δύναμη-ταχύτητα μυϊκής συστολής αποτελούν πρωταρχικές ιδιότητες των μυών.

-Σχέση μήκους-τάσης

Από τον 19^ο αιώνα ήταν ήδη γνωστό ότι η τάση ή δύναμη, που αναπτύσσεται στα άκρα ενός μυ σε μία ισομετρική συστολή εξαρτάται από το μήκος του. Η δύναμη αυτή θεωρείται ότι παράγεται από το σχηματισμό των εγκάρσιων γεφυρών στις περιοχές επικάλυψης ακτίνης και μυοσίνης μέσα σε κάθε σαρκομέριο μιας μυϊκής ίνας. Για κάθε μυ η τάση που αναπτύσσεται στα άκρα του είναι το άθροισμα των τάσεων όλων των μυϊκών ινών που συσπώνται. Έτσι όσο περισσότερες μυϊκές ίνες συσπώνται δηλ όσο περισσότερες κινητικές μονάδες διεγείρονται τόσο μεγαλύτερη είναι η τάση που καταγράφεται στα άκρα του μυός μακροσκοπικά. Όταν ο μυς διαταθεί πέραν του μήκους ηρεμίας αναπτύσσεται στα άκρα του μυός παθητική τάση. Η παθητική αυτή τάση οφείλεται στα ελαστικά στοιχεία του μυός που υπάρχουν τόσο στην περιφέρειά του όσο και εμπεριέχονται μέσα στο μυ. Για να υπολογιστεί η ενεργητική τάση στη σχέση μήκους τάσης πρέπει να αφαιρεθεί το παθητικό κομμάτι της δύναμης που οφείλεται στα ελαστικά στοιχεία. Η σχέση μήκους-τάσης του μυός οπτικοποιείται στην παρακάτω γραφική παράσταση. Από αυτή εξάγεται το συμπέρασμα ότι αν ο μυς διαταθεί πριν συσταλεί τότε η δύναμη που παράγει είναι μεγαλύτερη (Whipp & Sargeant, 1999).

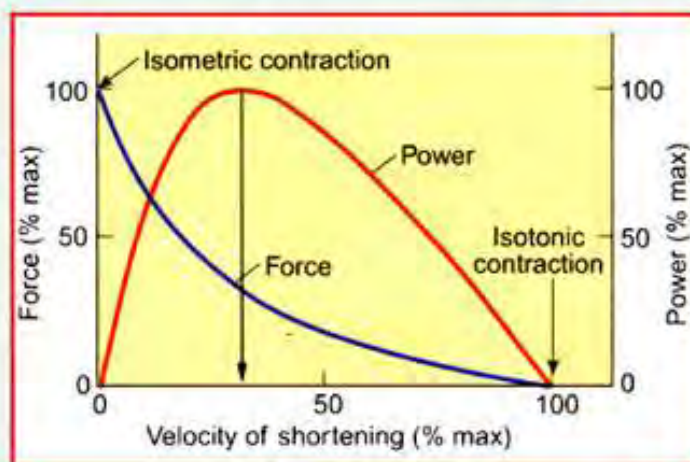


Εικόνα 25 . Σχέση μεταξύ μήκους του μυός και ενεργητικής (...) και παθητικής(---) ισομετρικής τάσης. Η ποσότητα της επικάλυψης μεταξύ ακτίνης και μυοσίνης που προσδιορίζει το ενεργό συστατικό υποδεικνύεται για (a) μικρό μήκος κατά το οποίο νημάτια ακτίνης από απέναντι άκρα του σαρκομερίου επικαλύπτονται και η παραγόμενη δύναμη ελαττώνεται (b) ιδανικό μήκος κατά το οποίο παράγεται η μεγαλύτερη ενεργητική δύναμη λόγω του σχηματισμού μέγιστου αριθμού εγκάρσιων γεφυρών και (c) μεγάλο μήκος κατά το οποίο δεν υπάρχει αλληλοεπικάλυψη και δεν σχηματίζονται εγκάρσιες γέφυρες (Whipp & Sargeant, 1999) p14

-Σχέση δύναμης-ταχύτητας (ταχοδυναμική σχέση)

Η παραγόμενη τάση στα άκρα των μυών ποικίλει τόσο ανάλογα με την επικάλυψη των νηματίων ακτίνης και μυοσίνης, όπως περιγράφηκε παραπάνω από την σχέση μήκους τάσης, όσο και από την ταχύτητα βράχυνσης και επιμήκυνσης της μυϊκής ίνας. Η ταχοδυναμική σχέση που διέπει την μυϊκή κίνηση διατυπώθηκε και θεμελιώθηκε κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1920-1930. Για πρώτη φορά μελετήθηκε από τους Fenn και March το 1935 (Fenn & Marsch, 1935). Η σχέση αυτή περιγράφει ότι όσο αυξάνεται η ταχύτητα της συστολής, η δύναμη που παράγεται από το μυ ελαττώνεται ακολουθώντας υπερβολική καμπύλη και φτάνει στο μηδέν όταν η ταχύτητα αγγίζει τη μέγιστη τιμή της V_{max} . Η ταχοδυναμική σχέση αντανακλά τη δομή των εγκάρσιων γεφυρών και την κινητική της σύζευξης και αποσύζευξης της ακτίνης και μυοσίνης. Το μαθηματικό διάγραμμα που αντικατοπτρίζει την ταχοδυναμική σχέση φαίνεται παρακάτω. Από αυτό προκύπτει ότι η μέγιστη δύναμη παράγεται από το μυ όταν η ταχύτητα συστολής είναι μηδενική (Whipp & Sargeant, 1999).

Force, velocity and muscle power



Εικόνα 26 . Η μέγιστη ισχύς παράγεται στη βέλτιστη ταχύτητα (V_{opt}), που είναι περίπου το 30% της μέγιστης ταχύτητας βράχυνσης (V_{max}) όταν η δύναμη είναι μηδέν (Whipp & Sargeant, 1999) p14

3.1.2 Μυϊκά δυναμόμετρα

Διακρίνουμε τα μηχανικά και ηλεκτρομηχανικά δυναμόμετρα. Τα μηχανικά δυναμόμετρα μετρούν τη μέγιστη ισομετρική συστολή μιας μυϊκής ομάδας. Η λειτουργία τους βασίζεται στην αρχή της συμπίεσης, όπου η εξωτερική δύναμη, συμπιέζει ένα μεταλλικό ελατήριο ενσωματωμένο στο όργανο, μετατοπίζοντας ένα μηχανικό δείκτη ανάλογα με την ασκούμενη πίεση. Τα ηλεκτρομηχανικά δυναμόμετρα έχουν τη δυνατότητα μέτρησης της δύναμης κατά την ισομετρική και μειομετρική συστολή του μυός. Βασίζονται στη σύγχρονη τεχνολογία των μικροεπεξεργαστών που ποσοτικοποιούν γρήγορα συνάψεις, ροπές, επιταχύνσεις, ταχύτητες διαφόρων μελών του σώματος σε διάφορες θέσεις. Το πιο διαδεδομένο ηλεκτροχημικό δυναμόμετρο είναι το ισοκινητικό δυναμόμετρο (Κλεισούρας, 2004).

Τα μυϊκά δυναμόμετρα έχουν εφαρμογή και σε επίπεδο μυϊκής ίνας καθώς μπορούν με κατάλληλη προσαρμογή μεγέθους να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα που γίνονται με απομονωμένες μυϊκές ίνες (Cooke, Franks, Luciani, & Pate, 1988; Karatzaferi, Chinn, & Cooke, 2004), όπως και η πειραματική διάταξη που θα χρησιμοποιηθεί για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας.

3.2 Επίδραση της θερμοκρασίας στις χημικές αντιδράσεις και στις λειτουργικές ιδιότητες του σκελετικού μυός.

Η επίδραση της θερμοκρασίας σε αντιδράσεις που γίνονται γενικά στη φύση ή σε ζωντανούς οργανισμούς είναι ένα από τα πιο εκτεταμένα πεδία έρευνας στη φυσιολογία. Είναι γνωστό ότι πολλές αντιδράσεις του ζωντανού κυττάρου, που διευκολύνονται από ένζυμα, εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Αυτό συμβαίνει κυρίως γιατί η ενεργότητα των ενζύμων αυτών εξαρτάται από αυτή (Prosser, 1973). Φυσικά υπάρχουν και εξαιρέσεις, όπου η θερμοκρασία δεν έχει επίδραση στο ρυθμό μιας αντίδρασης (Kotou et al., 2007). Ωστόσο στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η θερμοκρασία είναι ένας παράγοντας που επηρεάζει σημαντικά τις ενζυμικές βιολογικές αντιδράσεις. Το ερώτημα που έθεσε ο Bennett το 1984 στην ανασκόπησή του προκάλεσε στην ερευνητική κοινότητα το ερώτημα κατά πόσο μπορεί να γίνει αποδεκτός ο εξέχοντας ρόλος της θερμοκρασίας και στις αντιδράσεις που συμβαίνουν στο μυ, ώστε να επηρεάζει την παραγωγή δύναμης και τις ιδιότητές του μυός κατά τη μυϊκή συστολή (A. Bennett, 1984).

Οι ρυθμοί βιολογικών αντιδράσεων συνήθως ελαττώνονται ή αυξάνονται κατά 1/2 μέχρι και 2/3, όταν η θερμοκρασία του περιβάλλοντος στην οποία γίνονται μειωθεί ή αυξηθεί κατά 10°C αντίστοιχα (Dixon, Webb, & Thorne, 1979). Στη διεθνή βιβλιογραφία η επίδραση της θερμοκρασίας στις βιολογικές αντιδράσεις εκφράζεται αριθμητικά ως ένας συντελεστής, ο οποίος ονομάζεται Q_{10} και θα αναλυθεί παρακάτω.

Ωστόσο σε γενικές γραμμές και μετά από ένα ευρύ φάσμα καταγραφών από μελέτες για τις λειτουργικές ιδιότητες της μυϊκής ίνας σε σχέση με τη θερμοκρασία προκύπτουν κάποια συμπεράσματα για τις σχέσεις που τις διέπουν. Σύμφωνα με τον Bennett το 1984 οι δυνάμεις που παράγει ο μυς κατά τη σύσπαση τείνουν να είναι ανεξάρτητες από τη θερμοκρασία ή έχουν πολύ μικρή θετική συσχέτιση. Η δύναμη συστολής (twitch tension) μπορεί να αυξηθεί ή να μειωθεί με την αύξηση της θερμοκρασίας, αλλά συχνότερα περιορίζεται σε ένα Q_{10} μεταξύ 0,5-1,5. Η δύναμη σε τετανική σύσπαση έχει ήπια θετική συσχέτιση με τη θερμοκρασία με Q_{10} περίπου 1,5 σε χαμηλά επίπεδα θερμοκρασιών, ενώ σε υψηλές θερμοκρασίες δεν υπάρχει καμία εξάρτηση από αυτήν (A. Bennett, 1984).

Διαφοροποίηση σε σχέση με τις παραπάνω αναφορές παρατηρείται στις ιδιότητες σύσπασης της μυϊκής ίνας. Αναλυτικότερα ο χρόνος επίτευξης μέγιστης δύναμης, ο ρυθμός χαλάρωσης της μυϊκής ίνας, η μέγιστη ταχύτητα βράχυνσης και η μέγιστη ισχύς έχουν σημαντική θερμοκή εξάρτηση με Q_{10} 2-2,5. Οι επιταχυνόμενες επιδράσεις της θερμοκρασίας στις αναφερόμενες παραμέτρους σύσπασης και χαλάρωσης υπάρχουν και σε θερμοκρασίες που μπορεί να βλάψουν τη δομή του σαρκομερίου (A. Bennett, 1984).

Εν κατακλείδι ο σκελετικός μυς φαίνεται ότι μπορεί να παράξει λίγο ή πολύ την ίδια μέγιστη δύναμη ανεξάρτητα από την θερμοκρασία, όμως ο ρυθμός αύξησης αυτής της δύναμης, ο ρυθμός της παραγόμενης ισχύος και ο ρυθμός της χαλάρωσης μετά από σύσπαση εξαρτώνται σημαντικά από τη θερμοκρασία του μυός και επιταχύνονται σε αυξημένες θερμοκρασίες (Abbott & Wilkie, 1953; A. Bennett, 1984; Wilkie, 1950).

3.3 Μοντελοποίηση της επίδρασης της θερμοκρασίας

Για να αξιολογηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας έχουν προταθεί διάφορες υπολογιστικές μέθοδοι. Επειδή ως επί το πλείστον οι *in vitro* μελέτες

πραγματοποιούνται σε χαμηλή θερμοκρασία (όπου και το παρασκεύασμα είναι σταθερό) οι μέθοδοι αυτές επιτρέπουν στον ερευνητή να προβλέψει την συμπεριφορά του μυός (είτε αναφερόμαστε σε μηχανική συμπεριφορά είτε σε δραστηριότητα του ενζύμου myosin ATPase) σε υψηλότερη «πιο φυσιολογική» θερμοκρασία

3.3.1 Συντελεστής Q_{10}

Ο συντελεστής Q_{10} (temperature coefficient) αντιπροσωπεύει έναν παράγοντα, που δείχνει την αύξηση του ρυθμού (R) μιας αντίδρασης για άνοδο της θερμοκρασίας κατά 10°C (T). Όταν αναφερόμαστε στο ρυθμό μιας αντίδρασης αυτή μπορεί να αφορά οποιοδήποτε μέγεθος ή διαδικασία. Για παράδειγμα μπορεί να αφορά την ταχύτητα διάδοσης του δυναμικού δράσης κατά μήκος μιας νευρικής ίνας (m/s), το ρυθμό παραγωγής προϊόντων μιας χημικής αντίδρασης (mmol/sec) ή ακόμα και το ρυθμό με τον οποίο η καρδιά συσπάται ανά λεπτό (bpm). Σε ένα τυπικό πείραμα μετράται η τιμή ενός μεγέθους R σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές. Ας υποθέσουμε πως R1 και R2 αντιστοιχούν σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες T1 και T2 ($T_2 > T_1$). Η εξίσωση που υπολογίζει το Q_{10} είναι:

$$Q_{10} = \left(\frac{R_2}{R_1} \right)^{\left(\frac{10}{T_2 - T_1} \right)}$$

Η θερμοκρασία μετράται σε βαθμούς Κελσίου ή βαθμούς Κέλβιν, όχι όμως και σε βαθμούς Φαρενάιτ. Ο συντελεστής Q_{10} είναι ακέραιος αριθμός και δεν έχει μονάδες. Εάν ο ρυθμός μιας αντίδρασης δεν επηρεάζεται καθόλου από τη θερμοκρασία τότε το Q_{10} για την αντίδραση αυτή ισούται με 1. Εάν ο ρυθμός μιας αντίδρασης επηρεάζεται θετικά από τη θερμοκρασία δηλαδή αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας τότε το Q_{10} είναι μεγαλύτερο από 1. Όσο περισσότερο θερμοεξαρτώμενη είναι μία αντίδραση τόσο μεγαλύτερο του 1 θα είναι το Q_{10} που θα προκύψει από αυτήν. Στις τυπικές χημικές αντιδράσεις που συμβαίνουν συνήθως το Q_{10} ισούται περίπου με 2. Το Q_{10} , αν και αποτελεί έναν εύκολο τρόπο εκτίμησης της επίδρασης της θερμοκρασίας σε μία βιολογική διαδικασία, έχει δεχθεί κριτική ως προς την ακρίβεια των αποτελεσμάτων που εξάγονται από αυτό. Εξάλλου συστήνεται ακόμη και με τη χρήση του Q_{10} να γίνονται δοκιμές όχι μόνο για ένα ζεύγος θερμοκρασιών, αλλά για πολλά ζεύγη (5 ή περισσότερα), ώστε να επιτυγχάνεται μεγαλύτερη ακρίβεια στα συμπεράσματα (A. Bennett, 1984; Kotov et al., 2007).

3.3.2 Εξίσωση Arrhenius

Ο Svante August Arrhenius το 1889 βασιζόμενος σε προηγούμενες εργασίες του J H van't Hoff κατέληξε σε μία εξίσωση, η οποία περιέγραφε τους κανόνες οι οποίοι διέπουν μία χημική αντίδραση σε σχέση με τη θερμοκρασία και την αρχική ενέργεια αντίδρασης E_a .

Είναι γνωστό ότι μία χημική αντίδραση περιγράφεται από την αντίδραση

$$\rho = k [A]^x [B]^y$$

όπου ρ είναι ο ρυθμός της αντίδρασης, $[A]$ και $[B]$ είναι οι συγκεντρώσεις των προϊόντων της αντίδρασης, k είναι η σταθερά της αντίδρασης και x και y είναι η τάξη της αντίδρασης σε σχέση με τα προϊόντα A και B αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις των προϊόντων A και B δεν επηρεάζονται σημαντικά από τη θερμοκρασία. Αντίθετα αυτό που επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία είναι η σταθερά της αντίδρασης k . Η σχέση της θερμοεξάρτησης της σταθεράς k μιας αντίδρασης φαίνεται στην παρακάτω εξίσωση

$$k = A_c * \exp\left(\frac{-E_a}{R*T}\right)$$

Arrhenius equation

όπου k είναι η σταθερά της αντίδρασης, A_c είναι μία σταθερά, E_a είναι η ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης, R είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων και T είναι η θερμοκρασία σε Kelvin

(“<http://www.shodor.org/unchem/advanced/kin/arrhenius.html>,” n.d.)

Αν εφαρμόσουμε την εξίσωση Arrhenius σε μία συγκεκριμένη αντίδραση σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες T_1 και T_2 τότε καταλήγουμε σύμφωνα με τον Beavon με μαθηματικούς υπολογισμούς στην παρακάτω εξίσωση.

$$\ln(k_2/k_1) = (E_a/R) (1/T_1 - 1/T_2)$$

Όπου k_1 και k_2 είναι οι σταθερές μιας χημικής αντίδρασης σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες T_1 και T_2 αντίστοιχα, E_a είναι η ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης σε $J mol^{-1}$ και R είναι η σταθερά των αερίων. Ο συντελεστής Q_{10} αναφέρεται στο λόγο k_2/k_1 και ως εκ τούτου δεν μπορεί να είναι σταθερό για μία χημική αντίδραση αλλά μεταβάλλεται για την ίδια αντίδραση ανάλογα με τη θερμοκρασία. Με αφορμή τον παραπάνω συλλογισμό οι επικριτές του Q_{10} θεωρούν ότι ο συντελεστής αυτός είναι αναξιόπιστος και ότι η ενέργεια ενεργοποίησης μιας αντίδρασης E_a μπορεί πολύ καλύτερα να προβλέψει και να καθορίσει το ρυθμό μιας αντίδρασης (“<http://home.clara.net/rod.beavon/Q10.htm>,” n.d.). Επίσης το 2001 ο James F. Gillooly και οι συνεργάτες του αναφέρθηκαν στο Q_{10} ως ένα τρόπο έκφρασης της επίδρασης της θερμοκρασίας -για ένα περιορισμένο εύρος θερμοκρασιών- σε μία βιολογική διαδικασία. Στη μελέτη αυτή παραθέτονται επιχειρήματα υπέρ της χρήσης της Παγκόσμιας Σταθεράς Θερμοκρασίας (universal temperature dependence) για την πρόβλεψη επίδρασης της θερμοκρασίας στο μεταβολικό ρυθμό διάφορων οργανισμών σε σχέση με το Q_{10} . Οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι οι βιολογικές διαδικασίες δεν εξαρτώνται πάντα εκθετικά από τη θερμοκρασία και ότι με τη χρήση του Q_{10} δημιουργούνται λάθη στους υπολογισμούς που αγγίζουν το 15% (Gillooly, Brown, West, Savage, & Charnov, 2001).

3.3.3 Εξίσωση Van't Hoff

Η εξίσωση Van't Hoff μας δίνει πληροφορίες για την εξάρτηση της σταθεράς ισορροπίας μιας αντίδρασης από τη θερμοκρασία. Η εξίσωση Van't Hoff μπορεί να προκύψει από την εξίσωση Gibbs-Helmholtz η οποία είναι η εξής

$$\left(\frac{\partial \left(\frac{\Delta G^\circ}{T} \right)}{\partial \left(\frac{1}{T} \right)} \right)_P = -\Delta H^\circ$$

Gibbs-Helmholtz equation

όπου ΔG° είναι η ελεύθερη ενέργεια του Gibbs, T είναι η θερμοκρασία της αντίδρασης και ΔH° είναι η μεταβολή της ενθαλπίας. Αν στον παραπάνω τύπο αντικαταστήσουμε το ΔG° με $\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq}$, όπου R είναι η σταθερά των αερίων και K_{eq} είναι η σταθερά της αντίδρασης τότε προκύπτει η εξίσωση Van't Hoff (Standard, n.d.)

$$\left(\frac{\partial \ln K_{eq}}{\partial \left(\frac{1}{T} \right)} \right)_P = -\frac{\Delta H^\circ}{R}$$

Van't Hoff equation

3.4 Πρότυπα μελέτης επίδρασης θερμοκρασίας στη συστολή του σκελετικού μυός.

Οι πρώτες αναφορές για την επίδραση της θερμοκρασίας στη λειτουργία του μυός υπάρχουν σε μελέτες των Marey (Marey, 1868) και Schmulewitsch (Schmulewitsch, 1868) το 1868. Έκτοτε πάρα πολλοί συγγραφείς προσπάθησαν να μελετήσουν την αρχική αυτή θεώρηση αναλυτικότερα και σε πιο συγκεκριμένα μεγέθη χρησιμοποιώντας ως «συνεργάτη» τους σκελετικούς μύες ανθρώπων ή πειραματόζωων με *in vivo* πειράματα είτε απομονωμένες σκελετικές ίνες με ειδικές πειραματικές διατάξεις *in vitro*. Μερικά παραδείγματα μελετών διάφορων παραμέτρων της συστολής της μυϊκής ίνας περιγράφονται παρακάτω.

Το 1999 ο De Ruiter και οι συνεργάτες του μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη δύναμης αλλά και στο ρυθμό μεταβολής αυτής της δύναμης κατά την ισομετρική συστολή και χάλαση στις μυϊκές ίνες του προσαγωγού μυός του αντίχειρα του ανθρώπου (De Ruiter, Jones, Sargeant, & De Haan, 1999). Στη

μελέτη αυτή οι εθελοντές δεν υποβλήθηκαν σε κάποια παρεμβατική διαδικασία αλλά μόνο σε άσκηση του συγκεκριμένου μυός και έγιναν μετρήσεις. Όσον αφορά τη μέγιστη ισομετρική δύναμη οι ερευνητές αναφέρουν ότι αυτή δεν μεταβάλλεται στο εύρος θερμοκρασίας από 25-37 °C, ενώ κάτω από τους 22 °C αυτή ελαττώνεται. Επίσης ο μέγιστος ρυθμός παραγωγής τάσης ελαττώνεται με την ελάττωση της θερμοκρασίας και το ίδιο παρατηρήθηκε με την ταχύτητα χάλασης. Τέλος παρατήρησαν μικρή επίδραση της κόπωσης σε χαμηλές θερμοκρασίες για όλες τις παραμέτρους που μελέτησαν, κυρίως όμως στην ταχύτητα χάλασης.

Το 2005 ο Stuart R Gray και οι συνεργάτες του μελέτησαν το μεταβολικό κύκλο του ATP και την ταχύτητα σύσπασης της μυϊκής ίνας σε σχέση με την επίδραση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια μέγιστης παραγωγής έργου σε οκτώ υγιείς άρρενες ανθρώπους. Τα αποτελέσματα, που συνέλλεξαν βασίστηκαν σε βιοψίες των τετρακέφαλων μυών που υποβλήθηκαν σε άσκηση. Στη μελέτη αυτή επίσης γίνεται υπολογισμός του Q_{10} διάφορων αντιδράσεων σε σχέση με τις συγκεντρώσεις μεταβολιτών για να αποδειχθεί η εξάρτησή τους από τη θερμοκρασία. Τα συμπεράσματά τους ήταν ότι αν ο μυς του αθλητή, που συμμετείχε στο πείραμα, αυξήσει παθητικά τη θερμοκρασία του πριν υποβληθεί σε άσκηση, τότε αυξάνεται ο ρυθμός του μεταβολικού κύκλου του ATP καθώς και η ταχύτητα αγωγής της μυϊκής ίνας. Επίσης το μέγεθος της αύξησης της παραγωγής δύναμης σχετίστηκε με την περιεκτικότητα του μυός στην ισομορφή ΙΙΑ της βαριάς αλύσου της μυοσίνης (Gray, De Vito, Nimmo, Farina, & Ferguson, 2006).

Άλλοι ερευνητές χρησιμοποίησαν στις μελέτες τους μύες που απομόνωναν από πειραματόζωα κυρίως μικρά θηλαστικά ή τρωκτικά. Για παράδειγμα ο Ranatunga το 1982 μελέτησε την εξάρτηση της ταχύτητας βράχυνσης μυϊκών ινών και της τάσης ισομετρικής συστολής σε υποκνημίδιο και στον μακρύ εκτείνοντα των δακτύλων του ποδιού (e.d.l.) μυ αρουραίου. Τα συμπεράσματά του ήταν τρία. Πρώτον τα διαγράμματα Arrhenius ήταν γραμμικά στο εύρος θερμοκρασιών που έγιναν τα πειράματα. Δεύτερον η μέγιστη ταχύτητα συστολής επηρεάστηκε ελάχιστα από τη θερμοκρασία, ενώ η μεταβολή της θερμοκρασίας είχε τη μέγιστη επίδραση στο χρόνο υποδιπλασιασμού της μέγιστης τάσης. Τρίτον τα αποτελέσματα τόσο για τον υποκνημίδιο (βραδύς) όσο και για τον e.d.l. (ταχύς) ήταν παρόμοια (K. Ranatunga, 1982). Οι Wang και Kawai το 2000 μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας στα αρχικά στάδια του κύκλου της εγκάρσιας γέφυρας σε αργές μυϊκές ίνες υποκνημίδιου μυός κόνικλου. Κατέληξαν ότι το στάδιο της σύνδεσης του νουκλεοτιδίου ATP στον κύκλο της εγκάρσιας γέφυρας είναι περισσότερο ευαίσθητο στη θερμοκρασία από ότι το στάδιο σύνδεσης του Pi (Wang & Kawai, 2001). Και στις δύο αυτές περιπτώσεις πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δυναμόμετρα και μετρήθηκαν παράμετροι και μεγέθη της μυϊκής συστολής σε σταθερές αλλά διαφορετικές κάθε φορά θερμοκρασίες.

Αργότερα το 1998 ο Ranatunga επέκτεινε τη μελέτη του στην αναζήτηση της σχέσης που διέπει την παραγωγή ισχύος και της θερμοκρασίας σε μακρύ εκτείνοντα των δακτύλων και πελματιαίο μυ αρουραίου. Στη μελέτη αυτή απομόνωσε μυϊκές δεσμίδες από τον κάθε μυ και έκανε μετρήσεις με τις οποίες έδειξε ότι η ελάττωση της θερμοκρασίας ελάττωσε τόσο την παραγόμενη τάση όσο και την μυϊκή ισχύ ιδιαίτερα όταν η θερμοκρασίες γίνονταν χαμηλότερες από 20 °C (K. Ranatunga, 1998).

Από το 1987 και έπειτα χρησιμοποιήθηκε από τους Goldman et al (Goldman, Mc Cray, & Ranatunga, 1987) και από τους Davis και Harrington (Davis & Harrington, 1987) μία νέα για την εποχή εκείνη πειραματική διάταξη που χρησιμοποιούσε την τεχνική T-jump ή αλλιώς την τεχνική των αλμάτων θερμοκρασίας. Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται απομονωμένες μυϊκές ίνες, οι οποίες μεταφέρονται για πολύ μικρό χρονικό διάστημα σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών π.χ από τους 5 °C όπου διατηρούνται αρχικά με συστήματα Peltier στους 25°C. Έτσι μελετώνται οι διαφορές

ιδιότητες της μυϊκής ίνας σε σχέση με τη θερμοκρασία χωρίς να προκαλείται βλάβη σε αυτήν λόγω της μικρής διάρκειας παραμονής της στις συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας. Το ίδιο μπορεί να γίνει αν στα διάφορα στάδια μεταφοράς της ίνας μεταβάλλουμε τη σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται. Έκτοτε πολλοί ερευνητές χρησιμοποιούν την τεχνική αυτή για τη μελέτη των ιδιοτήτων των μυών χρησιμοποιώντας απομονωμένες μυϊκές ίνες. Στην πληθώρα των ανακοινώσεων της βιβλιογραφίας, που βασίστηκαν στην τεχνική T-jump, υπάρχουν πολλές παραλλαγές των παραμέτρων των πειραμάτων με σκοπό τη μελέτη της κινητικής της συστολής της μυϊκής ίνας. Για παράδειγμα μελετάται άλλοτε η επίδραση της θερμοκρασίας ή η επίδραση ουσιών ανάλογα με τη σύσταση των διαλυμάτων και άλλες παράμετροι. Τέλος μπορούν να αξιολογηθούν διάφορες ιδιότητες της ίνας όπως η τάση που αναπτύσσει ισομετρική ή ισοτονική, η ταχύτητα συστολής, η παραγόμενη ισχύς κ.α. Για παράδειγμα το 2008 η Karatzaferi και συνεργάτες (Karatzaferi et al., 2008) έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση της ρυθμιστικής ελαφράς αλύσου της μυοσίνης (RLC) μπορεί να επηρεάσει τη μηχανική της μυϊκής συστολής με το να ελαττώνει την ταχύτητά της, επίδραση όμως που γινόταν φανερή μόνο σε υψηλή θερμοκρασία, γι' αυτό προηγούμενοι ερευνητές δεν το είχαν διαπιστώσει και επιπλέον έδειξε μια συνεργική δράση τριών παραγόντων της κόπωσης, χαμηλού pH, φωσφορυλίωσης και υψηλών επιπέδων Pi (μείωση της ταχύτητας συστολής κατά 40% σε σύγκριση με τις μη φωσφορυλιωμένες ίνες σε συνθήκες ηρεμίας), η οποία γινόταν εμφανής μόνο όταν οι μετρήσεις διεξάγονταν στην υψηλή θερμοκρασία των 30°C. Το 2004 οι Karatzaferi, Chinn και Cooke (Karatzaferi et al., 2004) έδειξαν ότι η δύναμη που παράγει κάθε εγκάρσια γέφυρα κατά τη συστολή της είναι ανάλογη της ισχύος του δεσμού της ακτομυοσίνης. Τέλος το 1999 ο Ranatunga με την ίδια τεχνική μελέτησε την επίδραση του Pi στην παραγωγή δύναμης από τις μυϊκές ίνες, καταλήγοντας ότι η προσθήκη Pi ελαττώνει την παραγόμενη δύναμη μελετώντας αναλυτικά κάθε φάση του κύκλου της εγκάρσιας γέφυρας (K. W. Ranatunga, 1999a).

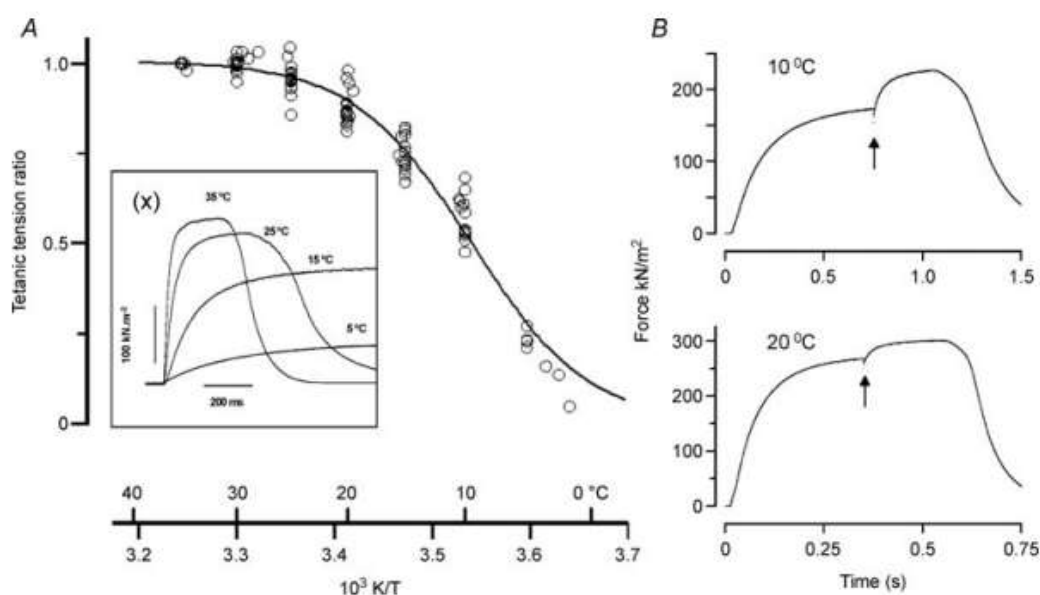
Άλλοι ερευνητές όπως το 2003 οι Coupland και Ranatunga αντί για απομεμβρανωμένες μυϊκές ίνες χρησιμοποίησαν μυϊκές δεσμίδες από τους μύες που έλαβαν από τα πειραματόζωα για να μελετήσουν την επίδραση της θερμοκρασίας στην παραγωγή τάσης με συμπεράσματα παραπλήσια με αυτά των απομεμβρανωμένων μυϊκών ινών. Ωστόσο οι συγγραφείς αναφέρουν μειονεκτήματα σε αυτή την τεχνική λόγω του ότι δεν μπορεί να καθοριστεί η ακριβής σύσταση των μυϊκών δεσμίδων, οι οποίες μπορεί να έχουν διαφοροποίηση ως προς την αναλογία των συστατικών τους και λόγω της μη μέτρησης του σαρκομερίου κατά την τέλεση του πειράματος (Coupland & Ranatunga, 2003a).

3.5 Η επίδραση της θερμοκρασίας στη μυϊκή συστολή

Υπάρχουν πολυάριθμα άρθρα που μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας στην ισομετρική μυϊκή συστολή και όχι μόνο, καθώς επίσης και τις επιμέρους μεταβολές της τάσης της μυϊκής ίνας. Σε κάποια από αυτά γίνεται κατανοητή η σπουδαιότητα της αποκρυπτογράφησης αυτού του "μυστικού κωδικού" που ερμηνεύει την επίδραση της θερμοκρασίας στη μυϊκή συστολή.

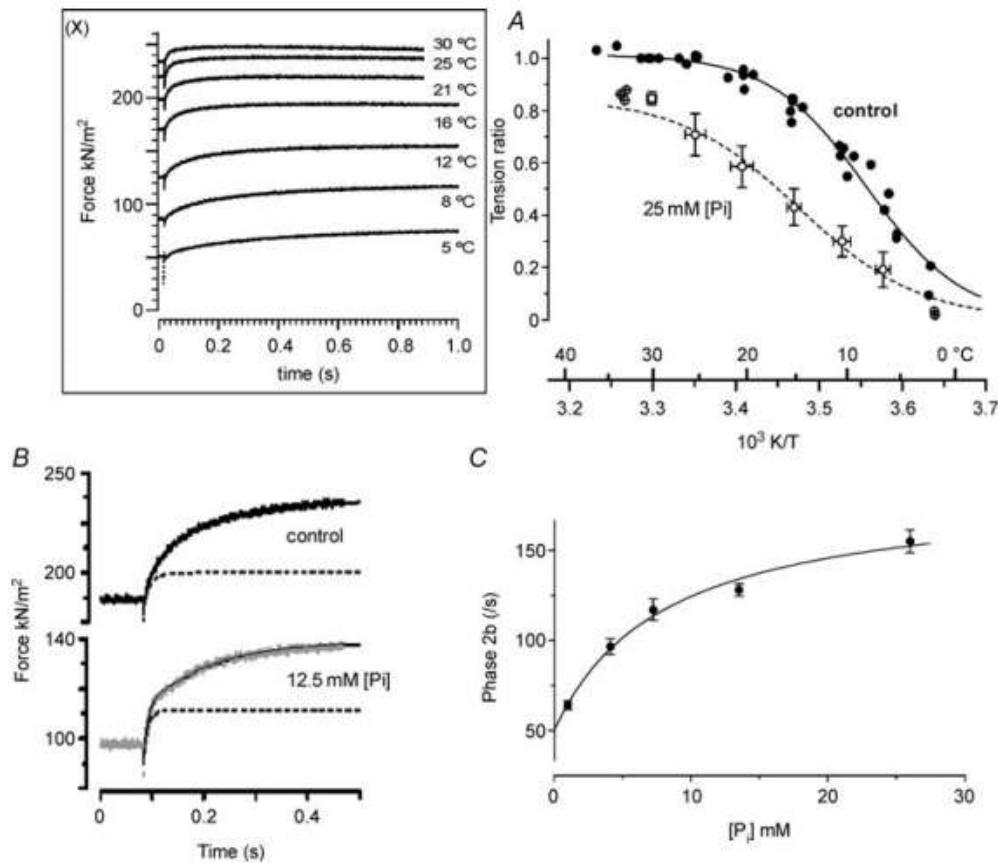
Από τα βασικά συμπεράσματα της μέχρι τώρα έρευνας για τη μυϊκή συστολή είναι ότι η παραγωγή μυϊκής δύναμης είναι ενδόθερμη αντίδραση (Coupland & Ranatunga, 2003b). Το ένθετο (X) της εικόνας 27 δείχνει τις ισομετρικές τετανικές συσπάσεις μιας ακέρατης μυϊκής δεσμίδας. Φαίνεται ότι η ενεργητική δύναμη-τάση αυξάνεται με την

αύξηση της θερμοκρασίας. Στο διάγραμμα A φαίνονται κανονικοποιημένα τα αποτελέσματα τετανικής τάσης από διάφορα πειράματα, τα οποία πραγματοποιήθηκαν σε ένα εύρος θερμοκρασιών. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η σχέση ανάμεσα στην δύναμη και τη θερμοκρασία είναι περίπου σιγμοειδής με καταγραφή του ημίσεως της μέγιστης τάσης στους 10 °C. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώθηκαν σε αρκετές μελέτες (K. W. Ranatunga, 1994, 1996, 2010). Στο διάγραμμα B φαίνεται η μεταβολή της δύναμης, που πραγματοποιείται μετά από άλμα θερμοκρασίας (T-jump), που γίνεται στο plateau της τετανικής σύσπασης. Ένα άλμα θερμοκρασίας προκαλεί μία διφασική αύξηση της θερμοκρασίας οδηγώντας σε μία νέα σταθερή κατάσταση (στους 10 °C και στους 20 °C) Η αρχική αύξηση της τάσης είναι γρηγορότερη, αλλά το εύρος είναι μικρότερο στην υψηλή θερμοκρασία (K. W. Ranatunga, 2010).



Εικόνα 27. Επίδραση της θερμοκρασίας στην μέγιστη ενεργητική τάση ανέπαφων μυϊκών ινών. Ένθετο (X)- Πειραματικές καταγραφές τετανικών συσπάσεων από παρασκευάσματα μυϊκών δεσμίδων σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες. Παρατηρείται σημαντική αύξηση της δύναμης σε μία σταθερή τιμή (plateau) στις υψηλότερες θερμοκρασίες. **A.** Δεδομένα από τετανικές συσπάσεις 96 παρασκευασμάτων που αξιολογήθηκαν σε υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες. Η τάση κάθε ίνας κανονικοποιήθηκε σε σχέση με αυτή των 35 °C. Η οριζόντια τετμημένη είναι η απόλυτη θερμοκρασία που αποδίδεται και σε °C. Τα αποτελέσματα της μυϊκής τάσης που προέκυψαν προσαρμόστηκαν σε σιγμοειδή καμπύλη (Coupland, Puchert, & Ranatunga, 2001) $P = P_{max} - P_{max}/[1 + \exp\{-(\Delta H/R)(1/T - 1/T_{0.5})\}]$, όπου P_{max} είναι η μέγιστη δύναμη, R είναι $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, T είναι η απόλυτη θερμοκρασία και $T_{0.5}$ είναι η θερμοκρασία που ανταποκρίνεται στο μισό της P_{max} (θεωρείται ότι η ΔG -μεταβολή ελεύθερης ενέργειας- είναι ελάχιστη). **B.** Εδώ φαίνεται το ίχνος της τάσης μιας δεσμίδας στην οποία γίνεται άλμα θερμοκρασίας 4 °C (βέλος) κατά τη διάρκεια του plateau της τετανικής τάσης (10°C πάνω, 20°C κάτω). Παρατηρείται ότι μετά από ένα άλμα θερμοκρασίας, η τάση σταθεροποιείται σε ένα νέο υψηλότερο επίπεδο. Ο ρυθμός της αύξησης είναι μικρότερος, αλλά το εύρος της μικρότερο στους 10°C από ότι στους 20°C, όπως αναμενόταν από τα δεδομένα της καμπύλης στο διάγραμμα A (Coupland & Ranatunga, 2003a)

Από διαφορετικά πειραματικά πρωτόκολλα προέκυψαν συμπληρωματικά δεδομένα σε σχέση με τα προηγούμενα όπως για παράδειγμα από απομεμβρανωμένες μυϊκές ίνες. Στο ένθετο (X) της εικόνας 28 φαίνεται η τάση των απομεμβρανωμένων μυϊκών ινών μετά από άλματα σε διάφορες θερμοκρασίες (T-jump). Τα χαρακτηριστικά των πειραμάτων αυτών όπως προκύπτουν και στο διάγραμμα είναι παραπλήσια με αυτά των ανέπαφων μυϊκών ινών στο διάγραμμα 27B. Στο διάγραμμα A της εικόνας 28 φαίνεται ότι η σχέση θερμοκρασίας και μέγιστης ενεργούς τάσης ακολουθεί σιγμοειδή καμπύλη (μέγιστη ενεργοποίηση με Ca^{++}). Η σιγμοειδής καμπύλη στα διαγράμματα 27A και 28A προέρχεται από την εξίσωση van't Hoff (περιγράφεται στο τμήμα 3.5). Πράγματι όταν οι τάσεις εξεταστούν μέσα από την εξίσωση αυτή τότε η διάταξη των δεδομένων γίνεται γραμμική (Roots & Ranatunga, 2008).



Εικόνα 28. Η μέγιστη ενεργητική δύναμη είναι ευαίσθητη στο ανόργανο Pi σε πειράματα με αποεμβρανωμένες μυϊκές ίνες. Ένθετο (X), οι ίνες υποβλήθηκαν σε μέγιστη ενεργοποίηση με Ca⁺⁺ στους 2 °C (δεν απεικονίζεται) και έπειτα έγιναν άλματα θερμοκρασίας κατά 3-4 °C υψηλότερη με χρονικά διαλείμματα 5sec, ενώ τα συστήματα Peltier ρυθμίστηκαν να έχουν θερμοκρασία 30 °C. Με αύξηση της θερμοκρασίας η σταθερή δύναμη που πετυχαίνει η ίνα αυξάνεται, ο ρυθμός επίτευξης της δύναμης γίνεται γρηγορότερος, αλλά το εύρος μικρότερο, όπως στις ανέπαφες ίνες. **A.** Συλλέχθηκαν δεδομένα από τη σύσπαση 5 μυϊκών ινών σε ένα εύρος θερμοκρασιών χωρίς και με την προσθήκη 25mM Pi. Η τάση κανονικοποιήθηκε σε σχέση με τις ίνες ελέγχου (χωρίς προσθήκη Pi) στους 30 °C και τα αποτελέσματα φαίνονται στο διάγραμμα A. Η σιγμοειδής καμπύλη που προκύπτει στις ίνες ελέγχου ανταποκρίνεται σε $\Delta H^{\circ} \sim 140 \text{ kJ mol}^{-1}$ και $T_{0.5} \sim 8 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Με την προσθήκη Pi η καμπύλη μετακινείται σε χαμηλότερη δύναμη και υψηλότερη θερμοκρασία, ενώ $\Delta H^{\circ} \sim 120 \text{ kJ mol}^{-1}$. Παρατηρείται επίσης ότι η σχετική ελάττωση της τάσης με την προσθήκη Pi είναι μικρότερη στις υψηλές θερμοκρασίες (Coupland et al., 2001). **B.** Μεταβολές της δύναμης που προκαλούνται από άλματα θερμοκρασίας ~ 3 °C σε ίνες που έχουν ενεργοποιηθεί στους 9 °C. Το πάνω διάγραμμα είναι αυτό του ελέγχου (control) χωρίς προσθήκη Pi, ενώ το δεύτερο είναι με προσθήκη Pi 12,5 mM. Προκύπτουν όπως φαίνεται στο σχήμα 2 εκθετικές καμπύλες για να ξεχωρίσουν την ταχεία φάση (διακεκομμένη καμπύλη) από την πιο αργή φάση της συστολής. Με την προσθήκη Pi η ταχεία φάση της συστολής γίνεται γρηγορότερη. **C.** Εξάρτηση της ταχείας φάσης συστολής από τη συγκέντρωση του Pi (K. W. Ranatunga, 1999b)

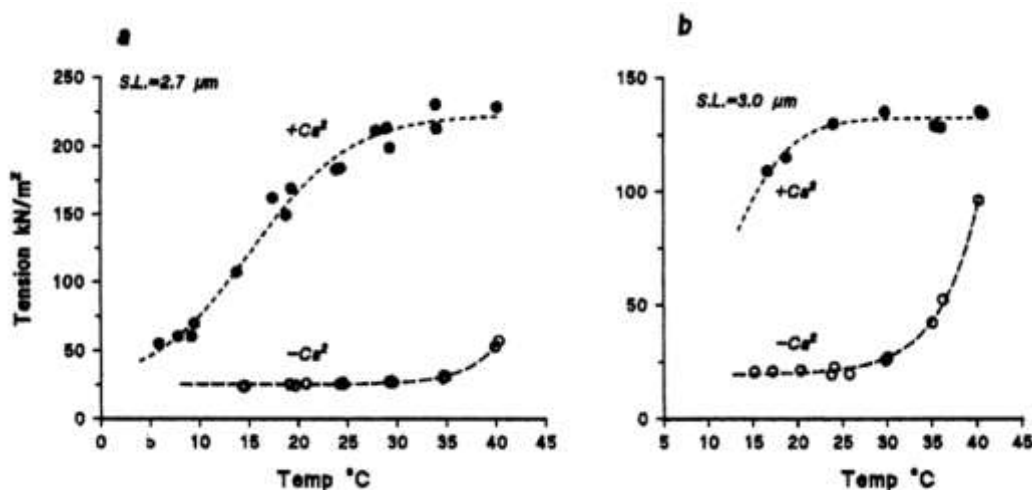
Η σιγμοειδής καμπύλη συσχέτισης της δύναμης με τη θερμοκρασία σε πειράματα με άλματα θερμοκρασίας καταγράφηκε και σε τύπους μυϊκών ινών εκτός από τις ταχείες όπως οι αργές και οι καρδιακές.

Επίσης ένα ερώτημα που είχε ανακύψει μετά από αυτές τις μελέτες ήταν το αν η αύξηση της τάσης μετά από επίδραση της θερμοκρασίας είναι αποτέλεσμα της αύξησης της δύναμης σε κάθε cross-bridge ή αν αυξάνεται ο αριθμός των cross-bridge που

συμμετέχουν στη διαδικασία της κίνησης; Υπάρχουν εργασίες που υποστηρίζουν και τις δύο απόψεις και που διαφοροποιούνται κυρίως ανάλογα με τον τύπο των πειραμάτων που χρησιμοποιούν.

Τα περισσότερα δεδομένα από τη βιβλιογραφία υποδεικνύουν ότι η αύξηση της δύναμης, που προέρχεται από το μυ με την αύξηση της θερμοκρασίας, είναι αποτέλεσμα της αύξησης της μέσης δύναμης ανά cross-bridge και όχι της αύξησης του αριθμού των cross-bridge, που συμμετέχουν στη διαδικασία της παραγωγής δύναμης (Colombini, Nocella, Benelli, Cecchi, & Bagni, 2008). Έχει επίσης αναφερθεί ότι η αύξηση της ισομετρικής τάσης ανά cross-bridge με την αύξηση της θερμοκρασίας γίνεται σε βάρος της έκτασης του power stroke, γεγονός που υποδεικνύει κοινό μηχανισμό παραγωγής τάσης μετά από ηλεκτρικό ερέθισμα (Piazzesi et al., 2003). Μερικές αναφορές που έγιναν με απομembraνωμένες μυϊκές ίνες (Kawai, 2003) και σε μοριακό επίπεδο (Kawai, Kido, Vogel, Fink, & Ishiwata, 2006) ωστόσο προτείνουν ότι η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει τον αριθμό των εγκάρσιων γεφυρών, που συμμετέχουν στην παραγωγή της δύναμης και όχι η μέση δύναμη ανά cross-bridge.

Τέλος μελέτες σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί φαίνεται πόσο σημαντική είναι η ακριβής σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται, δημιουργώντας διαφορετικές κάθε φορά συνθήκες για την ίνα. Αυτό μπορεί να τροποποιήσει το πρότυπο επίδρασης της θερμοκρασίας στην ίνα. Για παράδειγμα το 1994 ο Ranatunga (K. W. Ranatunga, 1994) σε μελέτη του κάνει μετρήσεις σε απομembraνωμένες μυϊκές ίνες για να μελετήσει την επίδραση της θερμοκρασίας στην ισομετρική τάση αυτών με και χωρίς την επίδραση Ca^{++} . Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 29. Βλέπουμε ότι οι καμπύλες που προκύπτουν είναι διαφορετικές στη μία και την άλλη περίπτωση. Όταν υπάρχει ενεργοποίηση της ίνας με Ca^{++} τότε η καμπύλη της τάσης-θερμοκρασίας όπως έχουμε αναφέρει και στο κεφάλαιο 3 είναι σιγμοειδής. Αντίθετα χωρίς την επίδραση Ca^{++} φαίνεται ότι η τάση είναι ανάλογη της θερμοκρασίας μέχρι τους 30°C περίπου, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες η επίδραση της θερμοκρασίας είναι πολύ μεγαλύτερη.



Εικόνα 29. Σχέση τάσης θερμοκρασίας από δύο μυϊκές ίνες (a και b) με παρουσία μέγιστης συγκέντρωσης Ca^{++} (pCa ~4; ●) (επάνω καμπύλη) και χωρίς επίδραση Ca^{++} (pCa ~8; ○) (κάτω καμπύλη). Παρατηρήστε ότι στην ίνα με μεγαλύτερο μήκος sarκομερίου (δεξιά), η τάση που παράγεται μόνο με την επίδραση της θερμοκρασίας στους 40°C αγγίζει την τάση που προκύπτει σε συνθήκες επίδρασης Ca^{++} .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

4.1 Προετοιμασία μυϊκών ινών

Ακολουθώντας τους διεθνείς κανόνες ευθανασίας θυσιάστηκαν ενήλικοι θηλυκοί λευκοί κόνικλοι Νέας Ζηλανδίας, 1.5-2.5kg υπό αναισθησία (N=3) και απομονώθηκε ψοίτης σκελετικός μυς. Ο ψοίτης μυς επιλέχθηκε λόγω της ομοιογένειας της σύστασής του (ίνες τύπου ΙΙx) και της καθαρότητάς του από συνδετικό ιστό. Η παραπάνω διαδικασία έλαβε χώρα στη Μονάδα Πειραματόζωων του Τμήματος Ιατρικής ΠΘ, στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο. Οι υπόλοιποι ιστοί, πχ καρδιά, περιτόναιο κ.ά. μοιράστηκαν σε άλλες ερευνητικές ομάδες σύμφωνα με διεθνείς πρακτικές (tissue sharing). Ο μυς διαχωρίστηκε σε δεσμίδες που εμβαπτίσθηκαν σε 50% γλυκερόλη, 3mM EGTA και διάλυμα ακαμψίας, το οποίο περιγράφεται παρακάτω. Μετά από 24h ανανεώθηκε το διάλυμα και οι ίνες φυλάχθηκαν στους -20°C.

4.2 Διαλύματα

Τα διαλύματα που θα χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα είναι τα εξής

-Το διάλυμα γλυκερόλης ή glycerol solution. (50% γλυκερόλη, 50% KAc).

-Το διάλυμα ακαμψίας ή basic rigor buffer αποτελείται από 120mM potassium acetate (KAc), 5mM MgAc₂, 1mM EGTA, and 50mM 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS), pH 7.0.

-Το διάλυμα ηρεμίας ή relaxing solution προκύπτει αν στο βασικό διάλυμα ακαμψίας προστεθούν 5mM ATP. Η ιοντική ισχύς του διαλύματος ηρεμίας θα είναι 0.19M και PH=7.

-Το διάλυμα ενεργοποίησης ή activating solution προκύπτει αν προστεθούν 1.1mM CaCl₂ στα διαλύματα ηρεμίας (PH=7).

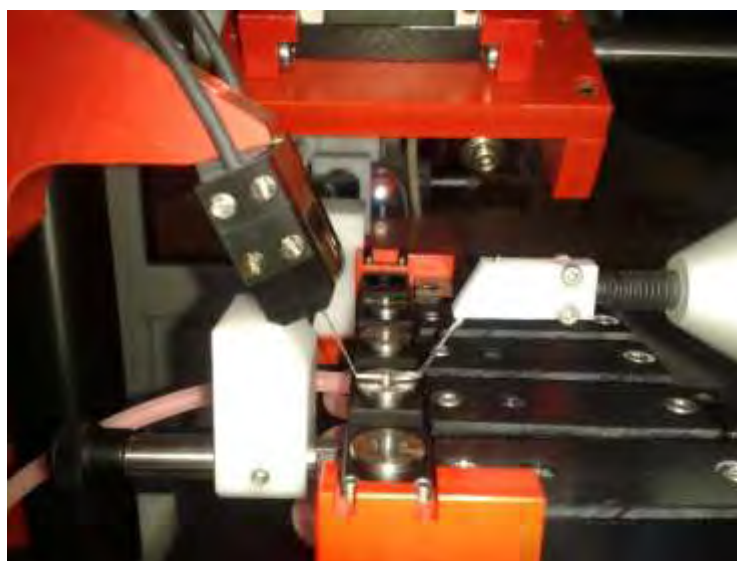
4.3 Διαχωρισμός μυϊκών ινών

Από τα παρασκευάσματα που έχουμε αποθηκεύσει στην κατάψυξη παίρνουμε με τη βοήθεια δεύτερου ατόμου μία μυϊκή δεσμίδα μεσαίου μεγέθους, την οποία επεξεργαζόμαστε ώστε να προκύψουν 2-3 μικρότερες μυϊκές δεσμίδες. Αυτές τις βάζουμε σε διάλυμα γλυκερόλης και τις τοποθετούμε στο ψυγείο ώστε να έχουμε ταχεία πρόσβαση σε μυϊκές ίνες ευκολότερα και να μη χρειάζεται να επιβαρύνουμε το απόθεμα της κατάψυξης. Τέλος παίρνουμε μία από τις μεσαίου μεγέθους μυϊκές δεσμίδες και την τοποθετούμε στο μικροσκόπιο πάνω σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα με διάλυμα γλυκερόλης. Τελικός σκοπός μας είναι να απομονώσουμε μία μυϊκή ίνα με όσο το δυνατόν λιγότερη κακοποίησή της.

Κατά την έναρξη του διαχωρισμού των μυϊκών ινών καθαρίζουμε τα εργαλεία μας με αιθανόλη 70%. Πρέπει να είμαστε προετοιμασμένοι ότι οι ίνες δεν πρέπει να μείνουν για πολλή ώρα κάτω από την υψηλή θερμοκρασία του μικροσκοπίου. Δεν ακουμπάμε

τις ίνες στη μεσότητά τους καθώς μπορεί να προκαλέσουμε κάποια βλάβη που θα επηρεάσει το πείραμα. Με λεπτούς χειρισμούς προσπαθούμε να αποσπάσουμε αρχικά όσο το δυνατό λιγότερες μυϊκές ίνες από τη μυϊκή δεσμίδα και σε δεύτερο χρόνο από τη μικρότερη αυτή ομάδα μυϊκών ινών απομονώνουμε μία τραβώντας την από το ένα άκρο της.

Μόλις επιτευχθεί ο διαχωρισμός της ίνας την παίρνουμε από την αντικειμενοφόρο πλάκα πάνω στην οποία βρίσκεται ο υπόλοιπος μυϊκός ιστός και την τοποθετούμε στις άρπαγες του μυϊκού μικροδυναμόμετρου Heidelberg, που περιγράφεται παρακάτω.



Εικόνα 30. Μικροδυναμόμετρο συστήματος Heidelberg. Απεικονίζονται οι δύο άρπαγες και τα πέντε τριβλία στα οποία διακινείται η μυϊκή ίνα κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Την μυϊκή δεσμίδα που αφήσαμε στην αντικειμενοφόρο πλάκα φροντίζουμε να την επιστρέψουμε αμέσως σε χαμηλή θερμοκρασία,. Μόλις εξασφαλίσουμε ότι η μυϊκή ίνα είναι σταθερά πιασμένη στα άκρα της από τις δύο άρπαγες, την μεταφέρουμε αμέσως στο τριβλίο με το διάλυμα ακαμψίας (basic rigor), όπου ξεπλένεται από τη γλυκερόλη για δύο περίπου λεπτά.

4.4 Σύστημα μελέτης T-jump για απομεμβρανωμένες ίνες

Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει

-το μυϊκό μικροδυναμόμετρο (SI Heidelberg με ανάλυση από 0,4 μN μέχρι 2N - σύστημα για απομεμβρανωμένες μυϊκές ίνες- t-jump),

-μικροσκόπιο, το οποίο έχει τη δυνατότητα τέτοιας τοποθέτησης πάνω από το μικροδυναμόμετρο , ώστε να έχει οπτική επαφή με την μυϊκή ίνα που είναι τοποθετημένη στις άρπαγες ,

- ηλεκτρονικό υπολογιστή με λογισμικό SI Heidelberg και

-ψύκτη και κυκλοφορητή νερού για ρύθμιση θερμοκρασίας στα συστήματα Peltier των τριβλίων που βρίσκονται κάτω από τις άρπαγες του μικροδυναμόμετρου.



Εικόνα 31. Πειραματική διάταξη αξιολόγησης λειτουργικών ιδιοτήτων απογυμνωμένων μυϊκών ινών SI Heidelberg.

4.5 Περιγραφή πειράματος

Το βασικό σκέλος του πειράματος αρχίζει από το σημείο, που η ίνα μεταφέρεται από το διάλυμα ακαμψίας (rigor buffer) στο τριβλίο με το διάλυμα χαλάρωσης (relaxing solution), όπου παραμένει επίσης για δύο περίπου λεπτά,. Σε αυτό το σημείο του έγινε η μέτρηση του μήκους και της διαμέτρου της κάθε μυϊκής ίνας. Το μήκος των χρησιμοποιούμενων μυϊκών ινών μετρήθηκε σε μεγέθυνση x10 με τη βοήθεια ενός χάρακα που είναι ενσωματωμένος στο μικροσκόπιο. Η διάμετρος των χρησιμοποιούμενων μυϊκών ινών μετρήθηκε σε τρεις με πέντε θέσεις κατά μήκος της μυϊκής ίνας σε μεγέθυνση x30 και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Πριν αρχίσει η ενεργοποίηση της μυϊκής ίνας φροντίζουμε να βρίσκεται σε τέτοιο μήκος ώστε να μην είναι ούτε χαλαρή ούτε πολύ τεντωμένη.

Η θερμοκρασία που επικρατεί στο κάθε τριβλίο ρυθμίζεται χειροκίνητα από τον πίνακα του συστήματος Heidelberg και είναι ανεξάρτητη για το κάθε ένα. Επειδή η διαδικασία της ρύθμισης των θερμοκρασιών των τριβλίων απαιτεί κάποιο χρόνο

φροντίζουμε να γίνεται παράλληλα με την προετοιμασία των μυϊκών ινών. Η επιλογή της κάθε θερμοκρασίας γίνεται ανάλογα με το σχεδιασμό του πειράματος.



Εικόνα 32. Θερμοστάτες του συστήματος μελέτης Heidelberg απομονωμένων μυϊκών ινών. Κάθε ένας από τους πέντε αυτούς θερμοστάτες ρυθμίζει αντίστοιχα με χειροκίνητο τρόπο τη θερμοκρασία σε κάθε ένα από τα πέντε υδατόλουτρα που έχει το σύστημα. Φαίνεται εδώ για παράδειγμα ότι η θερμοκρασία του πρώτου υδατόλουτρου να είναι 9 °C, του δεύτερου 8,7 °C, του τρίτου 8,6 °C, του τέταρτου 19 °C και του πέμπτου 21,4 °C.

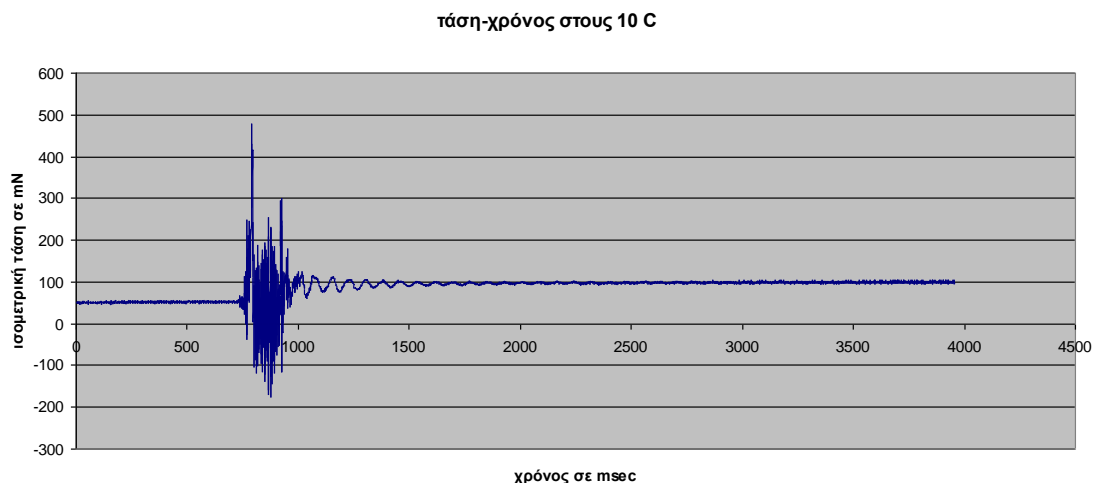
Στο επόμενο στάδιο η μυϊκή ίνα μεταφέρεται στο διπλανό τριβλίο, το οποίο περιέχει διάλυμα ενεργοποίησης (activating solution) σε θερμοκρασία 10 °C. Η μεταφορά της ίνας από το ένα τριβλίο στο άλλο με σκοπό τη μεταβολή θερμοκρασίας ονομάζεται mechanical translocation. Στην κατάσταση αυτή παραμένει για 1min, ενώ ο χρόνος της μετακίνησης από το ένα τριβλίο στο άλλο είναι <100ms, όπως έχει ζητηθεί από τον κατασκευαστή. Έπειτα μεταφέρεται σε τρίτη δεξαμενή η οποία περιέχει πάλι διάλυμα ενεργοποίησης, αλλά σε υψηλότερη θερμοκρασία κάθε φορά όπως για παράδειγμα 15 ή 20 °C. Στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκαν εκτός από την αρχική θερμοκρασία των 10 °C και οι 15, 20, 30 και 35 °C. Η θερμική εξισορρόπηση για μία μυϊκή ίνα διαμέτρου 75μm είναι <1ms. Στην κατάσταση της υψηλής θερμοκρασίας η μυϊκή ίνα παραμένει για λίγα sec, χρόνος που επιτρέπει διαδοχικές μετρήσεις των μεγεθών που μας ενδιαφέρουν χωρίς να καταστρέψουμε την ίνα.. Έπειτα η μυϊκή ίνα επαναφέρεται στη θερμοκρασία των 10°C. Στις δύο αυτές θερμοκρασίες και κατά τη διάρκεια της παραμονής των μυϊκών ινών στις δεξαμενές καταγράφονται με τη βοήθεια υπολογιστή, ο οποίος συνδέεται με τον μικροκινητήρα, η δύναμη- τάση στα άκρα της ίνας. Η τάση (δύναμη) για κάθε μυϊκή ίνα θα εκφραστεί σε mN. Με τον τρόπο αυτό θα προκύψουν ζεύγη αποτελεσμάτων ισομετρικής τάσης σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, μία σε χαμηλή θερμοκρασία και μία σε υψηλότερη θερμοκρασία έχοντας πάντα την ίνα σε διάλυμα ενεργοποίησης. Αυτή η τεχνική επιτρέπει πολλές μετρήσεις σε κάθε ίνα και ονομάζεται τεχνική αλμάτων θερμοκρασίας (temperature-jump).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα που θα παρουσιαστούν παρακάτω προέρχονται από πειράματα που έγιναν σε 122 απομεμβρανωμένες μυϊκές ίνες με μέσο μήκος 2,26 mm ($0,67 \pm SD$) και μέση διάμετρο 83,2 μm ($20,3 \pm SD$). Οι μετρήσεις έγιναν εργαστήριο ΚΕΑΦΑ-τομέας Φυσιολογίας και Μηχανικής του Μυός της ΣΕΦΑΑ του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Ιούνιο του 2012 μέχρι τον Αύγουστο του 2013. Συγκεκριμένα έγιναν διαδοχικές μετρήσεις σε χαμηλή και υψηλή θερμοκρασία με την τεχνική (t-jump). Για κάθε μία από τις υψηλές θερμοκρασίες, που αναφέρθηκαν στην περιγραφή του πειράματος, έγιναν μετρήσεις σε συγκεκριμένο αριθμό μυϊκών ιών και έτσι συλλέχθηκαν δεδομένα από τις συνολικά 122 μυϊκές ίνες. Συγκεκριμένα στο ζεύγος θερμοκρασιών 10-15 °C έγιναν μετρήσεις σε 36 ίνες, στους 10-20 °C 26 ίνες, στους 10-30 °C 40 ίνες και τέλος στους 10-35 °C 20 ίνες.

Στο πρώτο στάδιο του πειράματος η ίνα αρχίζει να ενεργοποιείται αναπτύσσοντας στα άκρα της τάση, η οποία καταγράφεται στο ειδικό λογισμικό πρόγραμμα του ηλεκτρονικού υπολογιστή. Η σταδιακή αύξηση δύναμης ακολουθεί ένα συγκεκριμένο ρυθμό και για να καταγραφεί η μέγιστη δύναμη ενεργοποίησης στους 10 °C πρέπει να αφήσουμε την ίνα στο τριβλίο με το διάλυμα ενεργοποίησης περίπου ένα με δύο λεπτά. Τότε περίπου η καμπύλη αύξησης της τάσης είμαστε σίγουροι ότι φτάνει στο plateau της. Στο τέλος της διαδικασίας καταγράφουμε τις τιμές της μέγιστης ισομετρικής τάσης της κάθε ίνας στους 10 °C.

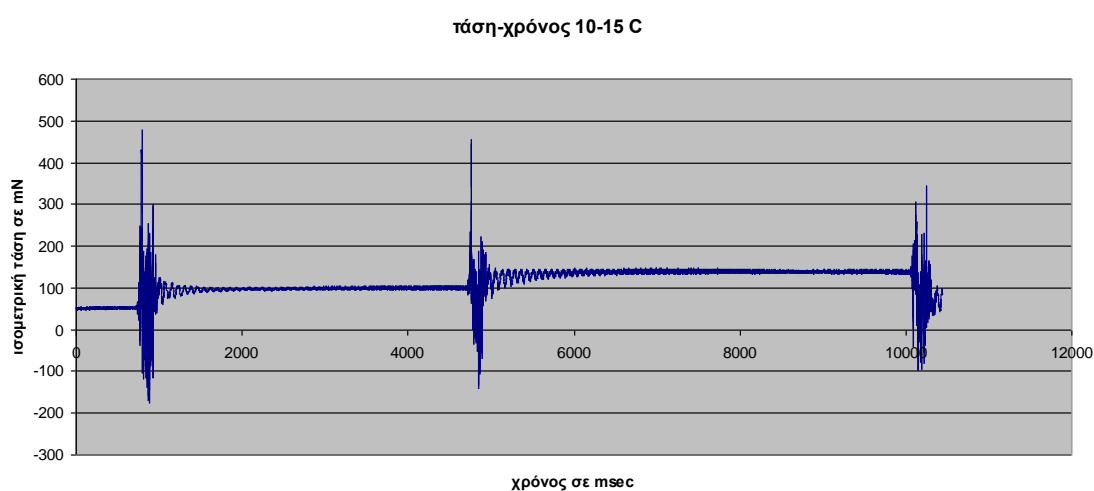
Τα δεδομένα από αυτή τη διαδικασία μεταφέρονται στο σκληρό δίσκο του υπολογιστή και αναλύονται με το πρόγραμμα excel της Microsoft. Ένα ενδεικτικό γράφημα της ανάπτυξης δύναμης στα άκρα της μυϊκής ίνας από διάλυμα χαλάρωσης σε διάλυμα ενεργοποίησης στους 10 °C φαίνεται στην εικόνα 33.



Εικόνα 33. Γράφημα τάσης –χρόνου της μυϊκής 010813-a1 ίνας στους 10 °C.

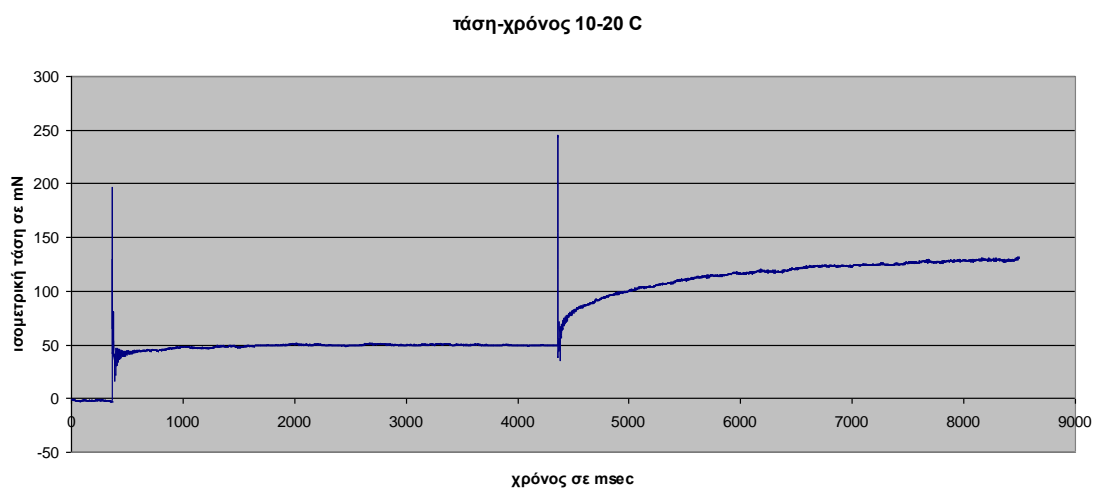
Σε δεύτερο χρόνο η ίδια ίνα μεταφέρεται σε τρίτο τριβλίο, που περιέχει και αυτό διάλυμα ενεργοποίησης, αλλά βρίσκεται σε υψηλότερη θερμοκρασία π.χ. τους 15 °C. Καταγράφεται έτσι μία δεύτερη τιμή τάσης που προκύπτει από ανάλυση δεδομένων,

όπως περιγράφηκε παραπάνω. Και σε αυτήν την περίπτωση η αύξηση της τάσης ακολουθεί μία καμπύλη, αυξάνεται δηλαδή σταδιακά με έναν ρυθμό αύξησης, ο οποίος είναι γρηγορότερος από την προηγούμενη περίπτωση. Αυτό συμβαίνει γιατί ήδη έχει γίνει ενεργοποίηση των περισσότερων μονάδων ακτίνης-μυοσίνης και είναι ένα ενδιάμεσο στάδιο που χρησιμοποιείται ώστε η ίνα να μην χρειάζεται να παραμείνει στο τριβλίο με την υψηλή θερμοκρασία για μεγάλο χρονικό διάστημα, γιατί αλλοιώνεται, ειδικά όταν πρόκειται για τις πολύ υψηλές θερμοκρασίες των πειραμάτων μας π.χ. 30 και 35 °C. Ένα ενδεικτικό γράφημα του συνολικού πειράματος φαίνεται στην εικόνα 34.

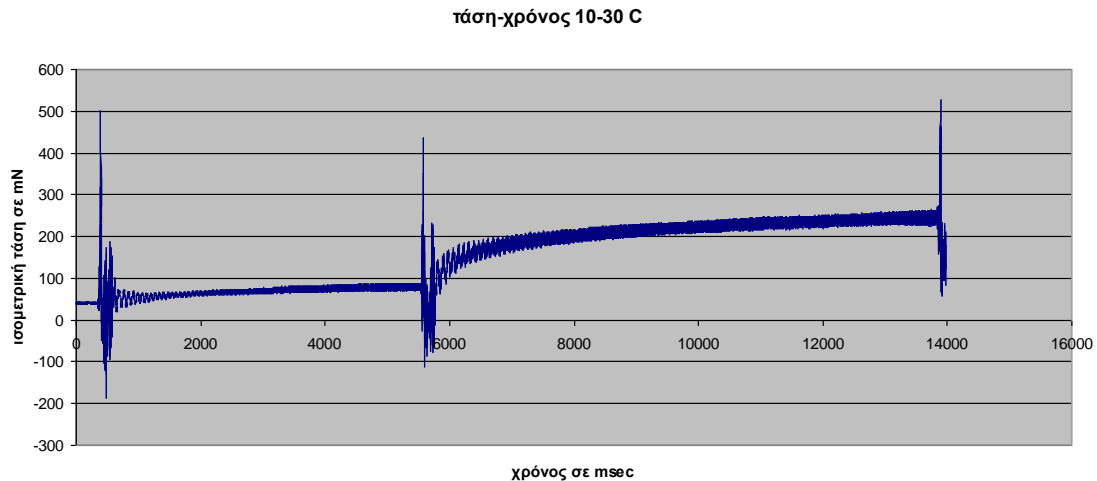


Εικόνα 34. Γράφημα τάσης – χρόνου της μυϊκής ίνας 010813-a1 από τους 10 στους 15 °C. Φαίνεται ότι το αρχικό τμήμα του γραφήματος είναι όμοιο με αυτό της εικόνας 32 και αφορά μόνο τους 10 °C. Περίπου στα 40sec φαίνεται ότι η ίνα μεταφέρεται στο τριβλίο με την αυξημένη θερμοκρασία που στο συγκεκριμένο πείραμα είναι οι 15 °C και η ίνα ανταποκρίνεται αυξάνοντας την τάση στα άκρα της.

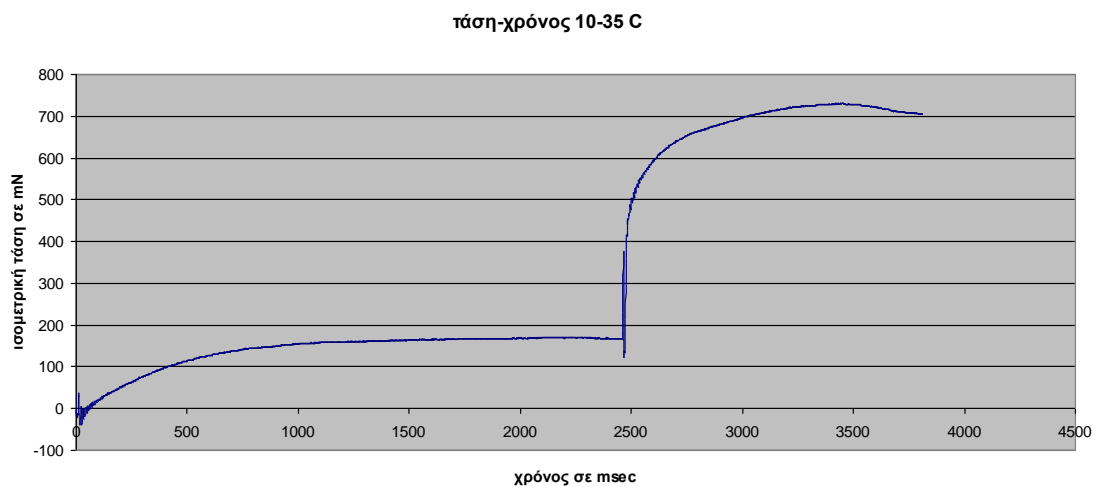
Παρομοίως έγιναν πειράματα από τους 10 στους 20, 30 και 35 °C και ενδεικτικά γραφήματα φαίνονται παρακάτω.



Εικόνα 35. Γράφημα τάσης- χρόνου της μυϊκής ίνας 120712-d1 από τους 10 στους 20 °C.



Εικόνα 36. Γράφημα τάσης- χρόνου της μυϊκής ίνας 300713-c1 από τους 10 στους 30 °C.



Εικόνα 37. Γράφημα τάσης- χρόνου της μυϊκής ίνας 270912-a1 από τους 7 στους 35 °C.

Μετά από αυτή τη διαδικασία προκύπτουν ζεύγη τιμών από κάθε πείραμα. Μία πρώτη τιμή της ισομετρικής δύναμης στη χαμηλή θερμοκρασία των 10 °C και μία δεύτερη στην υψηλή θερμοκρασία, που είναι κάθε φορά διαφορετική. Στη συνέχεια για να εξισορροπήσουμε τις τιμές της δύναμης που προέκυπταν από κάθε μυϊκή ίνα υπολογίσαμε τη διορθωμένη τιμή δύναμης για κάθε ίνα, η οποία προέκυπτε από τη διαίρεση της τιμής της ισομετρικής τάσης με την επιφάνεια της ίνας. Το πηλίκο που προέκυπτε πολλαπλασιάστηκε επί 1000 για να αποφύγουμε την υποδιαστολή και τα πολλά δεκαδικά ψηφία και το αποτέλεσμα εκφράστηκε σε mN/mm^2 . Με αυτό τον τρόπο ουσιαστικά υπολογίσαμε την ισομετρική τάση ανά μονάδα επιφάνειας ίνας, ώστε το μέγεθος της ίνας να μην αποτελεί παράγοντα επίδρασης των τελικών αποτελεσμάτων και συμπερασμάτων. Ο τύπος αυτών των υπολογισμών είναι ο εξής:

$$\text{Corrected tension} = \text{isometric tension} / [\pi \times (\text{diameter}/2)^2] \times 1000$$

Έτσι για κάθε τιμή ισομετρικής τάσης υπολογίσαμε έπειτα τη διορθωμένη τιμή της. Στο παράρτημα 3 φαίνονται οι τιμές που προέκυψαν από τα πειράματα από τους 10 στους 15 °C, από 10 στους 20 °C, από 10 στους 30 °C και από 10 στους 35 °C και οι διορθωμένες τιμές τους.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι της ισομετρικής τάσης σε κάθε θερμοκρασία καθώς και οι τυπικές αποκλίσεις τους για τις απόλυτες τιμές αυτής και τις διορθωμένες τιμές αυτής.

Temperature(°C) and no.of fibres	Average Tension (mN)	SD (mN)	Average Corrected Tension (mN/mm ²)	SD (mN/mm ²)
10 (n=122)	94	80,4	18	14,6
15 (n=36)	210,4	168,7	39,3	29
20 (n=26)	210,46	156,5	36,6	25,7
30 (n=40)	235,45	134,35	51	24,57
35 (n=20)	373,55	197,04	63,2	22,5

Πίνακας 2. Ισομετρική δύναμη παραγόμενη στις θερμοκρασίες των 10, 15,20 και 35 °C (average and SD).

Επίσης υπολογίστηκε το ποσοστό αύξησης της απόλυτης ισομετρικής τάσης κα της διορθωμένης τάσης για κάθε θερμοκρασία και η τυπική του απόκλιση.

Temperature(°C) and no.of fibres	% increase of is.tension	SD	% increase of cor. isometric tension	SD
15 (n=36)	229.13	142,5	129	142
20 (n=26)	238,47	79,22	138	78
30 (n=40)	402,84	184,88	330	206
35 (n=20)	367,32	68,98	267	69

Πίνακας 3. Ποσοστό αύξησης της απόλυτης και διορθωμένης ισομετρικής δύναμης σε σχέση με την παραγόμενη δύναμη της ίδιας ίνας στους 10 °C.

Στη συνέχεια υπολογίστηκε για κάθε ίνα το delta change, που είναι η διαφορά των διορθωμένων ισομετρικών τάσεων για κάθε ίνα. Δηλαδή

$$\text{Delta change} = \text{corrected tension}(\text{high temperature}) - \text{corrected tension}(\text{low temperature})$$

Για παράδειγμα στην ίνα No 1 του πίνακα 5 (παράρτημα 3) το delta change είναι $29 - 19,9 = 9,1$. Οι τιμές delta change που προέκυψαν για όλες τις ίνες παραθέτονται στους πίνακες 9,10,11 και 12 του παραρτήματος 3. Η χρήση του delta change γίνεται για να ομαλοποιήσουμε τη μεταβλητότητα των τιμών που υπάρχουν στη θερμοκρασία έναρξης που είναι οι 10 °C.

Στη συνέχεια ορίσαμε τα τέσσερα άλματα θερμοκρασίας ως τέσσερις διαφορετικές καταστάσεις. Δηλαδή ορίσαμε το άλμα θερμοκρασίας από του 10 στους 15 °C ως «κατάσταση 1», το άλμα θερμοκρασίας από τους 10 στους 20 °C ως «κατάσταση 2», το άλμα θερμοκρασίας από 10 στους 30 °C ως «κατάσταση 3» και τέλος το άλμα θερμοκρασίας από τους 10 στους 35 ως «κατάσταση 4».

temp_change	Mean delta change	Std. Deviation	Std. Error of Mean	Minimum	Maximum
10C-15C	18,5056	14,24305	2,37384	4,10	73,00
10C-20C	19,7038	14,59407	2,86213	3,30	62,60
10C_30C	36,3725	16,54182	2,61549	10,50	73,20
10C-35C	45,5100	16,67030	3,72759	17,80	80,20
Total	29,0459	18,67818	1,69104	3,30	80,20

Πίνακας 4. Παρουσιάζονται οι μέσες τιμές delta change, το std. Deviation, std error of mean και μέγιστες και ελάχιστες τιμές των delta change σε κάθε κατηγορία αλμάτων θερμοκρασίας. .

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας Tests of Normality Kolmogorov-Smirnov για τις τιμές delta change των τεσσάρων καταστάσεων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τα δεδομένα δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Συνεπώς χρησιμοποιήθηκε μη παραμετρικό τεστ ανάλυσης διακύμανσης μονής κατεύθυνσης Kruskal Wallis για να εξεταστεί αν υπάρχουν διαφορές στο delta change της δύναμης ανάμεσα στις 4 καταστάσεις. Το τεστ έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 4 καταστάσεις ($\chi^2=47,968$, $df=3$, $p<0,001$). Η μέση τιμή delta change ήταν 29,04 με $18,67 \pm SD$, ενώ οι μέσοι όροι του delta change για κάθε κατηγορία άλματος θερμοκρασίας φαίνονται στον πίνακα 4. . Για την κατηγορία 1 το πλήθος των ινών ήταν $N=36$ και το mean rank 39,08. Για την κατηγορία 2 το πλήθος των ινών ήταν $N=26$ και το mean rank 41,9. Για την κατηγορία 3 το πλήθος των ινών ήταν $N=40$ και το mean rank 78,43. Τέλος για την κατηγορία 4 το πλήθος των ινών ήταν $N=20$ και το mean rank 93,48.

Στη συνέχεια εκτελέστηκε μη παραμετρικό τεστ για ανεξάρτητα δείγματα Mann Whitney για να εντοπιστούν οι διαφορές ανάμεσα στις 4 καταστάσεις. Πραγματοποιήθηκαν 6 τεστ Mann Whitney για συγκρίσεις μεταξύ των 4 συνθηκών. Για να αποφευχθεί πιθανό σφάλμα τύπου α λόγω των πολλαπλών συγκρίσεων πραγματοποιήθηκε διόρθωση bonferroni (διαιρώντας το επίπεδο στατιστικής

σημαντικότητας (0,05) με τον αριθμό των συγκρίσεων (6). Έτσι το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας για αυτές τις συγκρίσεις ορίστηκε το $0,05/6 = 0,008$.

Με βάση τα παραπάνω η συνθήκη 10-15 (Mean rank=30,93) δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά από την συνθήκη 10-20 (Mean rank=32,29), $p > 0.008$. Η ίδια συνθήκη (Mean Rank= 25,04) διαφέρει στατιστικά σημαντικά από την συνθήκη 10-30 (Mean rank=50,61) και τέλος διαφέρει στατιστικά σημαντικά (Mean Rank=20,11) από τη συνθήκη 10-35 (Mean rank= 43,6) , $p < 0.008$. Επίσης η συνθήκη 10-20 (Mean rank=21,06) διαφέρει στατιστικά σημαντικά από την συνθήκη 10-30 (Mean rank=41,59) και ομοίως (Mean Rank=15,56) διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τη συνθήκη 10-35 (Mean rank=33,83), $p < 0.008$. Τέλος η συνθήκη 10-30 (Mean rank=27,23) δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά από την συνθήκη 10-35 (Mean rank=37,05), $p > 0.008$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Υπάρχουν τουλάχιστον τρεις λόγοι κατά τον Ranatunga (K. W. Ranatunga, 2010) για τους οποίους ευρήματα από μελέτες της επίδρασης της θερμοκρασίας στη μυϊκή συστολή έχουν μεγάλη επιστημονική αξία. Καταρχάς η νεότερη τεχνική t-jump είναι χρήσιμη ως τεχνική ταχείας μεταβολής θερμοκρασίας και μικρής έκθεσης των ινών σε περιβάλλον που βλάπτει τη δομή των πρωτεϊνών τους με αποτέλεσμα να μπορεί να μελετηθεί ο κύκλος των εγκάρσιων γεφυρών/AM-ATPase και η διαδικασία της μυϊκής συστολής, ακόμη και σε θερμοκρασίες που να προσεγγίζουν το φυσιολογικό (Coupland, Pinniger, & Ranatunga, 2005). Δεύτερον, όπως έχει αναλυτικά εξηγηθεί το 2003 στην ανασκόπηση του Kawai (Kawai, 2003), οι μελέτες της επίδρασης της θερμοκρασίας στη μυϊκή συστολή παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τις παραμέτρους της παραγωγής τάσης. Τρίτον, παρόλο που η θερμοκρασία του κορμού του ανθρώπινου σώματος παραμένει σταθερή, in situ οι σκελετικοί μύες υποβάλλονται στην επίδραση ενός εύρους θερμοκρασιών και ως εκ τούτου δεδομένα από τέτοια πειράματα βοηθούν να καταλάβουμε καλύτερα την «επίδοση» των μυών στον οργανισμό μας.

Σκοπός λοιπόν της παρούσας εργασίας ήταν αρχικά η ανάδειξη της πειραματικής διάταξης του εργαστηρίου μας, η οποία εγκαταστάθηκε επιτυχώς στο χώρο αυτό και έτσι πραγματοποιήθηκαν σε αυτήν για πρώτη φορά πειράματα με άλματα θερμοκρασίας. Τέτοιου είδους πειραματικές κατασκευές που χρησιμοποιούν την τεχνική των αλμάτων θερμοκρασίας είναι λίγες σε παγκόσμιο επίπεδο. Η συγκεκριμένη διάταξη που υπάρχει στο εργαστήριό του ΣΕΦΑΑ Τρικάλων είναι αποτέλεσμα της συνεργασίας της υπεύθυνης του εργαστηρίου αναπληρώτριας καθηγήτριας κυρίας Καρατζαφέρη Χριστίνας με Γερμανό μηχανικό της εταιρίας SI-Heidelberg που εξειδικεύεται στην κατασκευή τέτοιων πειραματικών διατάξεων. Το εργαστήριο ΚΕΑΦΑ-τομέας Φυσιολογίας και Μηχανικής του Μυός του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στεγάζεται στα κτίρια του ΣΕΦΑΑ Τρικάλων. Στο εργαστήριο αυτό μπορούν να γίνουν πειράματα και να χρησιμοποιηθεί η τεχνική t-jump για να μελετηθούν οι λειτουργικές ιδιότητες απομεμβρανωμένων μυϊκών ινών κάτω από την επίδραση διαφόρων παραγόντων. Ειδικότερα στη δική μας μελέτη μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην ισομετρική τάση σε φυσιολογικές συνθήκες. Γι' αυτό στα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών έχοντας ως ανώτερη

θερμοκρασία καταγραφής της ισομετρικής τάσης τους 35°C, οι οποίες επιτυγχάνονται με τη χρήση των συστημάτων Peltier .

Πειράματα που έχουν κάνει στο παρελθόν άλλοι μελετητές έδειξαν ότι η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αύξηση της ισομετρικής τάσης. Τα πειράματα αυτά δεν ήταν πανομοιότυπα γιατί χρησιμοποιούσαν διαφορετικά κάθε φορά παρασκευάσματα (ανέπαφες ίνες, μυϊκές δεσμίδες, απομεμβρανωμένες μυϊκές ίνες). Ωστόσο σε όλα αυτά τα πειράματα φαίνεται ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία αυξάνεται και η ισομετρική τάση στο εύρος θερμοκρασιών που χρησιμοποιήσαμε στα πειράματά μας (Coupland et al., 2001; Coupland & Ranatunga, 2003a; Marco Linari et al., 2004; Piazzesi et al., 2003).

Ο βαθμός ανάπτυξης ισομετρικής τάσης φαίνεται να ποικίλει ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος. Για παράδειγμα η συγκέντρωση Ca^{++} επηρεάζει την αύξηση της ισομετρικής τάσης (Chase, Martyn, & Hannont, 2001) . Έτσι είναι δύσκολη η ακριβής ποσοτική σύγκριση των αποτελεσμάτων με την προϋπάρχουσα βιβλιογραφία.

Όσον αφορά τη σχέση της διορθωμένης ισομετρικής τάσης των απομεμβρανωμένων μυϊκών ινών που έχουν ενεργοποιηθεί με Ca^{++} η καμπύλη που διέπει τη σχέση τους στη δική μας μελέτη φαίνεται στην εικόνα 39 του παραρτήματος 3. Υπάρχει διαφοροποίηση της καμπύλης στη θερμοκρασία των 15°C σε σχέση με άλλες τέτοιου είδους μελέτες όπου φαίνεται ότι η καμπύλη αυτή είναι σιγμοειδής (Coupland et al., 2001; Coupland & Ranatunga, 2003b; K. W. Ranatunga, 1994). Από τους 15°C και πάνω συμφωνούν στο ότι υπάρχει αύξηση της τάσης όσο αυξάνει η θερμοκρασία. Στην εικόνα 40 του παραρτήματος 3 ωστόσο φαίνεται η καμπύλη των αποτελεσμάτων μας να συμφωνεί περισσότερο με τη σιγμοειδή καμπύλη, ωστόσο αυτή αφορά αξιολόγηση του delta change της διορθωμένης ισομετρικής τάσης και όχι τη διορθωμένη ισομετρική τάση που χρησιμοποιήσαν οι προηγούμενοι μελετητές.

Οι Ranatunga και Wylie το 1983 σε μελέτη ανέπαφων μυών επίμυος αναφέρουν ότι η μεταβολή θερμοκρασίας του μυ από 35 στους 10°C οδηγεί σε μείωση της ισομετρικής τάσης στο 50% (B. Y. K. W. Ranatunga & Wylie, 1983) δηλαδή αν το αντιστρέψουμε πρόκειται για διπλασιασμό της τάσης όταν η θερμοκρασία αυξάνεται από τους 10 στους 35 °C. Στις μετρήσεις τους συμπεριλαμβάνουν τους 25 °C και αναφέρουν ότι μεταβολή της θερμοκρασίας του μυ από τους 35 στους 25 °C οδηγεί την ισομετρική τάση στο 90% της τιμής της. Σε παρόμοια συμπεράσματα συμπεράσματα κατέληξε ο Ranatunga το 1987 (K. W. Ranatunga, Sharpe, & Turnbull, 1987) με πειράματα σε ανθρώπινους μύες. Σε μελέτη των Coupland και Ranatunga το 2003 (Coupland & Ranatunga, 2003b) όπου έγιναν μετρήσεις ισομετρικής τάσης σε ανέπαφους μύες επίμυος με την τεχνική t-jump υπολογίζεται το ποσοστό αύξησης της τάσης σε διάφορες θερμοκρασίες από τους 5 στους 40°C. Το διάγραμμα αυτό φαίνεται στην εικόνα 27. Ομοίως φαίνεται ότι η τάση περίπου διπλασιάζεται από τους 10 στους 35 °C, στους 15 °C είναι στο 75% της μέγιστης, ενώ στους 20 °C είναι στο 85-90% της μέγιστης. Οι Linari et al το 2005 κατέγραψαν την ισομετρική τάση απομεμβρανωμένων μυϊκών ινών βατράχου σε θερμοκρασίες από 0 μέχρι 17 °C (M Linari et al., 2005). Παρατήρησαν αύξηση της τάσης κατά 43%. Η σύγκριση με αυτές τις μελέτες δεν μπορεί να γίνει με ακρίβεια καθώς χρησιμοποιούν άλλοτε άλλα πρωτόκολλα, άλλες θερμοκρασίες ή άλλα παρασκευάσματα. Ωστόσο το ποσοστό της μελέτης μας φαίνεται να συμφωνούν για τη θερμοκρασία των 15 °C, είναι μικρότερο για τους 20 °C και είναι μεγαλύτερα για τους 30 και 35 °C.

Τα πειράματων της μελέτης έγιναν στα πλαίσια των τριών R (Reduction, Replacement, Refinement) που αφορούν πειράματα με ζώα. Οι συνθήκες διαβίωσης των ζώων καθώς και η θανάτωσή τους γίνεται ακολουθώντας διεθνείς κανόνες. Στα πειράματά μας αρκεί ένα μόνο ζώο για να διατηρήσουμε παρασκευάσουμε πάρα

πολλές απομεμβρανωμένες ίνες με αποτέλεσμα να μη χρειάζεται να θυσιάζονται πολλά ζώα. Τέλος δεν χρησιμοποιούμε ζώα που να θεωρούνται προστατευμένα ή σπάνια είδη.

Στο εργαστήριό μας χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του mechanical translocation όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 4 δηλαδή γίνεται χειροκίνητη μεταφορά των ινών από το ένα τριβλίο στο άλλο με σκοπό τη μεταβολή της θερμοκρασίας. Την ίδια τεχνική χρησιμοποιούν για τα πειράματά τους και άλλοι ερευνητές όπως οι Cooke και Lombardi (Cooke et al., 1988; Marco Linari et al., 2004). Αντίθετα ο Ranatunga μεταβάλλει τη θερμοκρασία των ινών με τη χρήση laser, τεχνική η οποία θεωρείται ότι συχνά καίει το παρασκεύασμα και χρειάζεται ιδιαίτερη δεξιότητα για τη διενέργεια του πειράματος. Εδώ φαίνεται ότι πολύ σημαντικό ρόλο στην επίτευξη τέτοιων μελετών έχουν παίξει η πρόοδος άλλων επιστημών και η συνεισφορά των μηχανικών που κατασκευάζουν τις συσκευές στις οποίες γίνονται τα πειράματα αλμάτων θερμοκρασίας σε απομεμβρανωμένες μυϊκές ίνες, ώστε να επιτυγχάνονται στην πράξη οι θερμοκρασίες που έχουμε ορίσει στο πρωτόκολλο της μελέτης. Οι συσκευές αυτές δεν έχουν πάντα τα ίδια χαρακτηριστικά, αλλά διαφέρουν ανάλογα με τις ανάγκες του μελετητή που ζητά συχνά από τον κατασκευαστή να δώσει σε κάθε συσκευή ή σε κάθε κομμάτι αυτής τα χαρακτηριστικά που ο ίδιος θέλει. Αναφέρονται τροποποιήσεις της ίδιας συσκευής μετά από επίκληση του μελετητή για την επίτευξη καλύτερων αποτελεσμάτων όπως για παράδειγμα το 1994 ο Ranatunga άλλαξε το υλικό από το οποίο κατασκευάζονταν οι άρπαγες της συσκευής του από σίδηρο σε πυρίτιο λόγω του ότι η σταθερά θερμικής διαστολής του πυριτίου είναι το 1/20 του σιδήρου και επηρέαζε λιγότερο την αξιοπιστία του πειράματος (K. W. Ranatunga, 1994).

Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία τόσο δυσκολότερη γίνεται η καταγραφή της ισομετρικής τάσης της ίνας κατά τη διάρκεια των πειραμάτων καθώς υπάρχει μεγαλύτερος κίνδυνος θραύσης ή κακοποίησης της ίνας. Τα μεγάλα άλματα θερμοκρασίας στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ότι ενέχουν μεγάλες δυσκολίες όσον αφορά την καταγραφή της ενεργητικής δύναμης που παράγει η μυϊκή ίνα (Kawai, 2003).

Ομοίως όσον αφορά το πρωτόκολλο επιλογής και αυτό κάθε φορά σχεδιάζεται για να μελετήσει το ερώτημα του μελετητή. Έτσι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες παράμετροι που μεταβάλλονται για να μελετηθεί η επίδρασή τους στην ίνα είναι η θερμοκρασία, το μήκος της ίνας, η συγκέντρωση ουσιών στα διαλύματα και οι πιέσεις. Σε κάθε περίπτωση πρέπει οι μετρήσεις που κάνει ο ερευνητής να έχουν καλό σήμα με τα λιγότερα παράσιτα. Μεγάλη σημασία έχει σε ποιο σημείο της μυϊκής συστολής επιλέγουμε να ασκήσουμε την επίδραση του εξωτερικού ερεθίσματος και κάτω από ποιες ακριβώς συνθήκες (Kawai, 2003; K. W. Ranatunga, 1994).

Πολύ σημαντική επίσης είναι η ανάδειξη του ρόλου της θερμοκρασίας στις παραμέτρους της μυϊκής συστολής που μπορεί να γίνει με το ρόλο του PH κατά το μυϊκό κάματο. Βρέθηκε λοιπόν αρχικά ότι η ελάττωση του PH κατά το μυϊκό κάματο που μπορεί να φτάσει έως και 6,2 ή και λιγότερο (οξέωση από παραγωγή γαλακτικού οξέως) είναι σημαντικός παράγοντας αναστολής της αλληλεπίδρασης της ακτίνης με τη μυοσίνη (Chase & Kushmerick, 1988). Όμως, όταν ο ρόλος του χαμηλού pH εξετάστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο αλμάτων θερμοκρασίας, παρατηρήθηκε μια σημαντική εξάρτηση της επίδρασης του pH από τη θερμοκρασία. Στους 10 °C, με μείωση του pH από τιμή του 7.0 σε τιμή 6.2, η ισομετρική τάση μειώθηκε κατά 54% και η μέγιστη ταχύτητα συστολής μειώθηκε κατά 30%. Όμως, στους 30 °C η ισομετρική τάση μειώθηκε κατά 18% και η μέγιστη ταχύτητα συστολής δεν μειώθηκε (Pate, Bhimani, Franks-Skiba, & Cooke, 1995). Επομένως, η οξέωση φαίνεται να έχει λιγότερο σημαντικό ρόλο στον κάματο. Συμπεραίνουμε ότι όσο περισσότερο φυσιολογικές θερμοκρασίες επιτυγχάνουμε ενδεχομένως να τροποποιούνται

αποτελέσματα και συμπεράσματα στα οποία είχαμε καταλήξει όταν τα πειράματά μας γίνονταν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες.

Στο πρωτόκολλο του δικού μας πειράματος επιλέξαμε να γίνει αρχικά ενεργοποίηση της ίνας με το διάλυμα ενεργοποίησης, που περιέχει Ca^{++} , στη χαμηλή θερμοκρασία των $10^{\circ}C$. Παρόμοια τεχνική ακολουθούν και άλλοι μελετητές ανάλογα με τα πειράματά που έχουν επιλέξει στο πρωτόκολλό τους (Coupland & Ranatunga, 2003b) Μετά από κάποιο χρονικό διάστημα το οποίο ήταν κάθε φορά περίπου ένα λεπτό η ίνα φτάνει σε ένα plateau μέγιστης τάσης. Στο σημείο αυτό γίνεται το άλμα θερμοκρασίας δηλαδή η ίνα μεταφέρεται σε γειτονικό τριβλίο που έχει και αυτό διάλυμα ενεργοποίησης, αλλά με θερμοκρασία μεγαλύτερη και ανάλογα με το πείραμα κάθε φορά διαφορετική ($15,20,30$ και $35^{\circ}C$). Έτσι η ίνα στο σημείο αυτό αγγίζει ένα δεύτερο plateau υψηλότερες θερμοκρασίες. Η τελική θερμοκρασία που χρησιμοποιούμε προσεγγίζει τη φυσιολογική θερμοκρασία.

Η ενεργοποίηση της ίνας αρχικά σε χαμηλή θερμοκρασία χρησιμοποιείται ως ενδιάμεσο στάδιο ενεργοποίησης γίνεται με σκοπιμότητα την προστασία της ίνας από την έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες για μεγάλο χρονικό διάστημα με αποτέλεσμα την καταστροφή τους. Όπως έχουμε αναφέρει στο κεφάλαιο 2 της ανασκόπησης η αλληλεπίδραση της ακτίνης με τη μυοσίνη στο γραμμωτό μυ αρχικά ρυθμίζεται από την αλληλεπίδραση τριών στοιχείων, της τροπομυοσίνης (Tm), της τροπονίνης (Tn) και του Ca^{++} , που είναι γνωστή ως ρύθμιση των λεπτών νηματίων (thin filament regulation). Η διαθεσιμότητα του Ca^{++} στα λεπτά νημάτια είναι καθοριστικό στοιχείο της ρύθμισης λεπτών νηματίων για τη μυϊκή συστολή. Όταν απουσιάζει το ασβέστιο από την TnC, η Tm αναστέλλει τη δέσμευση της μυοσίνης στην ακτίνη ενώ στην παρουσία του Ca^{++} η αλληλεπίδραση της μυοσίνης με την ακτίνη επιτρέπονται. Είναι σημαντικό να υπάρχει Ca^{++} διαθέσιμο για τη μυϊκή συστολή, το οποίο σε φυσιολογικές συνθήκες προέρχεται από τις τελικές δεξαμενές, στις συνθήκες του πειράματος όμως το παρέχουμε εμείς στο κύτταρο μέσα από το διάλυμα ενεργοποίησης. Η παρουσία του Ca^{++} φέρνει την ακτίνη στην κατάσταση «open» όπως αυτή περιγράφεται στην εικόνα 23 από τη μελέτη των McKillop και Geeves. Με τον τρόπο αυτό γίνεται εφικτή η προσέγγιση ακτίνης και μυοσίνης και δημιουργούνται οι αρχικές κατάλληλες προδιαγραφές για την έναρξη του κύκλου της εγκάρσιας γέφυρας, την αλληλεπίδραση των νηματίων και την παραγωγή τάσης.

Τοποθετώντας λοιπόν τη μυϊκή ίνα σε διάλυμα ενεργοποίησης με Ca^{++} και φυσικά παρουσία ATP ακόμη και σε χαμηλή θερμοκρασία αρχίζει η αλληλεπίδραση ακτίνης και μυοσίνης και ένας αριθμός εγκάρσιων γεφυρών αρχίζει να παράγει τάση. Η χαμηλή θερμοκρασία κάτω από αυτές τις συνθήκες επιτρέπει να επιτύχουμε την ενεργοποίηση ενός αριθμού εγκάρσιων γεφυρών και την καταγραφή ενός plateau ισομετρικής τάσης χωρίς όμως την έκθεση της ίνας σε δυσμενείς για αυτήν συνθήκες όπως είναι οι υψηλές θερμοκρασίες. Το αποτέλεσμα αυτής της προετοιμασίας της ίνας στη χαμηλή θερμοκρασία είναι ότι όταν θα τη μεταφέρουμε μηχανικά με το άλμα θερμοκρασίας στην υψηλή θερμοκρασία, θα υπάρχει ήδη αυτός ο αριθμός των ενεργοποιημένων εγκάρσιων γεφυρών. Έτσι με την αύξηση της θερμοκρασίας θα μπορέσουμε να καταγράψουμε γρηγορότερα το νέο plateau της μέγιστης ισομετρικής τάσης. Όπως βέβαια έχουμε ήδη σχολιάσει δεν έχει ακόμη τεκμηριωθεί με βεβαιότητα αν αυτή η αύξηση της θερμοκρασίας προκύπτει από την αύξηση του αριθμού των εγκάρσιων γεφυρών που συμμετέχουν στην παραγωγή τάσης ή αν αυτή προκύπτει από την αύξηση της τάσης ανά εγκάρσια γέφυρα χωρίς να αλλάζει ο αριθμός τους. Ωστόσο αποφεύγουμε να υποβάλλουμε την ίνα στο «stress» της υψηλής θερμοκρασίας για μεγάλο χρονικό διάστημα αποκομίζοντας τα αποτελέσματα που θέλουμε προσπαθώντας να μιμηθούμε τις συνθήκες που ισχύουν in vivo στο μυ.

Υπάρχουν αρκετές προοπτικές για την διεξαγωγή νέων μελετών με τη χρήση της τεχνικής t-jump. Με την πειραματική διάταξη που διαθέτει το εργαστήριο μπορούν να πραγματοποιηθούν πειράματα που θα καταγράφουν την παραγόμενη τάση τόσο σε ισομετρική όσο και ισοτονική κίνηση αλλάζοντας τις προδιαγραφές του πειράματος από τον υπολογιστή. Στα πειράματα αυτά εκτός από την τάση μπορούμε από τα διαγράμματα που προκύπτουν να μετρήσουμε την ταχύτητα αύξησης της τάσης (tension rise). Επίσης άλλες παράμετροι που μπορούν να μετρηθούν είναι η ταχύτητα βράχυνσης ή ταχύτητα συστολής. Φυσικά ανάλογα με τα ερωτήματα που θα θέσει ο μελλοντικός ερευνητής μπορεί να αλλάξει τις θερμοκρασίες στις οποίες θα μελετήσει τις παραπάνω παραμέτρους. Τέλος αν ο σκοπός είναι η μελέτη της επίδρασης κάποιας ουσίας στη συστολή μπορεί να μεταβάλλει την περιεκτικότητα των διαλυμάτων που πρόκειται να χρησιμοποιήσει.

Η μελέτη αυτή δεν στερείται αδυναμιών. Καταρχήν παρατηρήθηκε μεγάλο εύρος τιμών λόγω πρακτικών λόγων. Η συλλογή δεδομένων έγινε σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα κι έτσι με τον καιρό μεταβλήθηκε η ικανότητα των κυττάρων να αναπτύξουν τάση. Αλλά και οι καιρικές συνθήκες που κατά πολύ επηρέαζαν παραμέτρους του πειράματος, αλλά και του ερευνητή υπήρξαν διαφορετικές. Έτσι θεωρήσαμε ότι ενδεχομένως υπήρξαν διαφορές στα σημεία αναφοράς των μετρήσεων και αξιολογήσαμε τελικά τις μεταβολές της δύναμης Δ των διορθωμένων και όχι των απόλυτων τιμών και δεν αξιολογήσαμε την ποσοστιαία μεταβολή αυτών των δυνάμεων. Με τον τρόπο αυτό ομαλοποιήσαμε τυχόν διαφοροποιήσεις στις συνθήκες του πειράματος.

Μία άλλη αδυναμία της μελέτης είναι ότι δεν έγινε έλεγχος βαθμού φωσφορυλίωσης της MLC κάτι που θα μπορούσε να επηρεάσει την δομή του παχέος νηματίου (Karatzafeni et al., 2008). Ο βαθμός φωσφορυλίωσης MLC συνήθως είναι υψηλός κατά τις πρώτες εβδομάδες μετά την συλλογή του ιστού και μειώνεται με την πάροδο του χρόνου γεγονός που μπορεί να επηρεάσει τις τιμές της ισομετρικής τάσης που καταγράψαμε.

Τέλος η διενέργεια τέτοιου είδους πειραμάτων απαιτεί εμπειρία και ιδιαίτερες δεξιότητες από το μελετητή, οι οποίες αποκτώνται σταδιακά. Αυτό σημαίνει ότι και οι μετρήσεις όχι μόνο στη δική μας μελέτη αλλά και στις υπόλοιπες που έχουν αναφερθεί αλλά και διενεργούνται σήμερα σε άλλα εργαστήρια εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τον ανθρώπινο παράγοντα.

Βιβλιογραφία

- Abbott, B., & Wilkie, D. (1953). The relation between velocity of shortening and the tension-length curve of skeletal muscle. *Journal of Physiology*, *120*, 214–223.
- Agarkova, I., Ehler, E., Lange, S., Schoenauer, R., & Perriard, J. (2003). M-band : a safeguard for sarcomere stability ? *Journal of Muscle Research and Cell Motilit*, *24*, 191–203.
- Bennett, A. (1984). Thermal dependence of muscle function. *The American journal of physiology*, *247*(2), 217–29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11593981>
- Bennett, V., & Stenbuck, J. (1979). Identification and Partial Purification of Ankyrin , the High Affinity Membrane Attachment Site for Human Erythrocyte Spectrin. *The Journal of biological chemistry*, *254*(7), 2533–2541.
- Bers, D. (2002). Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, *415*(6868), 198–205.
- Blake, D., Weir, A., Newey, S., & Davies, K. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiological reviews*, *82*(2), 291–329. doi:10.1152/physrev.00028.2001
- Blanchard, A., Ohanian, V., & Critchley, D. (1989). The structure and function of α -actinin. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, *10*, 280–289.
- Bloemink, M. J., & Geeves, M. A. (2011). Shaking the myosin family tree : Biochemical kinetics defines four types of myosin motor. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *22*(9), 961–967. doi:10.1016/j.semcdb.2011.09.015
- Bloom, W., & Fawcett, D. (1975). *A textbook of Histology*. Philadelphia: Saunders.
- Bullock, J., Boyle, J., & Wang, M. (2001). *National Medical Series For Independent Study--Physiology*. (Lippincott, Ed.) (4th editio.).
- Burke, R. (1975). A comment on the existence of motor unit “types”. In D. B. Tower (Ed.), *The Basic Neurosciences*. New York, NY: Raven Press.
- Burridge, K., & Feramisco, J. (1981). Non-muscle [alpha]-actinins are calcium-sensitive actin-binding proteins. *Nature*, *294*(5841), 565–567. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/294565a0>
- Chase, P. B., & Kushmerick, M. J. (1988). Effect of physiological ADP concentrations on contraction of single skinned fibers from rabbit fast and slow muscles., *53*(June), 935–946.
- Chase, P. B., Martyn, D. A., & Hannont, J. D. (2001). Isometric Force Redevelopment of Skinned Muscle Fibers from Rabbit Activated with and without Ca²⁺ , *67*(November 1994).

- Colombini, B., Nocella, M., Benelli, G., Cecchi, G., & Bagni, M. A. (2008). Effect of temperature on cross-bridge properties in intact frog muscle fibers, 1113–1117. doi:10.1152/ajpcell.00063.2008.
- Coluccio, L. M., & Geeves, M. A. (1999). Transient Kinetic Analysis of the 130-kDa Myosin I (MYR-1 Gene Product) from Rat Liver. *Biochemistry*, 274(31), 21575–21580.
- Cooke, R. (1986). The mechanism of muscle contraction. *Critical reviews in biochemistry*, 21(1), 53–118.
- Cooke, R., Franks, K., Luciani, G., & Pate, E. (1988). The inhibition of rabbit skeletal muscle contraction by hydrogen ions and phosphate. *Journal of Physiology*, 395, 77–97.
- Costa, M., Escaleira, R., Cataldo, A., Oliveira, F., & Mermelstein, C. (2004). Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. *Brazilian journal of medical and biological research*, 37(12), 1819–30. doi:S0100-879X2004001200007
- Coupland, M. E., Pinniger, G. J., & Ranatunga, K. W. (2005). Tension responses to rapid (laser) temperature-jumps during twitch contractions in intact rat muscle fibres. *Journal of muscle research and cell motility*, 26(2-3), 113–22. doi:10.1007/s10974-005-4568-0
- Coupland, M. E., Puchert, E., & Ranatunga, K. W. (2001). Temperature dependence of active tension in mammalian (rabbit psoas) muscle fibres: effect of inorganic phosphate. *The Journal of physiology*, 536(Pt 3), 879–91. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2278902&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Coupland, M. E., & Ranatunga, K. W. (2003a). Force generation induced by rapid temperature jumps in intact mammalian (rat) skeletal muscle fibres. *The Journal of physiology*, 548(Pt 2), 439–49. doi:10.1113/jphysiol.2002.037143
- Coupland, M. E., & Ranatunga, K. W. (2003b). Force generation induced by rapid temperature jumps in intact mammalian (rat) skeletal muscle fibres. *The Journal of physiology*, 548(Pt 2), 439–49. doi:10.1113/jphysiol.2002.037143
- Davidson, V., & Sittman, D. (1999). *National Medical Series For Independent Study-Biochemistry*. (Lippincott, Ed.) (4th ed.).
- Davis, J., & Harrington, W. (1987). Force generation by muscle fibers in rigor: a laser temperature-jump study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(4), 975–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8109364>
- De Ruiter, C., Jones, D., Sargeant, A., & De Haan, A. (1999). Temperature effect on the rates of isometric force development and relaxation in the fresh and fatigued human adductor pollicis muscle. *Experimental physiology*, 84(6), 1137–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10564710>

- Dixon, M., Webb, E., & Thorne, C. et al. (1979). *Enzymes* (3rd editio.). London: Longman.
- Dubowitz, V., & Pearse, A. (1960). Reciprocal relationship of phosphorylase and oxidative enzymes in skeletal muscle. *Nature*, *185*, 701–702.
- Engel, W. (1998). The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease. 1962. *Neurology*, *51*(3), 655 and 17 pages following. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9748002>
- Fenn, W., & Marsch, B. (1935). Muscular force at different speeds of shortening. *The Journal of physiology*, *85*(3), 277–297.
- Foth, B., Goedecke, M., & Soldati, D. (2006). New insights into myosin evolution and classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(10), 3681–6. doi:10.1073/pnas.0506307103
- Gautel, M., & Goulding, D. (1996). A molecular map of titin/connectin elasticity reveals two different mechanisms acting in series. *FEBS letters*, *385*(1-2), 11–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8641453>
- Gillooly, J., Brown, J., West, G., Savage, V., & Charnov, E. (2001). Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science (New York, N.Y.)*, *293*(5538), 2248–51. doi:10.1126/science.1061967
- Goldman, B., Mc Cray, J., & Ranatunga, K. (1987). Transient tension changes initiated by laser temperature jumps in rabbit psoas muscle fibers. *Journal of Physiology*, *392*, 71–95.
- Gordon, A., Homsher, E., & Regnier, M. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological Reviews*, *80*(2), 853–924. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10747208>
- Gray, S., De Vito, G., Nimmo, M., Farina, D., & Ferguson, R. (2006). Skeletal muscle ATP turnover and muscle fiber conduction velocity are elevated at higher muscle temperatures during maximal power output development in humans. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, *290*(2), 376–82. doi:10.1152/ajpregu.00291.2005
- Hammarlund, M., Davis, W., & Jorgensen, E. (2000). Mutations in beta-spectrin disrupt axon outgrowth and sarcomere structure. *The Journal of cell biology*, *149*(4), 931–42. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2174563&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Henneman, E. (1957). Relation between Size of Neurons and Their Susceptibility to Discharge. *Science*, *126*(3287), 1345–1347. Retrieved from <http://www.sciencemag.org/content/126/3287/1345.short>

- Hernandez, O. M., & Jones, M. et al. (2007). Myosin essential light chain in health and disease. *American Journal Of Physiology- Heart and Circulatory Physiology*, 292, 1643–1654. doi:10.1152/ajpheart.00931.2006
- Hill, A. (1938). The Heat of Shortening and the Dynamic Constants of Muscle. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 126(843), 136–195.
- Hoffman, E., Brown, B., & Kunkel, L. (1987). Dystrophin: The protein product of the duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 51(6), 919–928.
- Houdusse, A., & Cohen, C. (1996). Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2 Å resolution: implications for regulation. *Structure*, 4, 21–32.
- <http://home.clara.net/rod.beavon/Q10.htm>. (n.d.).
- <http://www.kent.ac.uk/bio/geeves/?tab=research>. (n.d.).
- <http://www.shodor.org/unchem/advanced/kin/arrhenius.html>. (n.d.).
- <http://www.xenbase.org/xenbase/original/cell/cyto/XIF-1.htm>. (n.d.).
- Huh, G., Glantz, S., Je, S., Morrow, J., & Kim, J. (2001). Calpain proteolysis of α II-spectrin in the normal adult human brain. *Neuroscience Letters*, 316(1), 41–44.
- Huxley, H. (1972). Structural Changes in the Actin- and Myosin-containing Filaments during Contraction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 37, 361–372.
- Itoh-Satoh, M., Hayashi, T., Nishi, H., Koga, Y., Arimura, T., Koyanagi, T., Takahashi, M., et al. (2002). Titin Mutations as the Molecular Basis for Dilated Cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291(2), 385–393. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X0296448X>
- Kamm, K., & Stull, J. (2011). Signaling to Myosin Regulatory Light Chain in Sarcomeres. *Journal of Biological Chemistry*, 286(12), 9941–9947. doi:10.1074/jbc.R110.198697
- Kandel, R., Schwartz, H., & Jessel, M. (2000). *Principles of neural science* (4th editio.). Mc Grow Hill Companies.
- Karatzafiri, C., Chinn, M., & Cooke, R. (2004). The force exerted by a muscle cross-bridge depends directly on the strength of the actomyosin bond. *Biophysical journal*, 87(4), 2532–44. doi:10.1529/biophysj.104.039909
- Karatzafiri, C., Franks-Skiba, K., Cooke, R., Greenberg, M., Mealy, T., Jones, M., Szczesna-Cordary, D., et al. (2008). Inhibition of shortening velocity of skinned skeletal muscle fibers in conditions that mimic fatigue Inhibition of shortening velocity of skinned skeletal muscle fibers in conditions that mimic fatigue. *American Journal Of Physiology*, 294, 948–955. doi:10.1152/ajpregu.00541.2007

- Katz, B. (1939). The relation between force and speed in muscular contraction. *Journal of Physiology*, 96, 45–64.
- Kawai, M. (2003). What do we learn by studying the temperature effect on isometric tension and tension transients in mammalian striated muscle fibres? *Journal of muscle research and cell motility*, 24(2-3), 127–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14609024>
- Kawai, M., Kido, T., Vogel, M., Fink, R. H. a, & Ishiwata, S. (2006). Temperature change does not affect force between regulated actin filaments and heavy meromyosin in single-molecule experiments. *The Journal of physiology*, 574(Pt 3), 877–87. doi:10.1113/jphysiol.2006.111708
- Koenig, M., Monaco, A., & Kunkel, L. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*, 53(2), 219–228. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867488903832>
- Koppe, R., Hallauer, P., Karpati, G., & Hastings, K. (1989). cDNA clone and expression analysis of rodent fast and slow skeletal muscle troponin I mRNAs. *The Journal of biological chemistry*, 264(24), 14327–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2760067>
- Kotov, N., Baker, R., Davidow, D., Platov, K., Valeyev, N., Skorinkin, A., & Maini, P. (2007). A study of the temperature dependence of bienzyme systems and enzymatic chains. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 8(2), 93–112.
- Krendel, M., & Mooseker, M. S. (2005). Myosins : Tails (and Heads) of Functional Diversity. *Physiology*, 20, 239–251. doi:10.1152/physiol.00014.2005
- Lamb, G. (2002). Excitation – contraction coupling and fatigue mechanisms in skeletal muscle : studies with mechanically skinned fibres. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 23, 81–91.
- Lazarides, E., & Hubbard, B. (1976). Immunological characterization of the subunit of the 100 A filaments from muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(12), 4344–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=431448&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Linari, M, Brunello, E., Reconditi, M., Sun, Y.-B., Panine, P., Narayanan, T., Piazzesi, G., et al. (2005). The structural basis of the increase in isometric force production with temperature in frog skeletal muscle. *The Journal of physiology*, 567(Pt 2), 459–69. doi:10.1113/jphysiol.2005.089672
- Linari, Marco, Bottinelli, R., Pellegrino, M. A., Reconditi, M., Reggiani, C., & Lombardi, V. (2004). The mechanism of the force response to stretch in human skinned muscle fibres with different myosin isoforms. *The Journal of physiology*, 554(Pt 2), 335–52. doi:10.1113/jphysiol.2003.051748

- Lymn, W. (1971). Mechanism of Adenosine Triphosphate Hydrolysis by Actomyosin". *Biochemistry*, 10(25), 4617–4624.
- Machado, C., Sunkel, C., & Andrew, D. (1998). Human autoantibodies reveal titin as a chromosomal protein. *The Journal of cell biology*, 141(2), 321–33. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2148454&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Marey, E. J. (1868). *Du Mouvement dans les Fonctions de la Vie*.
- Maruyama, K. (1997). Connectin/titin, giant elastic protein of muscle. *The FASEB Journal*, 11, 341–345.
- Maruyama, K., Kimura, S., & Ohashi, K. (1977). Connectin, an elastic protein of muscle: characterization and function. *Journal of Biochemistry*, 82(2), 317–337.
- Mc Comas, A. (1996). *Skeletal muscle: Form and Function*. Champaign, IL : Human Kinetics.
- Mosby's medical dictionary*. (2009). (p. 8th edition). Elsevier.
- Nave, R., Fürst, D., & Weber, K. (1989). Visualization of the polarity of isolated titin molecules: a single globular head on a long thin rod as the M band anchoring domain? *The Journal of cell biology*, 109(5), 2177–87. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2115879&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Obermann, M., Gautel, M., Steiner, F., Van der Ven, P., Weber, K., & Furst, D. (1996). The Structure of the Sarcomeric M Band : Localization of. *The Journal of Cell Biology*, 134(6), 1441–1453.
- Ohtsuki, I., Maruyama, K., & Ebashi, S. (1986). Regulatory and Cytoskeletal Proteins of Vertebrate Skeletal Muscle. In J. T. E. and F. M. R. B. T.-A. in P. C. C.B. Anfinsen (Ed.), *Advances in protein chemistry* (Vol. Volume 38, pp. 1–67). Academic Press. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065323308605252>
- Otterbein, L., Graceffa, P., & Dominguez, R. (2001). The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5530), 708–11. doi:10.1126/science.1059700
- Pasternak, C., Wong, S., & Elson, E. (1995). Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *The Journal of cell biology*, 128(3), 355–61. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2120342&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Pate, E., Bhimani, M., Franks-Skiba, K., & Cooke, R. (1995). Reduced effect of pH on skinned rabbit psoas muscle mechanics at high temperatures: implications for fatigue. *The Journal of physiology*, 486 (Pt 3, 689–94. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1156556&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Paulin, D., & Li, Z. (2004). Desmin : a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Experimental Cell Research*, 301(1), 1–7. doi:10.1016/j.yexcr.2004.08.004
- Pearson, D., Swartz, D., & Geeves, M. (2008). Fast pressure jumps can perturb calcium and magnesium binding to troponin C F29W. *Biochemistry*, 47(46), 12146–58. doi:10.1021/bi801150w
- Perry, S. (1998). Troponin T : genetics , properties and function. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 19, 575–602.
- Piazzesi, G., Reconditi, M., Koubassova, N., Decostre, V., Linari, M., Lucii, L., & Lombardi, V. (2003). Temperature dependence of the force-generating process in single fibres from frog skeletal muscle. *The Journal of physiology*, 549(Pt 1), 93–106. doi:10.1113/jphysiol.2002.038703
- Pillen, S. (2010). Skeletal muscle ultrasound. *European Journal Translational Myology*, 1(4), 145–155. doi:10.1179/1743132811Y.0000000010
- Poole, K., Lorenz, M., Evans, G., Rosenbaum, G., Pirani, A., Craig, R., Tobacman, L., et al. (2006). A comparison of muscle thin filament models obtained from electron microscopy reconstructions and low-angle X-ray fibre diagrams from non-overlap muscle. *Journal of Structural Biology*, 155, 273–284. doi:10.1016/j.jsb.2006.02.020
- Prosser, C. (1973). *Comparative Animal Physiology* (Saunders.). Philadelphia.
- Ranatunga, B. Y. K. W., & Wylie, S. R. (1983). temperature-dependent transitions in isometric contractions of rat muscle, 87–95.
- Ranatunga, K. (1982). Temperature-Dependence of shortening velocity and rate of isometric tension development in rat skeletal muscle. *Journal of Physiology*, 329, 465–483.
- Ranatunga, K. (1998). Temperature dependence of mechanical power output in mammalian (rat) skeletal muscle. *Experimental physiology*, 83(3), 371–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9639346>
- Ranatunga, K. W. (1994). Thermal Stress and Ca-independent Contractile Activation in Mammalian Skeletal Muscle Fibers at High Temperatures Trough system, 66(May).
- Ranatunga, K. W. (1996). Endothermic Force Generation in Fast and Slow Mammalian (Rabbit) Muscle Fibers Trough system T-jump, 71(October).
- Ranatunga, K. W. (1999a). Effects of inorganic phosphate on endothermic force generation in muscle. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 266(1426), 1381–5. doi:10.1098/rspb.1999.0791

- Ranatunga, K. W. (1999b). Effects of inorganic phosphate on endothermic force generation in muscle. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 266(1426), 1381–5. doi:10.1098/rspb.1999.0791
- Ranatunga, K. W. (2010). Force and power generating mechanism(s) in active muscle as revealed from temperature perturbation studies. *The Journal of physiology*, 588(Pt 19), 3657–70. doi:10.1113/jphysiol.2010.194001
- Ranatunga, K. W., Sharpe, B., & Turnbull, B. (1987). Contractions of a human skeletal muscle at different temperatures. *The Journal of physiology*, 390, 383–95. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1192187&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Rayment, I. (1996). The structural basis of the myosin ATPase activity. *The Journal of biological chemistry*, 271(27), 15850–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8663496>
- Rayment, I., & Holden, H. (1993). Myosin subfragment-1: structure and function of a molecular motor. *Current Opinion in Structural Biology* (pp. 944–952).
- Rayment, I., Holden, H., Whittaker, M., Yohn, C., Lorenz, M., Holmes, K., & Milligan, R. (1993). Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science*, 261(5117), 58–65. Retrieved from <http://www.sciencemag.org/content/261/5117/58.abstract>
- Rayment, I., & Rypniewski, W. (1993). Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: A molecular motor. *Science*, 261(5117), 50. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=9309135678&site=ehost-live>
- Roots, H., & Ranatunga, K. W. (2008). An analysis of the temperature dependence of force, during steady shortening at different velocities, in (mammalian) fast muscle fibres. *Journal of muscle research and cell motility*, 29(1), 9–24. doi:10.1007/s10974-008-9138-9
- Schmulewitsch, J. (1868). Zur Muskelphysiologie und Physik. *Med. Jahrb.*, 15, 3–36.
- Schoenauer, R., Bertoncini, P., Machaidze, G., Aebi, U., Perriard, J., Hegner, M., & Agarkova, I. (2005). Myomesin is a Molecular Spring with Adaptable Elasticity. *Journal of molecular biology*, 349, 367–379. doi:10.1016/j.jmb.2005.03.055
- Scott, W., Stevens, J., & Binder-Macleod, S. (2001). Human skeletal muscle fiber type classifications. *Physical therapy*, 81(11), 1810–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11694174>
- Siu, B., Niimura, H., Osborne, J., Fatkin, D., Macrae, C., Solomon, S., Benson, D., et al. (1999). Familiar Dilated Cardiomyopathy Locus Maps to Chromosome 2q31. *Circulation*, 99, 1022–1026. doi:10.1161/01.CIR.99.8.1022

- Standard, D. J. M. (n.d.).
<http://chemistry.illinoisstate.edu/standard/che360/handouts/360vanthoff.pdf>.
- Takeda, S., Yamashita, A., Maeda, K., & Maéda, Y. (2003). Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca(2+)-saturated form. *Nature*, *424*(6944), 35–41. doi:10.1038/nature01780
- Timson, D. J. (2003). Fine tuning the myosin motor : the role of the essential light chain in striated muscle myosin. *Biochimie*, *85*, 639–645. doi:10.1016/S0300-9084(03)00131-7
- Timson, D. J., Trayer, H. R., & Trayer, I. P. (1998). The N-terminus of A1-type myosin essential light chains binds actin and modulates myosin motor function. *European Journal of Biochemistry*, *255*, 654–662.
- Vander, A., Luciano, D., Τσακόπουλος, Μ., & Sherman, J. (2001). *Φυσιολογία του ανθρώπου I- Μηχανισμοί της λειτουργίας του Οργανισμού*. Θεσσαλονίκη: Πασχαλίδης.
- Vinogradova, M., Stone, D., Malanina, G., Karatzaferi, C., Cooke, R., Mendelson, R., & Fletterick, R. (2005). Ca(2+)-regulated structural changes in troponin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(14), 5038–43. doi:10.1073/pnas.0408882102
- Virel, A., & Backman, L. (2004). Molecular Evolution and Structure of α-Actinin. *Molecular Biology and Evolution*, *21*(6), 1024–1031. doi:10.1093/molbev/msh094
- Wang, G., & Kawai, M. (2001). Effect of temperature on elementary steps of the cross-bridge cycle in rabbit soleus slow-twitch muscle fibres. *The Journal of physiology*, *531*(Pt 1), 219–34. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2278446&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Whipp, B., & Sargeant, A. (1999). *Physiological Determinants of Exercise Tolerance in Humans*. Portland Press.
- Wilkie, B. (1950). The relation between force and velocity in human muscle. *Journal of Physiology*, *110*, 249–280.
- Winkelmann, D., Baker, T., & Rayment, I. (1991). Three-dimensional structure of myosin subfragment-1 from electron microscopy of sectioned crystals. *The Journal of cell biology*, *114*(4), 701–13. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2289899&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Woledge, R. C., Barclay, C. J., & Curtin, N. a. (2009). Temperature change as a probe of muscle crossbridge kinetics: a review and discussion. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, *276*(1668), 2685–95. doi:10.1098/rspb.2009.0177
- Zot, H., & Potter, J. (1982). A structural role for the Ca²⁺-Mg²⁺ sites on troponin C in the regulation of muscle contraction. Preparation and properties of troponin C

depleted myofibrils. *The Journal of biological chemistry*, 257(13), 7678–83.
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6211445>

Γκίμπα-Τζιαμπίρη, Ο. (1999). *Φυσιολογία του ανθρώπου-τόμος πρώτος*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Ζυγός.

Κεραμέως-Φόρογλου, Χ. (1984). *Ατλας Ιστολογίας*. Θεσσαλονίκη: εκδόσεις Παρατηρητής.

Κλεισούρας, Β. (2004). *Εργοφυσιολογία*. Θεσσαλονίκη: ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη.

Μούγιος, Β. (1996). *Βιοχημεία της άσκησης*. Θεσσαλονίκη: ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ 1

Υπεύθυνη Δήλωση

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Αμοιρίδου Πηνελόπη (ΑΕΜ 20/09) μεταπτυχιακή φοιτήτρια του τμήματος ΤΕΦΑΑ του προγράμματος <<Άσκηση και Υγεία>> δηλώνω υπεύθυνα ότι αποδέχομαι τους παρακάτω όρους που αφορούν

(α) στα πνευματικά δικαιώματα της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας (ΜΔΕ) μου με τίτλο «*ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΣΟΜΕΤΡΙΚΗ ΤΑΣΗ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΜΥΙΚΩΝ ΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ t-Jump.*».

(β) στη διαχείριση των ερευνητικών δεδομένων που θα συλλέξω στην πορεία εκπόνησής της:

1. Τα πνευματικά δικαιώματα του τόμου της μεταπτυχιακής διατριβής που θα προκύψει θα ανήκουν σε μένα. Θα ακολουθήσω τις οδηγίες συγγραφής, εκτύπωσης και κατάθεσης αντιτύπων της διατριβής στα ανάλογα αποθετήρια (σε έντυπη ή/και σε ηλεκτρονική μορφή).

2. Η διαχείριση των δεδομένων της διατριβής ανήκει από κοινού σε εμένα και στην κύρια επιβλέπουσα καθηγήτρια.

3. Οποιαδήποτε επιστημονική δημοσίευση ή ανακοίνωση (αναρτημένη ή προφορική), ή αναφορά που προέρχεται από το υλικό/δεδομένα της εργασίας αυτής θα γίνεται με συγγραφείς εμένα τον ίδιο, την κύρια επιβλέπουσα ή/και άλλους ερευνητές (πχ μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, συνεργάτες κλπ), ανάλογα με τη συμβολή τους στην έρευνα και στη συγγραφή των ερευνητικών εργασιών.

4. Η σειρά των ονομάτων στις επιστημονικές δημοσιεύσεις ή επιστημονικές ανακοινώσεις θα αποφασίζεται από κοινού από εμένα και την κύρια επιβλέπουσα της εργασίας, πριν αρχίσει η εκπόνησή της. Η απόφαση αυτή θα πιστοποιηθεί εγγράφως μεταξύ εμού και της κύριας επιβλέπουσας.

Τέλος, δηλώνω ότι γνωρίζω τους κανόνες περί δεοντολογίας και περί λογοκλοπής και πνευματικής ιδιοκτησίας και ότι θα τους τηρώ απαρέγκλιτα καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησης και κάλυψης των εκπαιδευτικών υποχρεώσεων μου που προκύπτουν από το ΠΜΣ/τμήμα και καθ' όλη τη διάρκεια των διαδικασιών δημοσίευσης που θα προκύψουν μετά την ολοκλήρωση των σπουδών μου.

18-04-2011

Η δηλούσα

Αμοιρίδου Πηνελόπη

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

Έγκριση από την επιτροπή βιοηθικής & δεοντολογίας του ΤΕΦΑΑ
Τρικάλων

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ 3

No	10 C	15 C	cor10	cor15	No	10 C	15 C	cor10	cor15
1	108	157	19,9	29	19	104	209	19,2	38,6
2	94	155	11,9	19,7	20	91	152	16,8	28,1
3	72	134	13,3	24,8	21	186	581	34,4	107,4
4	295	495	13,5	22,6	22	434	568	80,3	105
5	115	214	5,3	9,8	23	117	263	21,6	48,6
6	81	142	23	40,3	24	143	218	66,3	100,9
7	417	618	62,7	93	25	23	93	8,2	32,9
8	165	320	30,4	59,2	26	10	99	2,9	27,8
9	249	361	46,1	66,8	27	26	106	7,3	29,7
10	110	170	20,3	31,4	28	48	86	10,8	19,5
11	125	270	15,9	34,4	29	35	86	7,9	19,4
12	234	333	29,9	42,4	30	44	96	10,1	21,8
13	288	620	53,3	114,6	31	57	122	15,9	34,1
14	81	153	14,9	28,3	32	42	83	15	29,5
15	47	92	13,3	26,1	33	56	74	12,6	16,7
16	55	106	10,1	19,6	34	32	86	7,3	19,4
17	29	47	8,2	13,3	35	25	88	5,6	19,8
18	40	84	7,4	15,5	36	30	93	8,4	26

Πίνακας 5. Τιμές ισομετρικής τάσης σε mN των απομεμβρανωμένων μυϊκών ινών όταν αυτές μεταφέρονται από τους 10 στους 15 °C και διορθωμένες (corrected) τιμές αυτών σε mN/mm².

No	10 C	20 C	cor10	cor20	No	10 C	20 C	cor10	cor20
1	137	331	40,1	96,8	14	29	60	5,3	11,1
2	198	480	10,1	24,5	15	45	124	12,7	35,2
3	190	364	28,6	54,8	16	76	186	14	34,4
4	117	219	17,6	33	17	36	97	6,6	17,9
5	261	599	48,2	110,8	18	45	97	6,8	14,6
6	187	472	23,8	60,1	19	120	272	22,1	50,3
7	111	292	20,5	54	20	262	442	33,4	56,3
8	50	142	9,2	26,3	21	18	80	3,3	14,8
9	13	36	30,7	10,2	22	17	78	3,1	14,4
10	187	310	34,5	57,3	23	44	62	8,1	11,5
11	120	196	22,1	36,2	24	38	57	7	10,5
12	82	155	23,2	44	25	71	111	20,1	31,5
13	36	82	8,1	18,6	26	42	128	7,8	23,7

Πίνακας 6. Τιμές ισομετρικής τάσης σε mN των απομεμβρανωμένων μυϊκών ινών όταν αυτές μετακινούνται από τους 10 στους 20 °C και διορθωμένες (corrected) τιμές αυτών σε mN/mm².

No	10 C	30 C	cor10	cor30	No	10 C	30 C	cor10	cor30
1	148	470	27,4	86,9	21	23	139	4,3	25,7
2	197	581	36,3	107,4	22	37	198	6,8	36,6
3	64	269	3,6	15,2	23	19	94	5,4	26,7
4	261	521	48,2	96,3	24	25	115	7,1	32,6
5	231	465	42,7	86	25	41	140	14,4	49,4
6	165	632	21,1	80,5	26	96	288	21,8	65,3
7	78	323	14,4	59,7	27	37	203	8,4	45,9
8	80	310	14,7	57,3	28	18	151	5	42,3
9	45	137	8,4	25,3	29	17	198	4	44,9
10	47	195	6	24,8	30	39	114	13,9	40,3
11	62	220	11,5	40,7	31	72	266	25,3	94,1
12	109	320	20,2	59,2	32	88	215	20	48,6
13	122	260	22,5	48,1	33	46	222	12,8	62,1
14	39	170	19,8	86,6	34	76	223	17,3	50,4
15	32	128	9,1	36,3	35	53	260	18,9	92
16	42	158	11,9	44,8	36	119	311	26,9	70,4
17	48	202	8,9	37,4	37	31	134	10,9	47,6
18	23	83	4,2	15,3	38	21	127	4,7	28,7
19	20	77	3,7	14,2	39	24	114	6,7	31,8
20	55	153	10,1	28,3	40	21	233	4,7	52,7

Πίνακας 7. Τιμές ισομετρικής τάσης σε mN των απομεμβρανωμένων μυϊκών ινών όταν αυτές μετακινούνται από τους 10 στους 30 °C και διορθωμένες (corrected) τιμές αυτών σε mN/mm²

No	10 C	35 C	cor10	cor35	No	10 C	35 C	cor10	cor35
1	56,3	167	16,5	48,8	11	70,3	265	10,6	39,9
2	98,5	405	18,2	74,9	12	112,6	362	20,8	66,9
3	132,9	393	20	59,1	13	51,6	185	14,6	52,5
4	70,3	286	13	52,9	14	170	722	21,7	92
5	132,9	371	30,1	84	15	289	952	31,6	104
6	62,5	247	11,6	45,7	16	85	381	15,7	70,5
7	39	219	5,9	33	17	136	420	25,1	77,7
8	128,2	562	23,7	103,9	18	74	240	13,7	44,4
9	86	345	15,9	63,8	19	158	539	23,8	81,1
10	75	237	13,9	43,8	20	55	173	8,3	26

Πίνακας 8. Τιμές ισομετρικής τάσης σε mN των απομεμβρανωμένων μυϊκών ινών όταν αυτές μετακινούνται από τους 10 στους 35 °C και διορθωμένες (corrected) τιμές αυτών σε mN/mm².

No	d-change 10-15 C	No	d-change 10-15 C
<i>1</i>	9,1	<i>19</i>	19,5
<i>2</i>	7,8	<i>20</i>	11,3
<i>3</i>	11,5	<i>21</i>	73
<i>4</i>	9,1	<i>22</i>	24,8
<i>5</i>	4,5	<i>23</i>	27
<i>6</i>	17,3	<i>24</i>	34,7
<i>7</i>	30,3	<i>25</i>	24,7
<i>8</i>	28,7	<i>26</i>	24,9
<i>9</i>	20,6	<i>27</i>	22,4
<i>10</i>	11,1	<i>28</i>	8,7
<i>11</i>	18,5	<i>29</i>	11,5
<i>12</i>	12,6	<i>30</i>	11,7
<i>13</i>	61,3	<i>31</i>	18,7
<i>14</i>	13,4	<i>32</i>	14,5
<i>15</i>	12,8	<i>33</i>	4,1
<i>16</i>	9,5	<i>34</i>	12
<i>17</i>	5,1	<i>35</i>	14,2
<i>18</i>	8,2	<i>36</i>	17,6

Πίνακας 9. Delta change των διορθωμένων ισομετρικών τάσεων στις θερμοκρασίες από 10 στους 15°C.

No	d-change 10-20 C	No	d-change 10-20 C
<i>1</i>	56,7	<i>14</i>	5,7
<i>2</i>	14,4	<i>15</i>	22,5
<i>3</i>	26,1	<i>16</i>	20,4
<i>4</i>	15,4	<i>17</i>	11,3
<i>5</i>	62,6	<i>18</i>	7,8
<i>6</i>	36,3	<i>19</i>	28,2
<i>7</i>	33,5	<i>20</i>	22,9
<i>8</i>	17	<i>21</i>	11,5
<i>9</i>	6,5	<i>22</i>	11,3
<i>10</i>	22,8	<i>23</i>	3,3
<i>11</i>	14,1	<i>24</i>	3,5
<i>12</i>	20,8	<i>25</i>	11,4
<i>13</i>	10,4	<i>26</i>	15,9

Πίνακας 10. Delta change των διορθωμένων ισομετρικών τάσεων στις θερμοκρασίες από 10 στους 20°C

No	d-change 10-30 C	No	d-change 10-30 C
<i>1</i>	59,5	<i>21</i>	21,5
<i>2</i>	71,1	<i>22</i>	29,8
<i>3</i>	11,6	<i>23</i>	21,3
<i>4</i>	48,2	<i>24</i>	25,5
<i>5</i>	53,3	<i>25</i>	35
<i>6</i>	59,4	<i>26</i>	43,5
<i>7</i>	45,3	<i>27</i>	37,4
<i>8</i>	42,6	<i>28</i>	37,3
<i>9</i>	17	<i>29</i>	41
<i>10</i>	18,9	<i>30</i>	26,4
<i>11</i>	29,1	<i>31</i>	68,8
<i>12</i>	39	<i>32</i>	28,6
<i>13</i>	25,6	<i>33</i>	49,3
<i>14</i>	66,8	<i>34</i>	33,1
<i>15</i>	27,3	<i>35</i>	73,2
<i>16</i>	32,9	<i>36</i>	43,5
<i>17</i>	28,5	<i>37</i>	36,7
<i>18</i>	11,1	<i>38</i>	24
<i>19</i>	10,5	<i>39</i>	25,1
<i>20</i>	18,1	<i>40</i>	48,1

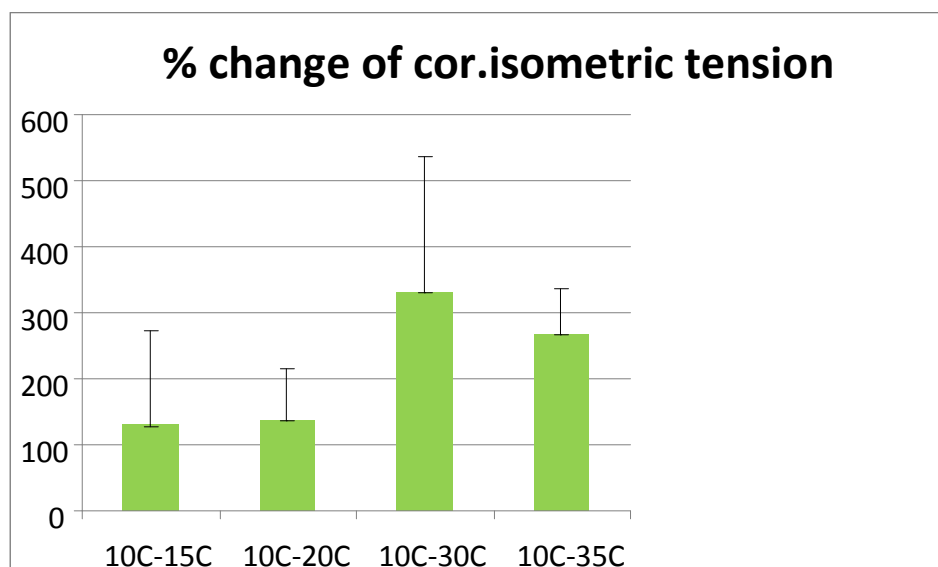
Πίνακας 11. Delta change των διορθωμένων ισομετρικών τάσεων στις θερμοκρασίες από 10 στους 30°C

No	d-change 10-35 C	No	d-change 10-35 C
<i>1</i>	32,4	<i>11</i>	29,3
<i>2</i>	56,7	<i>12</i>	46,1
<i>3</i>	39,1	<i>13</i>	37,9
<i>4</i>	39,9	<i>14</i>	70,3
<i>5</i>	53,9	<i>15</i>	72,4
<i>6</i>	34,1	<i>16</i>	54,7
<i>7</i>	27,1	<i>17</i>	52,5
<i>8</i>	80,2	<i>18</i>	30,7
<i>9</i>	17,9	<i>19</i>	57,3
<i>10</i>	29,9	<i>20</i>	17,8

Πίνακας 12. Delta change των διορθωμένων ισομετρικών τάσεων στις θερμοκρασίες από 10 στους 35°C

	10C-15C	10C-20C	10C-30C	10C-35C
% change of cor.isometric force	129	138	330	267
sd	142	78	206	69
median	94	129	288	250
N	36	26	40	20

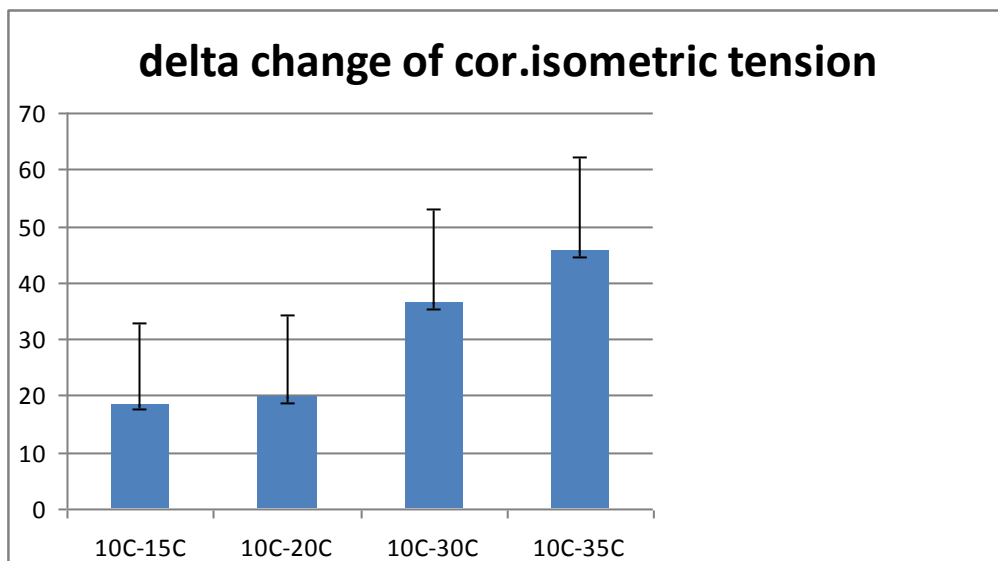
Πίνακας 13. Παρουσιάζονται οι % αύξηση της διορθωμένης ισομετρικής τάσης, το std.deviation, οι median και το πλήθος των ινών σε κάθε κατηγορία αλμάτων θερμοκρασίας.



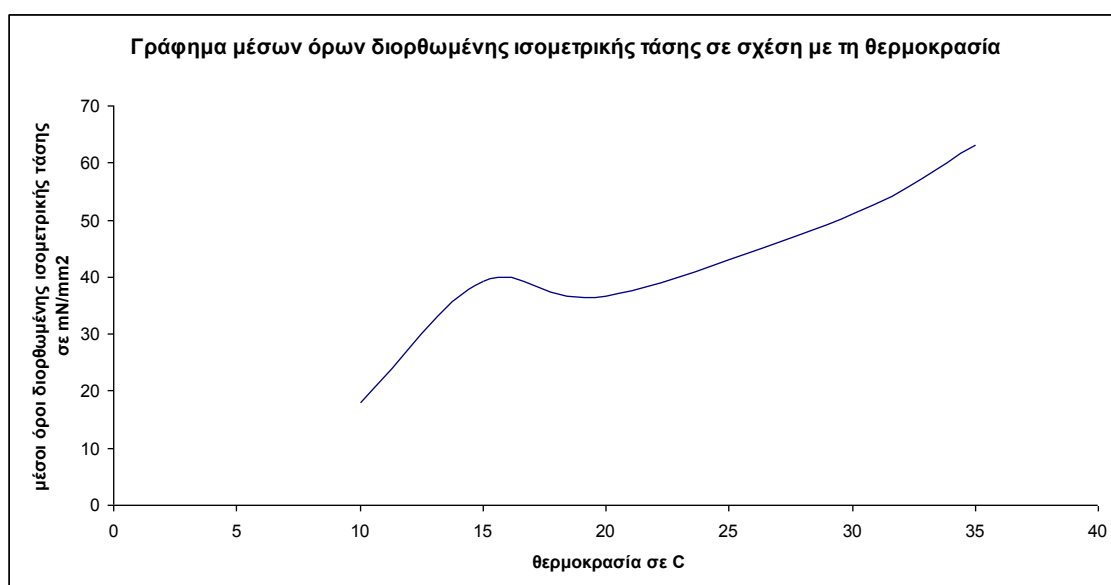
Εικόνα 37. Γράφημα εκατοστιαίας αύξησης της διορθωμένης ισομετρικής τάσης στις τέσσερις κατηγορίες αλμάτων θερμοκρασίας.

	10C-15C	10C-20C	10C-30C	10C-35C
delta change of cor.isometric tension	19	20	36	46
Sd	14	15	17	17
median	14	16	34	43
N	36	26	40	20

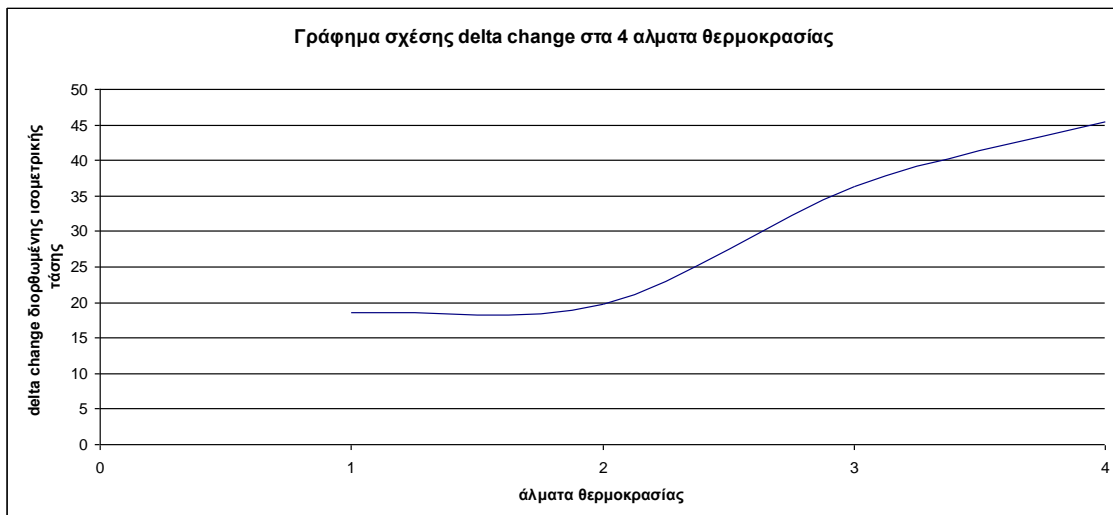
Πίνακας 13. Παρουσιάζονται οι τιμές delta change, το std deviation, median και το πλήθος των ινών σε κάθε κατηγορία αλμάτων θερμοκρασίας.



Εικόνα 38. Γράφημα των τιμών delta change στις τέσσερις κατηγορίες αλμάτων θερμοκρασίας.



Εικόνα 39. Γράφημα μέσων όρων διορθωμένης ισομετρικής τάσης σε mN/mm² σε σχέση με τη θερμοκρασία σε °C.



Εικόνα 40. Γράφημα σχέσης delta change διορθωμένης ισομετρικής τάσης στις τέσσερις διαφορετικές συνθήκες αλμάτων θερμοκρασίας (1=από 10σε15 °C, 2=από 10 σε 20 °C, 3=από 10 σε 30 °C και 4=από 10 σε 35 °C)