

胎児期の心筋細胞における収縮機構の シミュレーションに向けたモデルの統合

政策・メディア研究科 修士1年 瀧口真央

要旨

胎児期・新生仔期の心臓を構成する心筋細胞は、低酸素状態でも収縮弛緩機構を維持できる。心臓の停止は個体の死に直結することから、発生過程上のいかなる途中段階においても心臓の収縮弛緩機構が正常に維持されることが重要である。本研究では、胎児期の心筋細胞では成体とは異なる収縮タンパク質のアイソフォームを発現していることに着目し、収縮タンパク質の質的な違いを考慮できる心筋細胞モデルの構築を行った。

既存の心筋細胞の数理モデルであるKyoto modelは、発生過程上典型的な4段階（胎児初期・後期、新生仔期、成体）の膜興奮を再現することが可能だが、発生過程による収縮タンパクの変化が考慮されておらず、収縮力の定量的な評価ができない。春学期の研究では、トロポニンやミオシンの違いを表現可能なモデルの検討を行い、収縮タンパク質であるトロポニン複合体を考慮可能なモデル(S. A. Niederer et al., 2006)に着目した。本研究では、胎児期・新生仔と成体での収縮機構を比較を行なうため、Kyoto modelにNiedererら(2006)の収縮モデルを統合した。その結果、Kyoto modelと収縮を測る指標と Ca^{2+} の定義が類似する点から収縮部分のモデルの入れ替えが可能なが確認出来た。

キーワード：心室筋細胞，筋収縮，Kyoto model，ミオシン重鎖，トロポニンI

1. 序論

胎児期・新生仔期の心臓を構成する心筋細胞は、低酸素状態でも収縮弛緩機構を維持できる。哺乳類の成体の心臓は出生後まもなく再生能を失う。心臓の停止は個体の死に直結するため、発生過程上のいかなる途中段階においても心臓の収縮機構が正常に維持されることが重要である。

哺乳類の心臓は2心房2心室の構造を持つ。しかし、発生初期から2心房2心室の構造をとるわけではない。心臓は個体発生の過程で、形だけでなく蛋白質の蓄積量の変化(大石, 2008)や、心筋細胞において、胎児と成体では異なるアイソフォームを持ち心臓発生の各段階で変化をすることが分かっている。心筋細胞でのアイソフォームの変化はミオシン重鎖(Myosin heavy chain:MHC)とトロポニンI(Troponin I:TnI)に見られる。ラットの心室のMHCでは、生後5日頃に β MHCから α MHCへ、TnIでは、骨格筋型トロポニンI(slow skeletal TnI: ssTnI)から、心筋型トロポニンI(cardiac TnI: cTnI)へと切り替わる(Warren *et al.*, 2004)。MHCのアイソザイムの割合の変化は、筋収縮時のATPase活性や筋収縮の速度に変化を及ぼし、TnIにおいては Ca^{2+} の感受性に差を生じさせることが分かっている。こうした発生過程によるアイソフォームの変化が胎児期・新生仔期と成体間において心拍数やエネルギー効率に違いを生む。(福田, 2001)

心臓の駆動力は心筋細胞の収縮により生じる。筋収縮は、基本単位となるサルコメアを構成するアクチンフィラメントとミオシンフィラメントが互いに滑り込む事で起こる。ATPase活性を持つMHCがアクチンフィラメントに結合し筋収縮のエネルギーを生む。TnIは、トロポニンC(TnC)とトロポニンT(TnT)と共に複合体としてアクチンフィラメントの表面に存在し、静止時にはアクチンとミオシンの結合を妨げる役割を果たす。

本研究では、胎児期・新生仔と成体での収縮機構を比較を行なうため、Kyoto modelにNiedererら(2006)の収縮モデルを統合した。その結果、Kyoto modelと収縮を測る指標と Ca^{2+} の定義が類似する点から収縮部分のモデルの入れ替えが可能なが確認出来た。胎児期の心筋細胞での収縮機構のシミュレーションが出来れば、低酸素状態における心筋細胞の振る舞いを予測することが可能となる。また、心肥大などの疾病は胎児期に発現していたアイソフォームを再発現する事も知られている。再生能を持たない成体の心臓において、心筋梗塞などの疾病により酸素の供給が困難な状況に陥った時に心臓の収縮を維持するための手がかりとなる予測データを得る事が可能であると考えられる。

表1:成長過程における収縮タンパク質のアイソフォームの違いとアイソフォームの違いによる影響

	胎児期	新生仔期	成体期	アイソフォームによる影響
ミオシン重鎖(MHC)	β 型 > α 型	α 型 > β 型	α 型	ATPase活性, 筋収縮速度
トロポニンI	ssTnI	ssTnI > cTnI	cTnI	Ca^{2+} 感受性

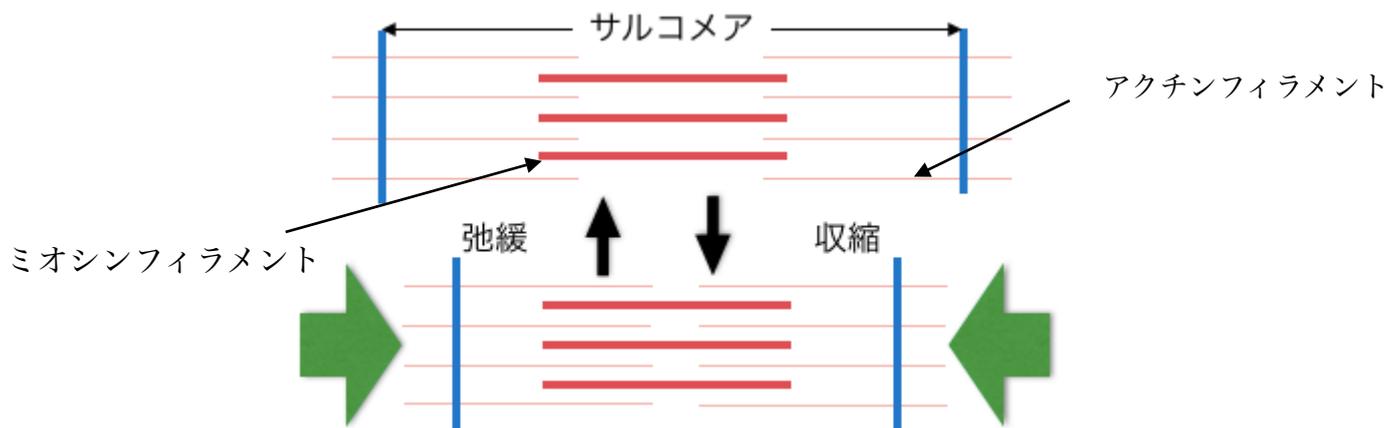


図1:筋肉の収縮・弛緩

心筋の収縮は交互に並ぶ細いアクチンフィラメントと太いミオシンフィラメントの2種類の収縮蛋白質がATPをエネルギー源としてクロスブリッジを形成し滑り込む事によって起こる。クロスブリッジの形成はアクチンフィラメント上のトロポニンCに Ca^{2+} が結合し、トロポニンの複合体とトロポミオシンの立体構造に変異が生じアクチンにミオシンの結合可能な空間が生まれる事で起こる。

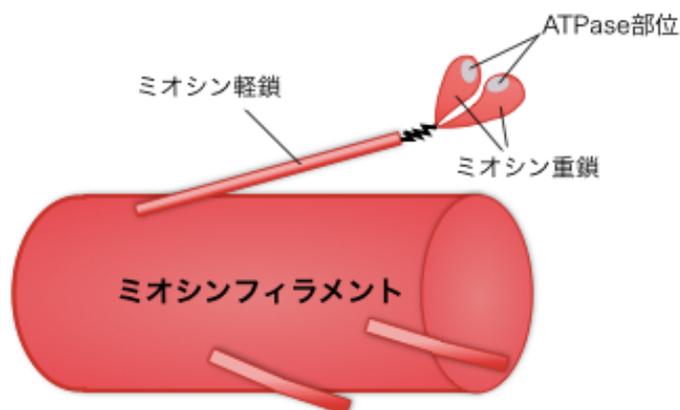


図2:ミオシンフィラメント

ミオシン重鎖(MHC)はATPase部位を持つ。アクチンフィラメントと結合しクロスブリッジを形成する事で滑り込み、筋収縮が起こる。

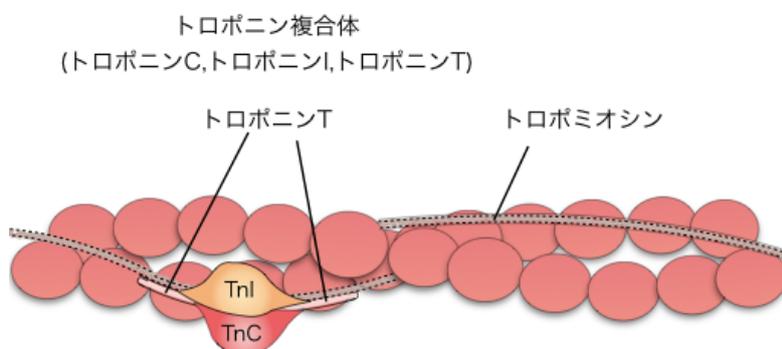


図3:アクチンフィラメントとトロポニン複合体とトロポミオシン

アクチン表面にトロポミオシンが巻き付くように、トロポニンは複合体で等間隔に存在する。静止時はTnIによってMHCとの結合が阻害、TnTはトロポミオシンとTnI,TnCを繋ぐ役割をする。TnCは Ca^{2+} 結合部位を持ち、結合が起こる事で、トロポミオシン、トロポニン複合体の立体構造に変異を生じさせトロポミオシンのずれ込み、ミオシンとの結合部位が作られる。

2. 対象モデルと方法

2.1 Kyoto model (Kuzumoto *et al.*, 2007)

先端生命科学研究会で行われてきた先行研究では、モルモット心室筋細胞の活動電位とサルコメア長の時系列変化をコンピュータ上で再現できる包括的心筋細胞モデル (Kyoto model) が用いられてきた。Kyoto model (Kuzumoto *et al.*, 2007)は、ATP産生系、 Ca^{2+} 結合タンパク質、筋収縮モデル、細胞膜電流系、筋小胞体等を細胞モデルで構成している。また、発生過程上典型的な4段階 (胎児初期・後期、新生仔期、成体) の膜興奮を再現する事が可能である (Itoh *et al.*, 2007)。しかし収縮部分のモデル (Negroni and Lascano *et al.*, 1996)においては、発生過程による収縮タンパクの変化が考慮されておらず、胎児期の心筋細胞における収縮力の定量的な評価が出来ない。

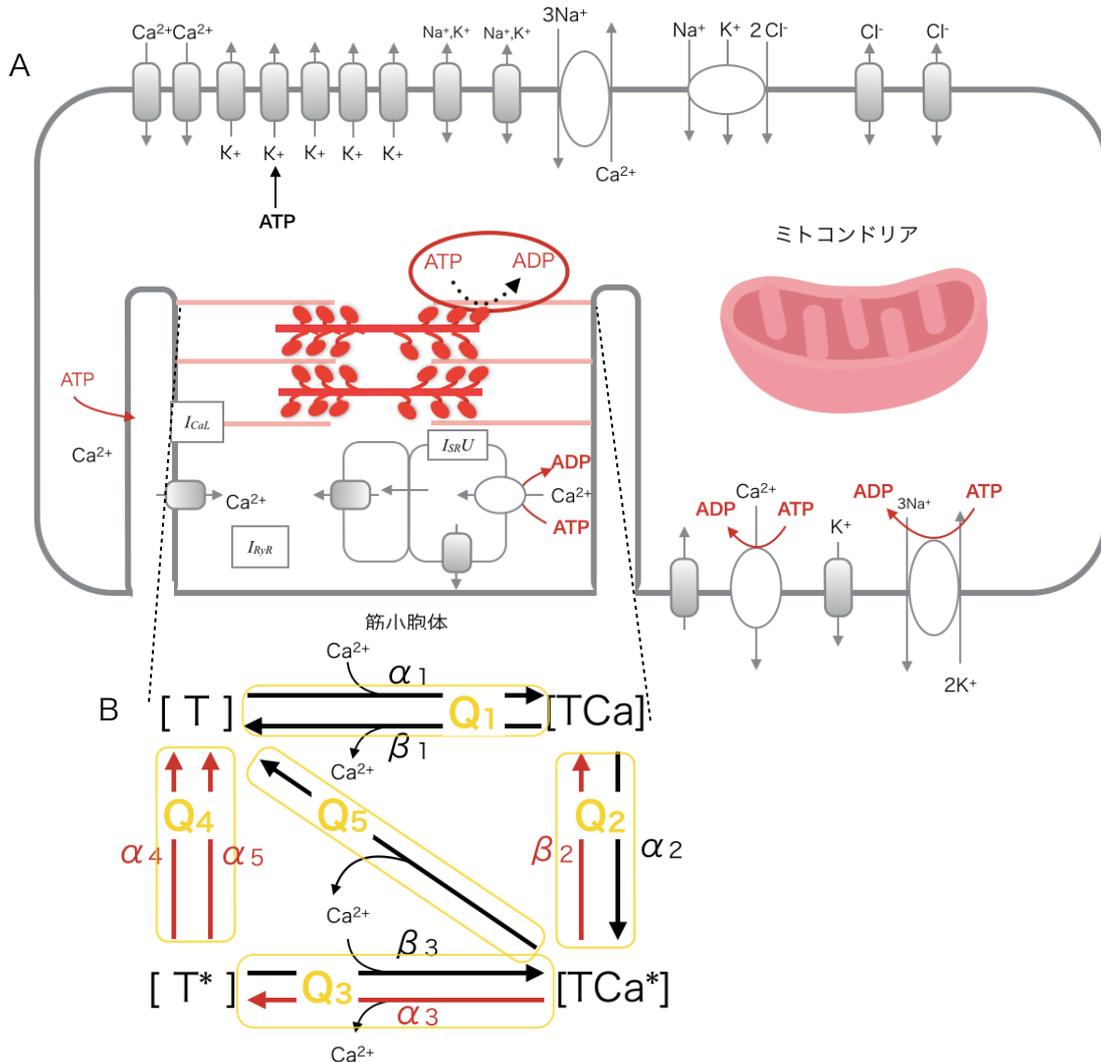


図4:Kyoto model (Kuzumoto *et al.*, 2007)(A)とNegroni- Lascanoモデル(Negroni and Lascano *et al.*, 1996)(B) Kyoto modelは包括的心筋細胞モデルである。Negroni-Lascano modelは、Kyoto modelの収縮機構のモデルとして採用されており、筋収縮を図4のように4遷移状態での表現を行っている。トロポニンと Ca^{2+} が結合している状態(TCa)と結合していない状態(T)、およびアクチンフィラメントとミオシンフィラメントの結合を妨げていたトロポミオシンのずれ込みによって2つの結合によってミオシン頭部の相互作用が起きている状態(TCaCB)、相互作用が起きているか状態(TCB)という4つの状態で表している。それぞれの状態は $\alpha \cdot \beta$ で表された変化速度に基づき遷移する。赤線で示してある部分では、ミオシンATPaseによるATP消費の考慮も行われている。

そのためKyoto modelに加えるトロポニンやミオシンの違いが表現可能な収縮機構のモデルの検討を行い、収縮タンパク質であるトロポニン複合体を考慮可能なモデルとしてN model (Niederer *et al.*, 2006)に着目した。本研究では、胎児期・新生仔期と成体での収縮機構を比較するため、Kyoto modelにN modelの収縮モデルを統合した。

2.2 Niederer model (Niederer *et al.*, 2006)

このモデルは、ラットの成体の心室筋細胞の能動収縮モデルである。トロポニンCへのCa²⁺の結合、トロポミオシンやクロスブリッジ動態を表現している。モデルのアウトプットとして、細胞内Ca²⁺と等尺性収縮での張力が得られる。また、成体のラットの心内膜心室筋細胞の心筋細胞電気機能の包括的なモデル(Niederer & Smith, 2007)に電気生理学のモデル(Pandit *et al.*, 2001)、Ca²⁺の動態モデル(Hinch *et al.*, 2004)、筋収縮モデル(Niederer *et al.*, 2006)として他のモデルに組み込まれたものも存在する(Terkildsen *et al.*, 2008)。以降、NiedererのモデルをN model、結合したモデルをKyoto_N modelと記す。Kyoto modelの収縮機構と比較して詳細であることに加えて、Kyoto modelと収縮を測る指標とCa²⁺の定義が類似する点から収縮部分のモデルの入れ替えが可能と判断した。

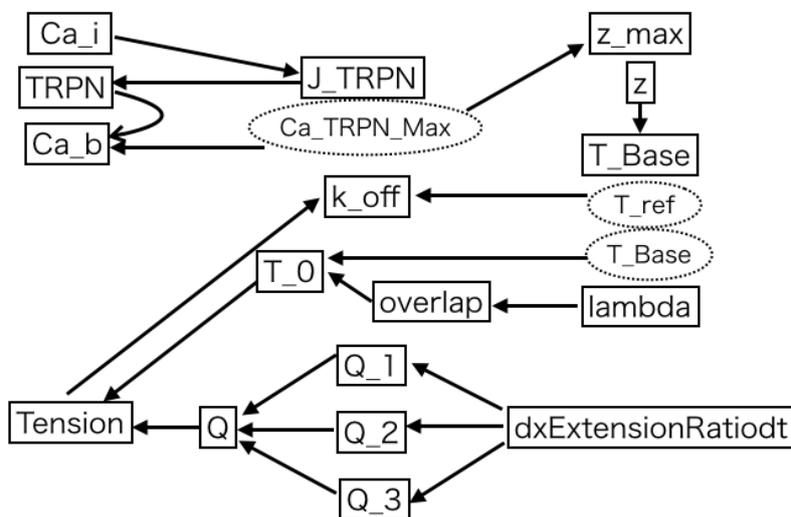


図5:Niedererのモデル(Niederer *et al.*, 2006)

TnCにCa²⁺結合・トロポミオシン・クロスブリッジによる動態とCa²⁺感受性、筋長、速度の関係が表されており、その中でも、細胞内Ca²⁺濃度と等尺性収縮での張力が結果として出てくる。

2.3 シミュレーション

シミュレーターとして、汎用細胞シミュレーション環境E-Cell Simulation Environment (SE) version 3(Takahashi *et al.*, 2004)とOpenCellを使用した。Kyoto modelのシミュレーション方法としては、モデルによる依存性をなくすため、600秒間無刺激でのシミュレーションを行った後に、-8000pAの刺激を加えて600秒のシミュレーションを行った。そして、同様の刺激を加えた状態で1秒間のシミュレーションを行った。刺激頻度は、1.0HZ、2.5Hzのシミュレーションを行い、筋収縮に關与する張力での結果と筋収縮に關与するCa²⁺濃度を観察した。筋収縮のATP消費の検討においては、ATP消費の式を用いて観察と議論を行った。OpenCellでは、CellML上にアップロードされているモデルをダウンロードし、条件を変更せずシミュレーションを行なった。

2.3.1 モデルの統合

N modelはCellMLによる形式であるため、モデルの統合を行なう為にはKyoto modelと同じeml(E-Cell Model description Language)形式への変換が必要である。CellMLによって表現されているN modelの式と変換を行なったemlによるものと異なる部分を編集し変換を行なった。

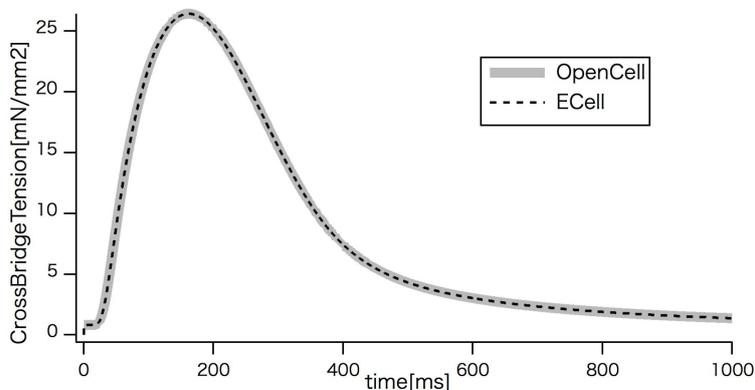


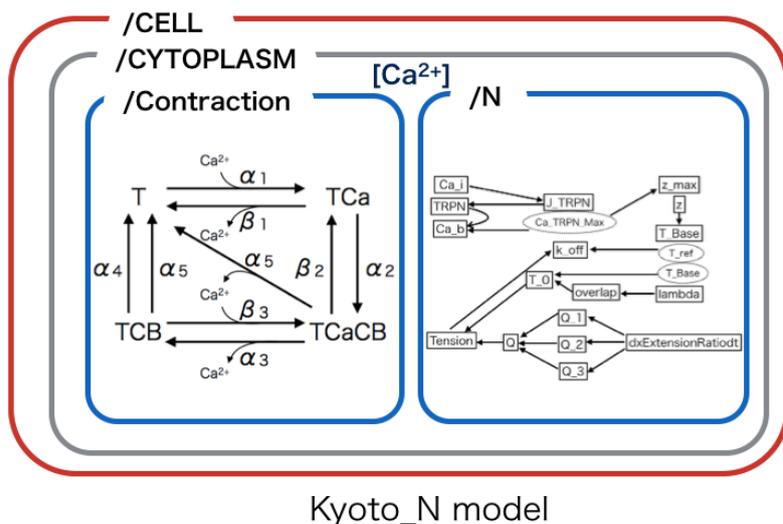
図6:N modelをOpenCell, E-Cell上でシミュレーションした結果

CellMLとemlいずれの形式の結果も一致した。1.0Hzで1秒間のシミュレーションでクロスブリッジにかかる張力を見ている。横軸は時間でms, 縦軸はクロスブリッジにかかる張力mN/mm²である。

図6からE-Cellシステム上でシミュレーション可能な形式に変換が出来たといえる。

2.3.2 Kyoto modelとN modelを統合

Kyoto model内でのCaとN modelでのCa_iというパラメーターは、いずれも細胞内の遊離Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]) を示している。N modelのCa_iにKyoto modelのCaを参照する事で、Kyoto modelとN modelの結合を行なった。Kyoto modelとN modelを1つのファイルに統合し、N modelの[Ca²⁺]が記述されている部分をKyoto modelの[Ca²⁺]を参照するように書き変えて統合を行なった。統合により図7のようなモデルの構造にし、N modelの張力で測る事が可能になった。



Kyoto_N model

図7:Kyoto_N modelの構造

/CYTOPLASMの中にはKyoto modelの収縮機構として採用されていたNegroni- Lascano model(Negroni and Lascano *et al.*, 1996)が存在する。さらにN model(Niederer *et al.*, 2006)を加えた。両モデルに共通して存在する[Ca²⁺]を介してKyoto modelとN modelの統合を行なった。

単位については、N modelはmMオーダーでKyoto modelはMオーダーのためCa²⁺濃度の後に1000倍を加えた。また、N modelに含まれるpiecewiseを使った条件式はE-Cell上でのシミュレーションに不向きなため書き換えた。Kyoto modelのL型Ca²⁺チャンネルのコンダクタンスを2倍、1倍、0.5倍に変化をさせ、1.0Hzで1秒間のシミュレーションを行なった。

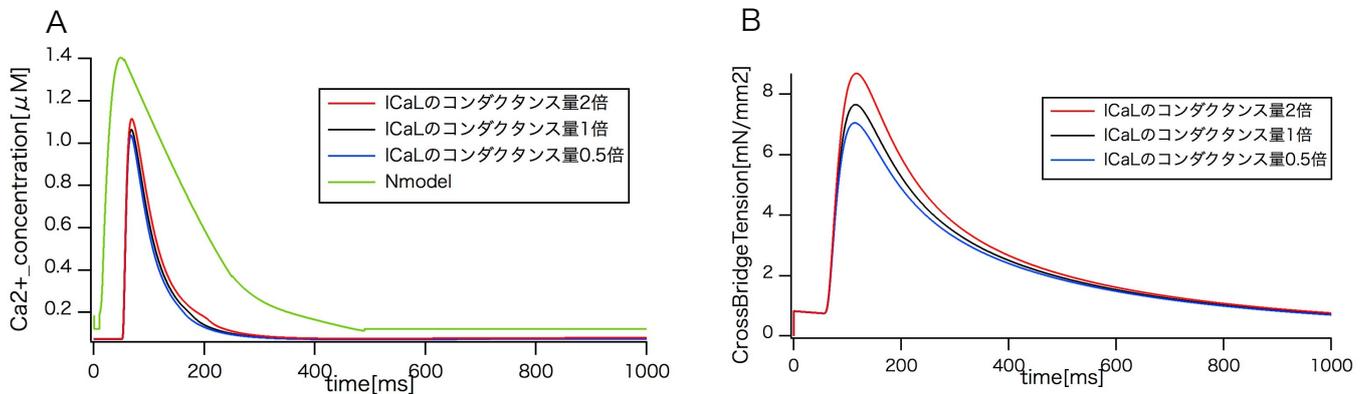


図8: I_{CaL}のコンダクタンスを2倍1倍0.5倍に変化させたときのKyoto_N modelシミュレーションの結果
Aは、Kyoto_N modelのL型Ca²⁺チャンネルのコンダクタンスを2倍、1倍、0.5倍に変化をさせたときのCa²⁺濃度である。また、N modelでのCa²⁺濃度の記録として緑の線で示した。Bは、L型Ca²⁺チャンネルのコンダクタンスを2倍、1倍、0.5倍に変化をさせた時の張力である。N modelのCa²⁺濃度は統合されていないため、1倍の値しか記録されていない。刺激頻度は1.0Hzで1秒のシミュレーションを行なった。いずれの図も横軸は時間でms、左側の上下の図は、Ca²⁺の濃度でmM、右図の縦軸はクロスブリッジにかかる張力mN/mmである。

Kyoto modelのL型Ca²⁺チャンネルのコンダクタンスを2倍、1倍、0.5倍に変化をさせたに伴い、N modelでの収縮を測る指標であるクロスブリッジにかかる張力がアウトプットとして得られた。張力も同様に2倍、1倍、0.5倍で異なる結果が得られているためKyoto_N modelの統合が出来ていることが分かる。Aではこのシミュレーション時のNmodelのCa²⁺濃度を記録としてとった。上共にCa²⁺濃度のスケールが同じであり、単位の変換が正しく行なわれた事を示す。

2.3.3 Kyoto modelと筋収縮の様式を合わせる

Kyoto modelと統合を行なったKyoto_N modelの両モデルは収縮を測る指標が張力という点で一致しているにも関わらず、図9のように張力のピークの値が異なる。これは、収縮を測る方法が異なることや動物種の違いが原因として考えられる。まずは収縮の様式によるモデル間の差をなくすため、Kyoto modelを等尺性収縮に変更しKyoto_N modelと比較を行なった。Kyoto model, Kyoto_N modelは等張性収縮であり、N modelは等尺性収縮という異なる収縮の測定法を用いている。等張性収縮とは、張力が一定の時のサルコメア長の変化を測っているもので、等尺性収縮は、サルコメア長に変化がない状態で発生する張力を測るものである。

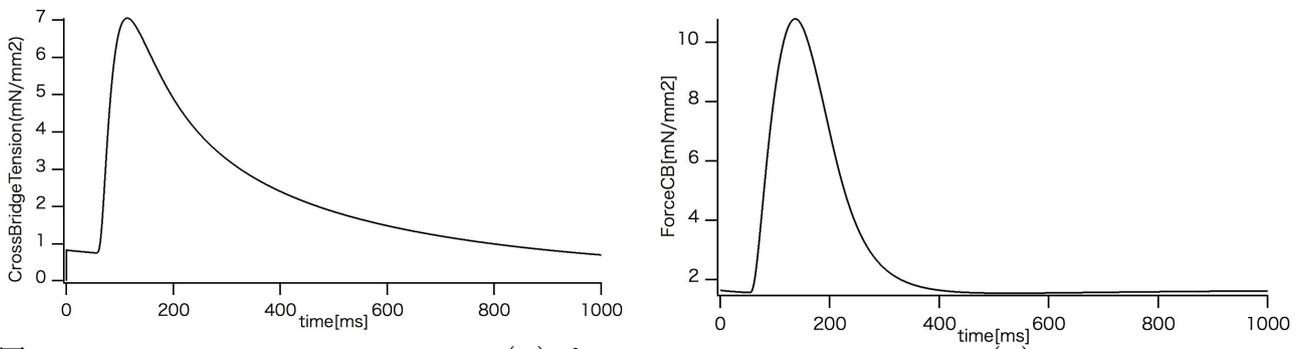


図9:Kyoto_N modelのCrossBridgeTension (A) と Kyoto modelのForceCrossBridge (B)

Kyoto_N modelは等尺性収縮であり, Kyoto modelは等張性収縮である. 刺激頻度は, 1.0Hzで1秒間のシミュレーションを行なった. 横軸は時間でms, 縦軸はクロスブリッジにかかる張力mN/mm²である.

Kyoto modelの収縮様式を等張性収縮から等尺性収縮に変更するために, 半サルコメア長を全て固定し変化が加わらないようにした. 図11の右図が等尺性収縮に変更した結果である. 今までの等張性収縮は, 左図である. 半サルコメア長(half Sarcomere Length:hSL)が変化している. 右図では, 一定で等尺になっているといえる.

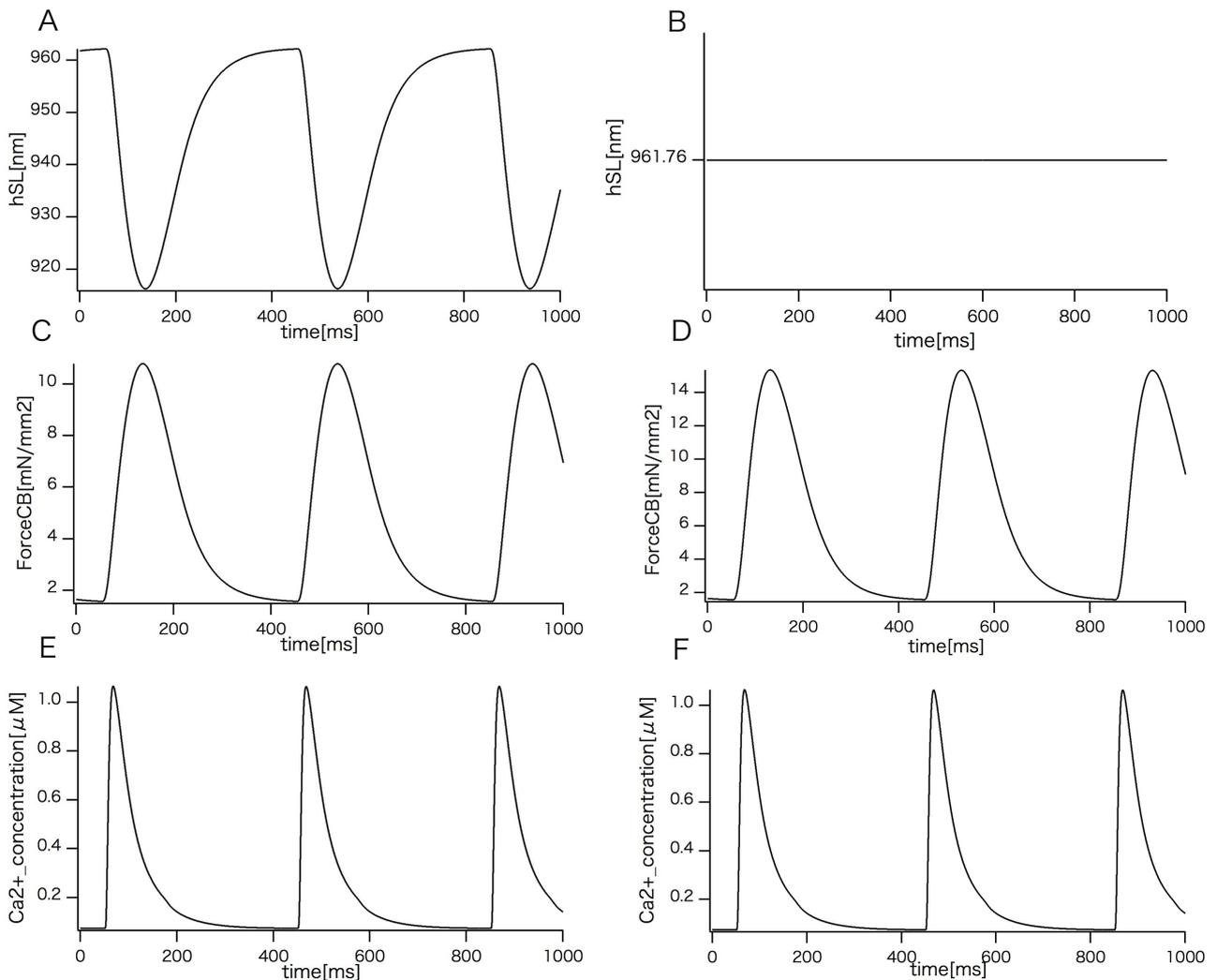


図10:Kyoto model等張性収縮(A,C,E), 等尺性収縮(B,D,F)でシミュレーションを行なった結果

等張性収縮から等尺性収縮に変更したことでBでは半サルコメア長(half Sarcomere Length:hSL)が等尺になっていることから確認が出来る. 刺激頻度2.5Hzで1秒間のシミュレーションを行なった. 横軸は時間ms, ABの縦軸はhSL,CDはクロスブリッジにかかる張力, EFはCa²⁺濃度である. それぞれ単位は, nm, mN/mm², μMである.

3. 結果と議論

3.1 Kyoto_N modelのパラメータの決定

Kyoto modelとN modelの筋収縮の測定方法を等尺性収縮に統一した。これによりKyoto_N modelとKyoto model間での筋収縮の結果も議論が出来る。Ca²⁺の感受性においてKyoto_N modelに妥当であるパラメータを探した。図12のように、Kyoto_N modelのCa²⁺の感受性を1.0~2.0倍に0.1の間隔で変化をさせシミュレーションを行いカラフルな線で図示した。図中の黒い線は、で行なった等尺性収縮のKyoto modelのシミュレーション結果である。Kyoto_N modelのCa²⁺の感受性が1.5倍時にKyoto modelの張力と近くなり、Kyoto_N modelはモデルとして最も整合性がとれていると言える状態である。また、Ca²⁺感受性を変更した時に異なるアウトプットが得られていることからKyoto_N modelがKyoto modelとの統合が行なえていることが確認できた。

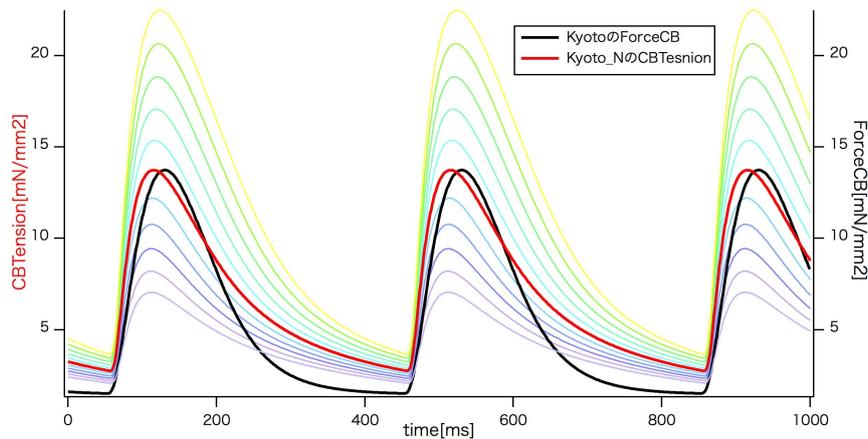


図11:Kyoto_N modelのCa感受性を1.0~2.0倍まで0.1間隔で変更しシミュレーション(カラフルな線)を行ないKyoto modelの張力(黒線)と比較した結果

赤線が1.5倍に位置し、Kyoto_N modelにおいてCa感受性が1.5倍のパラメータの時に黒線と近くなる。刺激頻度は、2.5Hzで1秒間のシミュレーションを行なった。横軸は時間でms、縦軸は張力mN/mm²を示す。

3.2 ATP消費の式をKyoto_N modelに加えるための検討

N modelは筋収縮によるATP消費が考慮されていないため、Kyoto_N modelも考慮されていない。ATP消費の考慮が可能となれば、胎児期・新生仔期や成体での筋収縮によるエネルギー消費の比較が可能になる。そのため、Kyoto modelに用いられているATP消費の式を参考にN modelのどの部分に式を加えるかの検討を行なっている。

Kyoto modelで用いられていたNL modelでは、遷移状態のうちクロスブリッジの解離を繋ぐ反応速度qa2, qd, qd1, qd2で測る。単位はmol/sである。qa2は、トロポニンにCa²⁺が結合しクロスブリッジを形成している状態(TCa*)からクロスブリッジが解離する(TCa)時の反応速度である。qd2は、TCa*の状態からCa²⁺、クロスブリッジの解離したとき(T*)の反応速度を表している。qdは、クロスブリッジの形成がされたままCa²⁺の解離が起こった状態(T*)からのクロスブリッジの解離(T)の反応速度を示す。qd1もまた同様のT*状態からTへの反応速度であるがサルコメアの長さが変わる時に解離するクロスブリッジを示している。以上4つのクロスブリッジからの解離のポイントで、モデル内ではATP消費が起こるように定義されているため、筋収縮によるATP消費はqa, qd2, qd, qd1の和を観察する。シミュレーションを行なったものが図12である。

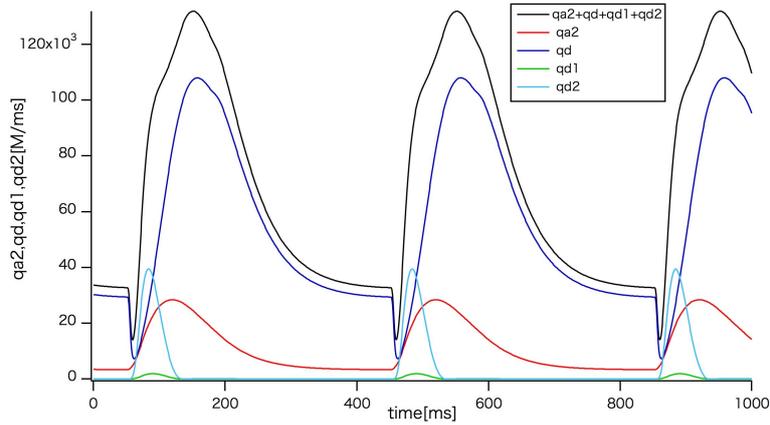


図12:Kyoto modelで考慮されているATP消費

遷移状態のうちクロスブリッジの解離を繋ぐ反応速度qa2, qd, qd1, qd2をシミュレーションしたもので、その際にATPの消費が起こっている。これらの和となる黒線が筋収縮によるATP消費となる。刺激頻度は2.5Hzで1秒間のシミュレーションを行なった。縦軸は時間ms, 横軸は反応速度mol/sを示す。

Kyoto_N modelの中に含まれている速度の式にKyoto modelで用いられていた筋収縮時のATP消費の式を参考に加える。現在着目しているのが、トロポニンの反応速度を表す式(1)である。

$$J_TRPN = (Ca_TRPN_Max - TRPN) * k_off - (Ca_i * TRPN * K_on) \quad (1)$$

この式は、左辺でCa²⁺とTRPNの結合が最大に起きた状態の濃度(Ca_TRPN_Max [mM])から結合の起きていないトロポニンの濃度(TRPN [mM])を引く事で、結合が起きている濃度が求められる。そこに解離速度定数(k_off [/ms])がかけられているため、そこから解離が起こるTRPNの反応速度が求められる。右辺では遊離Ca²⁺濃度(Ca_i [mM])にトロポニンの濃度(TRPN[mM])と結合速度(k_on [/ms*mM])をかけている。解離が起きたTRPNのから新たに結合したTRPNの反応速度を引き、TRPNの反応速度(J_TRPN [mM/ms])が求められている式である。J_TRPNと式の左式のみ、右式のみシミュレーションを行なった(図13)。

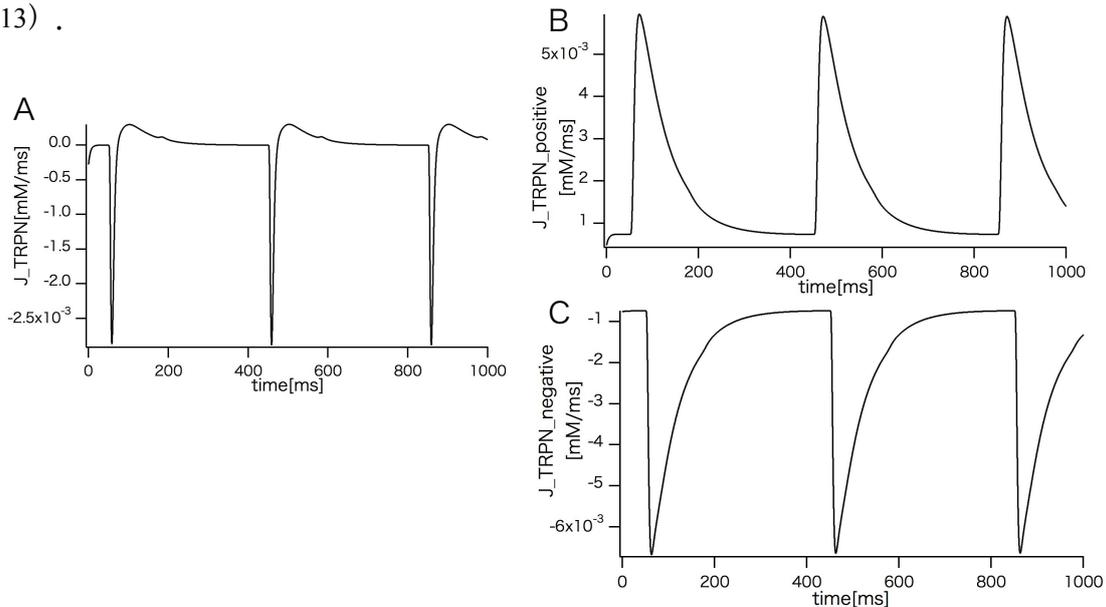


図13 :Kyoto_N modelのJ_TRPN(A), J_TRPNの右式(B), J_TRPNの左式(C)の結果

BとCの図の和をとったものがAの結果となっている。刺激頻度2.5Hzで1秒間のシミュレーションを行なった。横軸は時間ms, 縦軸は反応速度を示すmM/msである。

4. 今後の展望

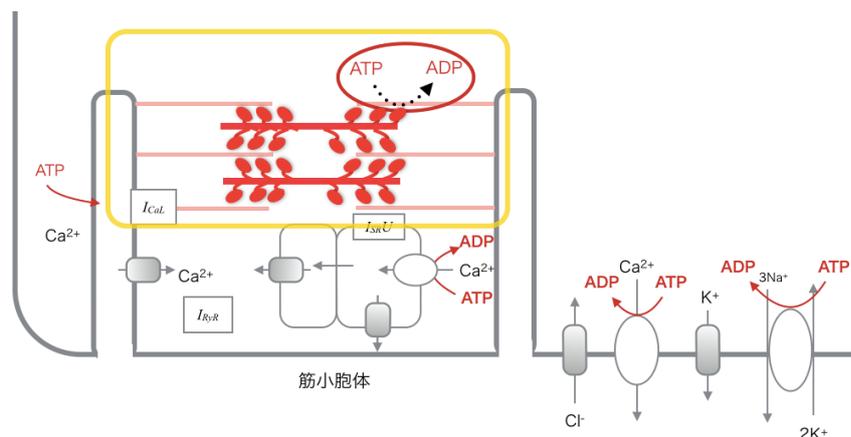


図14 :Kyoto_N modelの構造

黄色い枠がN model, それ以外はKyoto modelであり統合がされている。赤い枠で囲んでいる収縮時のATP消費についてはまだ考慮されておらず今後付け加えたい。

図14は、Kyoto_N modelである。今後は、3.2の方針で赤い丸い枠で囲んでいる筋収縮時のATP消費を考慮するためにモデルを拡張する。図12の黒線は、筋収縮時のATP消費を示す。図12の波形は、J_TRPNの左式にあたる図13のBの波形に類似している。このBの波線の面積を図12で得られているATP消費の波線からなる面積と一致させることでATP消費を考慮した妥当なモデルに近づくと考える。まずは、単位や指数を両モデルで合わせ、面積を測るため積分のシミュレーション行なう。そして、式(1)を改変しATP消費の考慮を行なう。400秒までの面積をそろえることで一拍動あたりのATP消費を定量的に議論することを目指す。

その後は、実験データから胎児期のパラメータを用いて胎児期モデルに変更する。(Naoki Agata et al.,1994)や(Martina K.,2006)の論文等を参照の上パラメーターの設定を行なう。例を挙げると、トロポニンIのアイソフォームの違いを表現するため、Ca感受性が異なる割合を実験データを参照に変更する。また、割合として記述されるもの場合は、Kyoto_N modelは成体の状態を表すモデルのためその値からその割合だけ増減を加える事で定義する。

謝辞

本研究を進めるにあたり、アドバイザーの佐野ひとみさんにはお世話になりました。今年度はバイオキャンプに参加していたため毎週のミーティングは遠隔によるものでしたが、距離を感じさせないくらいに手厚いご指導、ご助言を頂きました。内藤泰宏准教授には研究を進めるうえで必要な知識を丁寧なご指導を頂きました。また、E-Cellグループの皆様には、ミーティングや勉強会だけでなく多くのアドバイスを頂きました。スクリプトの動かし方など習得がおそく、多くの質問をしてしまいましたが、いつも優しく指導をしてくださいました。また、バイオキャンパーや鶴岡在住生の方々にはバイオキャンプの半期間、学業だけでなく私生活においても大変お世話になりました。慣れない生活を楽しく過ごす事が出来ました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。本当にありがとうございました。最後にこのような恵まれた研究の機会と環境を与えてくださった富田勝教授に心から感謝致します。

参考文献

- 大石正道, (2008) プロテオミクスからみた脊椎動物心臓の進化—心房と心室の比較を中心に—比較内分泌学. Vol. **34** No. 130
- 福田恵一, (2001) 骨髄間葉系幹細胞を用いた心筋細胞の再生. 心臓. Vol. **33** No.12
- Martina, K., Thomas, K. and Wolfgang, A.L. (2006) Developmental changes in passive stiffness and myofilament Ca^{2+} sensitivity due to titin and troponin-I isoform switching are not critically triggered by birth Am J Physiol Heart Circ Physiol **291** 496-506
- Warren, C.M., Paul, R. Krzesinski et al. (2004) Titin isoform changes in rat myocardium during development Mechanisms of Development **121** 1301–1312
- Kuzumoto, M.S., Takeuchi, A., Nakai, H., Oka, C., Noma, A. and S. Matsuoka. (2008) Simulation analysis of intracellular Na^+ and Cl^- homeostasis during β_1 -adrenergic stimulation of cardiac myocyte Progress in Biophysics and Molecular Biology **96** 171–186
- Itoh, H., Y. Naito. and M. Tomita. (2007) Simulation of developmental changes in action potentials with ventricular cell models. Syst Synth Biol, **1**(1): 11-23.
- Negrone, J.A., Lascano, E.C. (1996) A Cardiac Muscle Model Relating Sarcomere Dynamics to Calcium Kinetics J Mol Cell Cardiol **28**, 915–929
- 皿井伸明, (2006) simBio心筋細胞〈Kyotoモデル〉 コンピュータ・シミュレーション
- Terkildsen, J.R., Niederer, S., Crampin, E.J., Hunter, P. and Smith, N.P. (2008) Using Physiome standards to couple cellular functions for rat cardiac excitation–contraction *Exp Physiol* **93.7** pp 919–929
- Takahashi, K., Kaizu, K., Hu, B. and Tomita, M. (2004) A multi-algorithm, multi-timescale method for cell simulation. *Bioinformatics*, **20**, 4:538-46.
- Niederer, S.A., Hunter, P.J., and Smith, N.P. (2006) Quantitative Analysis of Cardiac Myocyte Relaxation: A Simulation Study Biophysical Journal Volume **90** 1697–1722
- Shorten, P.R., Callaghan, P.O., Davidson, J.B. and Soboleva, T.K. (2007) A mathematical model of fatigue in skeletal muscle force contraction, J muscle Res Cell Motil **28**:293-313
- Razumova, M.V., Bukatina, A.E. and Campbell, K.B. (2000) Different Myofilament Nearest-Neighbor Interactions Have Distinctive Effects on Contractile Behavior, Biophysical Journal Volume **78** 3120-3137
- Matsuoka, S., Sarai, N., Jo, H., Noma, A. (2004) Simulation of ATP metabolism in cardiac excitation-contraction coupling. Prog. Biophys. Mol. Biol. **85**, 279–299.
- Agata, N., Tanaka, H., Shigenobu, K. (1994) Inotropic effects of ryanodine and nifedipine on fetal, neonatal and adult guinea-pig myocardium. European Journal of Pharmacology, **260**(1), 47–55.