

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SEDE DI CESENA

SECONDA FACOLTA' DI INGEGNERIA CON SEDE A CESENA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

TITOLO DELL'ELABORATO:

STUDIO MODELLISTICO DEL CONSUMO DI OSSIGENO DURANTE
L'ESERCIZIO FISICO.

Elaborato in:

Bioingegneria L

Relatore

Gianni Gnudi

.....

Presentata da

Benedetta Tarlazzi

.....

Sessione Terza

Anno Accademico 2010/2011

Indice

GLOSSARIO

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1: METABOLISMO ED ESERCIZIO FISICO

- 1.1 Che cos'è l'Adenosina trifosfato (ATP)
- 1.2 Produzione di energia nel muscolo
 - 1.2a La glicolisi e il ciclo dell'acido citrico
- 1.3 Il consumo di ossigeno (VO_2)
- 1.4 Fibre muscolari

CAPITOLO 2: IL MODELLO

- 2.1 Lo scopo del modello
- 2.2 Tecniche per misurare il consumo di ossigeno polmonare (VO_{2p}) e il consumo di ossigeno muscolare (VO_{2m})

CAPITOLO 3: IL MODELLO MATEMATICO

- 3.1 Sviluppi del modello
- 3.2 Bilancio del trasporto di massa
- 3.3 Bilancio della reazione metabolica
- 3.4 Funzioni dipendenti dall'intensità dell'esercizio
- 3.5 Simulazione del modello

CAPITOLO 4: STIMA DEI PARAMETRI

- 4.1 Valutazione della costante di velocità della ATPase, k_{ATPase}^j , con l'ipotesi di stato stazionario
- 4.2 Valutazione del coefficiente di permeabilità, PS^R , con l'ipotesi di stato stazionario
- 4.3 Valutazione della variazione del flusso sanguigno muscolare, ΔQ_m^j , e della velocità massima della fosforilazione ossidativa, V_{max}^j , tramite una stima ottimale.

CAPITOLO 5: RISULTATI

- **5.1 Rappresentazione grafica dell'andamento nel tempo della saturazione dell'ossigeno**
- **5.2 Rappresentazione grafica dell'assorbimento di ossigeno polmonare e dell'utilizzo di ossigeno muscolare**
- **5.3 Indipendenza di V_{\max}^j da j e dipendenza di ΔQ_m^j da j**
- **5.4 Rappresentazione grafica dei flussi metabolici dell'ATPase, della fosforilazione ossidativa, della creatina chinasi**
- **5.5 Concentrazione dell'ADP**
- **5.6 Concentrazione dell'ATP e della fosfocreatina PCr**

CAPITOLO 6: LIMITAZIONI DEL MODELLO

- **6.1 Riduzione del volume muscolare**
- **6.2 Limitata accuratezza e specificità nelle misurazioni NIRS**

CAPITOLO 7: SVILUPPI FUTURI

CAPITOLO 8: CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

- **8.1 Considerazioni relative alla respirazione interna ed esterna alla luce dei dati sperimentali**
- **8.2 Considerazioni relative ai flussi misurati e simulati**

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

GLOSSARIO

ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
NAD o NADH	Nicotinammide adenina dinucleotide
FAD o FADH₂	Flavina adenina dinucleotide
CK	Creatina chinasi
PCr	Fosfocreatina
Cr	Creatina
Hb	Emoglobina
Mb	Mioglobina
C_{A,tot}	Concentrazione totale di ADP e ATP (mM)
C_{ADP}	Concentrazione di ADP nel tessuto (mM)
C_{ATP}	Concentrazione di ATP nel tessuto (mM)
C_{Cr,tot}	Concentrazione totale di PCr e Cr (mM)
C_{Cr}	Concentrazione di Cr nel tessuto (mM)
C_{PCr}	Concentrazione di PCr nel tessuto (mM)
C_{rbc,Hb}	Concentrazione di Hb nei globuli rossi (mM)
C_{mc,Mb}	Concentrazione di Mb nei miociti (mM)
C_x^B	Concentrazione di ossigeno legato nell'arteria, nel capillare e nel tessuto (mM)
C_x^F	Concentrazione di ossigeno libero nell'arteria, nel capillare e nel tessuto (mM)
C_x^T	Concentrazione totale di ossigeno nell'arteria, nel capillare e nel tessuto (mM)
Hct	Ematocrito (frazione di globuli rossi nel sangue) (–)
k_{ATPase}	Costante di velocità dell'ATPase (min ⁻¹)
K_{Hb}	Costante di Hill alla quale Hb è al 50% saturata dall'O ₂ (mM ⁻ⁿ)
K_{Mb}	Costante di Hill alla quale Mb è al 50% saturata dall'O ₂ (mM ⁻ⁿ)
K_{ADP}	Costante di CK (mM)
K_b	Costante di CK (mM)
K_{ia}	Costante di CK (mM)
K_{ib}	Costante di CK (mM)
K_{iq}	Costante di CK (mM)
K_m	Costante di Michaelis Menten (mM)
K_p	Costante di CK (mM)
n	Coefficiente di Hill (–)
PS	Permeabilità di superficie (L min ⁻¹)
PS^E	Massimo valore della permeabilità di superficie (L min ⁻¹)
PS^R	Permeabilità di superficie a riposo (L min ⁻¹)
Q_c	Costante del flusso sanguigno muscolare in Eq. (13) (L min ⁻¹)

Q_m	Flusso sanguigno muscolare ($L \text{ min}^{-1}$)
$S_{\text{cap,Hb}}$	Saturazione dell'ossigeno in Hb nel sangue capillare (–)
$S_{\text{tis,Mb}}$	Saturazione dell'ossigeno in Mb nel tessuto muscolare (–)
St_{O2m}	Saturazione dell'ossigeno muscolare (–)
T_m	Quantità totale di Hb e Mb (mmol)
t	Tempo (min)
t^W	Tempo all'inizio dell'esercizio (min)
U_{O2m}	Utilizzo di ossigeno muscolare (mmol min^{-1})
V_{CK}^f	Flusso massimo della reazione diretta della CK (mM min^{-1})
V_{CK}^r	Flusso massimo della reazione inversa della CK (mM min^{-1})
V_{max}	Flusso massimo della Fosforilazione ossidativa (mM min^{-1})
$V_{\text{cap}}, V_{\text{tis}}$	Volume anatomico del capillare e del tessuto (L)
V_{O2m}, V_{O2p}	Consumo di ossigeno muscolare e polmonare (mmol min^{-1})
WR	Potenza (watt)
W_{mc}	Frazione in volume dei miociti (–)
ΔPS	Variazione della permeabilità di superficie ($L \text{ min}^{-1}$)
ΔQ_m	Variazione della risposta del flusso sanguigno muscolare ($L \text{ min}^{-1}$)

Lettere greche

Φ_{ATPase}	Flusso metabolico dell'ATPase (mM min^{-1})
Φ_{CK}^f	Flusso metabolico diretto della CK (mM min^{-1})
Φ_{CK}^r	Flusso metabolico inverso della CK (mM min^{-1})
Φ_{OxPhos}	Flusso metabolico della Fosforilazione ossidativa (mM min^{-1})
τ_{PCr}	Costante di tempo della cinetica della PCr (s)
τ_{Power}	Costante di tempo del potere meccanico (s)
τ_{Qm}	Costante di tempo del flusso sanguigno muscolare (s)
τ_{UO2m}	Costante di tempo dell'utilizzo di ossigeno muscolare (s)
τ_{VO2m}	Costante di tempo del consumo di ossigeno muscolare (s)
τ_{VO2p}	Costante di tempo del consumo di ossigeno polmonare (s)

Apici

B	Concentrazione di ossigeno legato
F	Concentrazione di ossigeno libero
H	Intensità pesante
j	Intensità d'esercizio
M	Intensità moderata
R	Condizione di riposo
T	Concentrazione di ossigeno totale
V	Intensità molto pesante

W

Stato di riscaldamento

Parole chiave:

Metabolismo cellulare, modellistica, approccio su più livelli, fosforilazione ossidativa, sistema biologico.

INTRODUZIONE

Una delle più comuni sfide all'omeostasi corporea è rappresentata da un'attività quotidiana: l'esercizio fisico. La corsa a lunga distanza, il ciclismo, sono esempi di esercizio dinamico protratto nel tempo a diverse intensità.



L'esercizio fisico è considerato come fonte di perturbazioni per l'equilibrio omeostatico dell'organismo, perturbazioni che sono fronteggiate dalla risposta integrata dei vari sistemi che lo compongono.

L'esercizio fisico comporta la contrazione dei muscoli scheletrici, un processo attivo che richiede energia.

Lai, assieme ad altri ricercatori, al fine di studiare la richiesta di energia imposta dall'esercizio per mantenere l'omeostasi dell'adenosina trifosfato o ATP a livello cellulare, ha sviluppato e applicato con successo un modello matematico del sistema biologico, che descrive l'interazione tra il trasporto di ossigeno (per convezione e diffusione) e i meccanismi del metabolismo energetico cellulare, che avvengono nel muscolo scheletrico durante l'esercizio.

Il modello matematico esprime i bilanci di massa, i flussi metabolici e di trasporto, necessari a mantenere l'equilibrio energetico a livello cellulare.

Nel modello l'organismo è considerato come un sistema molto complesso, organizzato in modo gerarchico in più livelli e composto da diversi sottosistemi interagenti tra loro.

In questo studio, i processi metabolici e di trasporto sono stati quantificati a regime, e durante la variazione dell'intensità dell'esercizio, adattando le simulazioni del modello alle misurazioni del consumo di ossigeno polmonare e della saturazione di ossigeno muscolare, corrispondenti alle diverse intensità di esercizio.

Tre sono i livelli d'intensità: moderata (M), pesante (H), molto pesante (VH).

Partendo dalla condizione di riposo, a seguito di variazioni nell'intensità, si notano cambiamenti nella regolazione dell'omeostasi dell'ATP, proprio in funzione dell'intensità.

Il primo capitolo è dedicato al metabolismo, in particolare sono descritti le principali biomolecole che trasportano energia, i processi aerobici e anaerobici attraverso i quali è prodotta energia. La parte conclusiva del capitolo presenta lo studio del consumo di ossigeno, definito come il volume di ossigeno consumato durante la fosforilazione ossidativa e la classificazione delle fibre muscolari.

Nel secondo capitolo è introdotto il modello e sono descritte le tecniche per la misurazione del consumo di ossigeno polmonare e muscolare.

Il terzo capitolo illustra il modello matematico, che permette di interpretare quantitativamente i processi di trasporto e metabolici che avvengono nell'organismo. Inoltre sono definiti: il bilancio del trasporto di massa dell'ossigeno attraverso i capillari e i tessuti, i bilanci delle reazioni metaboliche della fosforilazione ossidativa e della creatina chinasi, i parametri che dipendono dall'intensità dell'esercizio, quali il flusso sanguigno muscolare e il coefficiente di permeabilità della superficie. Nella parte finale del capitolo è attribuita alla saturazione dell'ossigeno un'espressione che adatta le risposte dell'ossigeno sperimentali a quelle simulate.

Il quarto capitolo è dedicato alla stima di alcuni parametri che compaiono nel modello. Si descrive come valutare la costante di velocità dell'ATPase e il coefficiente di permeabilità a regime. Tramite una stima ottimale sono ricavati la

variazione del flusso sanguigno muscolare e la velocità massima della fosforilazione ossidativa. Infine sono illustrate le tabelle nelle quali sono definiti i valori dei parametri del modello.

Nel sesto capitolo sono trattate le limitazioni del modello, quali la riduzione del volume muscolare e la limitata accuratezza e specificità delle misurazioni ottenute tramite spettrometria "near-infrared".

Il settimo capitolo è dedicato agli sviluppi futuri del modello.

L'ottavo capitolo è dedicato alle considerazioni conclusive inerenti al rapporto tra la respirazione cellulare ed esterna e ai flussi simulati e misurati.

CAPITOLO 1. METABOLISMO ED ESERCIZIO FISICO

1.1 Che cos'è l'ATP

L'adenosintrifosfato indicata con ATP, l'adenosindifosfato indicata con ADP, la nicotinammide adenina dinucleotide indicata con la sigla NAD o NADH (a seconda dello stato di ossidazione), il flavina adenina dinucleotide indicato come FAD o FADH₂ (se due atomi di idrogeno sono legati all'anello strutturale), sono dei nucleotidi, biomolecole che hanno la funzione di trasportare energia, e sono così composte:

Nucleotidi	Base azotata	Zucchero	Gruppi fosfato
ATP	Adenina	Ribosio	3
ADP	Adenina	Ribosio	2
NAD	Adenina	2Ribosio	2

Il FAD ha una struttura più complessa: la molecola è costituita da tre anelli condensati, che formano il gruppo isoallosazinic della flavina, il quale è legato al ribitolo (composto derivato dalla riduzione del ribosio) tramite l'atomo di azoto (N) dell'anello centrale. La molecola se presenta il gruppo OH del carbonio 5 legato al gruppo fosfato prende il nome di flavin mono nucleotide (FMN). Se l'FMN reagisce con l'ATP si forma il FAD.

Misurando la quantità netta di ATP che le vie metaboliche producono si ottiene la quantità di energia che possono generare. Questo perché l'ATP è formata da 3 gruppi fosfato, di cui uno è legato all'ADP tramite un legame covalente, che richiede alta energia per essere formato, perciò quando il gruppo fosfato viene rimosso dall'ATP e cioè viene rotto il legame, precedentemente descritto, si libera energia, dando origine a una reazione esoergonica.



Nella reazione sopra, con P si indica il gruppo fosfato.

1.2 Produzione di energia nel muscolo

L'ATP per la contrazione muscolare in piccola quantità si trova già nel citoplasma della fibra muscolare quando la contrazione ha inizio, ma la quantità di ATP presente in una fibra muscolare è sufficiente solo per circa otto contrazioni. Perciò come fonte di energia di riserva, il muscolo contiene **fosfocreatina** (PCr), una molecola i cui legami fosfato ad alta energia sono generati a partire da creatina e ATP quando il muscoli sono a riposo. Quando i muscoli entrano in attività il gruppo fosfato ad alta energia della fosfocreatina viene trasferito all'ADP, formando nuovo ATP che fornisce ulteriore energia.

L'enzima responsabile del trasferimento del gruppo fosfato dalla fosfocreatina all'ADP è la **creatina chinasi** (CK). I muscoli contengono grandi quantità di questo enzima. Complessivamente, la combinazione di ATP e fosfocreatina nei muscoli è sufficiente a fornire energia solo per 15 secondi di esercizio intenso. In seguito le fibre muscolari devono sintetizzare ulteriore ATP dall'energia accumulata nei nutrienti.

1.2a La Glicolisi e il ciclo dell'acido citrico

I carboidrati, in particolare il glucosio, sono la fonte di energia più rapida e più efficiente per la produzione di ATP.

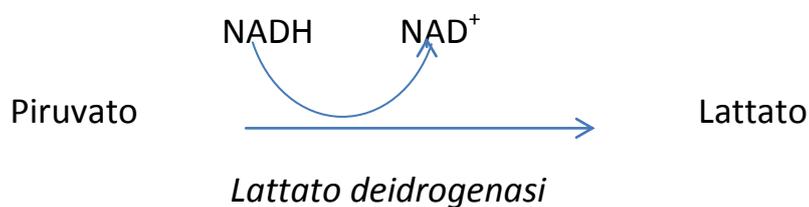
La produzione di ATP dal glucosio di norma segue due vie: la **glicolisi** e il **ciclo dell'acido citrico**. Ciascuna di queste due vie, direttamente produce piccole quantità di ATP, ma il loro contributo più importante alla sintesi di ATP è dovuto alla produzione di elettroni ad alta energia che sono trasportati da NADH e FADH₂ al sistema di trasporto di elettroni dei mitocondri. Il sistema di trasporto degli elettroni, a sua volta, trasferisce energia dagli elettroni al legame fosfoanidridico ad alta energia dell'ATP. I carboidrati entrano nella glicolisi sotto forma di glucosio. Gli enzimi della glicolisi sono localizzati nel citosol mentre gli enzimi del ciclo dell'acido citrico sono localizzati nei mitocondri.

Nella glicolisi, una molecola di glucosio (uno zucchero a sei atomi di carbonio) è trasformata da una serie di reazioni catalizzate enzimaticamente in due molecole di piruvato (ciascuna a tre atomi di carbonio), producendo un guadagno netto di energia: per ogni molecola di glucosio sono prodotte due molecole di ATP e due di

NADH. La glicolisi è dunque considerata una via esoergonica (le due tappe esoergoniche producono quattro molecole di ATP e due di NADH), sebbene due tappe siano endoergoniche e richiedano l'apporto di energia da parte di due molecole di ATP. Una parte dell'energia rilasciata dalla glicolisi è usata per consentire la fosforilazione di ADP ed è intrappolata così in ATP. Le tappe della glicolisi possono essere schematizzate come segue:



La glicolisi non richiede la presenza di ossigeno, perciò funge da via comune sia del catabolismo aerobico sia di quello anaerobico del glucosio, infatti se la cellula contiene adeguata quantità di ossigeno, il piruvato procede lungo il ciclo dell'acido citrico, in caso contrario il piruvato è convertito in lattato dalla lattato-deidrogenasi.



La conversione del piruvato in lattato trasforma nuovamente NADH in NAD⁺ quando un atomo d'idrogeno viene trasferito alla molecola di lattato. Di conseguenza l'energia netta prodotta dal metabolismo anaerobico di una molecola di glucosio ammonta a due molecole di ATP e nessuna molecola di NADH.

Se la cellula ha a disposizione una quantità di ossigeno adeguata al metabolismo aerobico, le molecole di piruvato prodotte dal glucosio sono trasportate nei mitocondri. Raggiunta la matrice mitocondriale, il piruvato è convertito in **acetil-CoA**. Come suggerisce il nome, questa molecola è costituita da due parti: un gruppo acetilico (acetil) a due atomi di carbonio derivato dal piruvato e un coenzima (coenzima A). La sintesi di acetil-CoA dal piruvato è una reazione esoergonica che produce una molecola di NADH. Durante la reazione uno dei tre atomi di carbonio del piruvato si combina con ossigeno ed è rilasciato sotto forma di anidride

carbonica (CO_2), lasciando l'acetil-CoA, con due soli atomi di carbonio. L'acetil-CoA rilascia l'unità acetilica a due atomi di carbonio nella via dell'acido citrico, nota come ciclo di Krebs. Il ciclo dell'acido citrico è un ciclo continuo, che introduce una molecola di acetil-CoA a ogni giro e produce ATP, elettroni ad alta energia e anidride carbonica. L'unità acetilica a due atomi di carbonio entra nel ciclo dell'acido citrico combinandosi con una molecola di ossalacetato a quattro atomi di carbonio, che è l'ultimo prodotto intermedio del ciclo. La risultante molecola a sei atomi di carbonio passa attraverso una serie di reazioni finché completa il ciclo di nuovo come ossalacetato. La maggior parte dell'energia rilasciata dalle reazioni enzimatiche del ciclo dell'acido citrico è catturata dagli elettroni ad alta energia su tre molecole di NADH e una di FADH_2 . Una parte dell'energia è impiegata per creare il legame fosfoanidridico ad alta energia di una molecola di ATP, mentre la parte restante è ceduta come calore. In due delle reazioni, il carbonio e l'ossigeno sono rimossi sotto forma di anidride carbonica. Alla fine del ciclo, la restante molecola di ossalacetato a quattro atomi di carbonio è pronta a iniziare nuovamente il ciclo.

La tappa finale della produzione aerobica di ATP è data dal trasferimento di energia dagli elettroni di NADH e FADH_2 ad ATP. Questo trasferimento è reso possibile dalla presenza di un gruppo di proteine mitocondriali, il **sistema di trasporto degli elettroni**, localizzato nella membrana mitocondriale interna. Il flusso di elettroni attraverso il loro sistema di trasporto è descritto da un modello detto **teoria chemiosmotica**. In tale modello, mentre coppie di elettroni ad alta energia passano da un complesso all'altro lungo il sistema di trasporto, parte dell'energia ceduta da tali reazioni è impiegata per trasportare H^+ dalla matrice mitocondriale allo spazio intermembrana. Tale trasporto di H^+ nello spazio intermembrana genera un gradiente di concentrazione di H^+ . Il flusso di H^+ attraverso la membrana nella matrice mitocondriale secondo il proprio gradiente di concentrazione è associato al trasferimento al legame ad alta energia dell'ATP dell'energia potenziale accumulata nel gradiente di concentrazione. La sintesi di ATP per mezzo del sistema di trasporto degli elettroni è detta fosforilazione ossidativa, perché richiede ossigeno come accettore finale degli elettroni e di H^+ . Al termine della catena di trasporto degli elettroni, gli elettroni ad alta energia hanno ceduto la quantità utilizzabile dell'energia che avevano accumulato. A questo punto, le coppie di elettroni che fluiscono attraverso il sistema di trasporto si combinano con due ioni H^+ della matrice. Gli atomi d'idrogeno così prodotti si combinano quindi con un atomo di ossigeno, producendo una molecola di acqua.

In conclusione, il glucosio è metabolizzato attraverso la **glicolisi** fino a **piruvato**. In presenza di adeguate quantità di ossigeno, il piruvato entra nel ciclo dell'acido citrico dando origine a circa **30** molecole di ATP per ogni molecola di glucosio.

Quando le concentrazioni di ossigeno sono troppo basse per mantenere il metabolismo aerobico, le fibre muscolari passano alla **glicolisi anaerobica**. In questa via, il glucosio viene metabolizzato ad **acido lattico** con un guadagno di soli 2 ATP per molecola di glucosio.

1.3 Il consumo di ossigeno (VO₂)

Attraverso il grafico seguente si rappresenta la velocità di produzione dell'ATP confrontata con la capacità di sostenere un'attività muscolare massimale, ponendo sull'asse delle ordinate a sinistra le moli di ATP prodotte/min e sull'asse delle ordinate a destra il tempo di resistenza all'attività muscolare massimale.

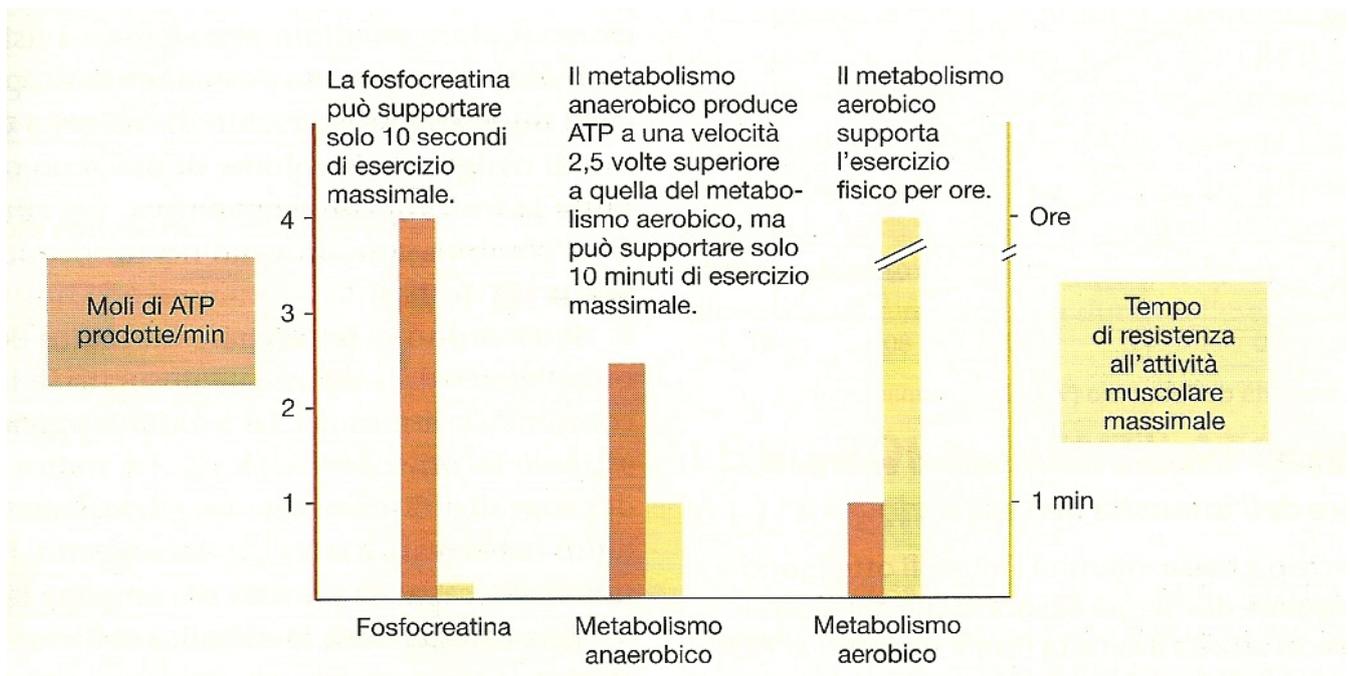


Figura 0. Velocità di produzione dell'ATP confrontata con la capacità di sostenere un'attività muscolare massimale.

(riprodotta da D.U.Silverthorn. Fisiologia un approccio integrato, 2007)

Le attività definite collettivamente come esercizio fisico variano ampiamente in intensità e durata. I fisiologi tradizionalmente quantificano l'intensità di un periodo di esercizio misurando il consumo di ossigeno (VO_2). Il consumo di ossigeno è il volume di ossigeno consumato durante la fosforilazione ossidativa, nel corso della quale O_2 si combina con idrogeno nei mitocondri per formare acqua.

Il consumo di ossigeno è indice della respirazione cellulare ed è misurato in litri di ossigeno consumati per minuto. La velocità massima di consumo di ossigeno in un soggetto ($VO_{2\max}$) è indice della capacità del soggetto di compiere esercizio fisico di resistenza: tanto più elevata è la $VO_{2\max}$ del soggetto, tanto maggiore sarà la sua capacità prevista di compiere lavoro. Quando l'esercizio comincia, il consumo di ossigeno aumenta così rapidamente da non essere immediatamente compensato dall'apporto di ossigeno ai muscoli. Durante questa fase l'ATP deriva dalle riserve muscolari di ATP, dalla fosfocreatina e dal metabolismo aerobico sostenuto dall'ossigeno accumulato nella mioglobina muscolare e nell'emoglobina circolante. L'utilizzo di queste riserve muscolari crea un debito di ossigeno perché la loro ricostituzione richiede il metabolismo aerobico e la captazione di ossigeno dal sangue circolante. Quando l'esercizio termina, il consumo di ossigeno torna lentamente ai livelli di riposo. L'eccesso di consumo di ossigeno post-esercizio rappresenta la quota di ossigeno utilizzata per metabolizzare il lattato, ripristinare i livelli di ATP e di fosfocreatina e rifornire di ossigeno la mioglobina.

1.4 Fibre muscolari

Le fibre dei muscoli scheletrici possono essere classificate in base alla velocità di contrazione e alla resistenza alla fatica conseguente a stimolazioni ripetute. Si possono identificare tre tipi di fibre:

- a. Fibre ossidative a contrazione lenta, di tipo I;
- b. Fibre ossidativo-glicolitiche a contrazione rapida, di tipo IIA;
- c. Fibre glicolitiche a contrazione rapida, di tipo IIB;

Le fibre a contrazione rapida scindono l'ATP più velocemente e quindi completano i cicli contrattili più rapidamente di quelle a contrazione lenta.

Le fibre a contrazione rapida pompano Ca^{2+} nel reticolo sarcoplasmatico più velocemente di quelle a contrazione lenta, quindi hanno scosse più veloci.

Un'altra proprietà che distingue le fibre muscolari è la capacità di resistere alla fatica.

Le fibre glicolitiche utilizzano principalmente la glicolisi anaerobica per produrre ATP. L'accumulo di ioni H^+ prodotto dall'idrolisi dell'ATP contribuisce all'acidosi, una condizione che favorisce l'insorgenza della fatica. Di conseguenza, le fibre glicolitiche si affaticano più facilmente di quelle ossidative, che non dipendono dal metabolismo anaerobico.

Le fibre ossidative utilizzano per la produzione di ATP soprattutto la fosforilazione ossidativa.

Queste fibre hanno, rispetto alle fibre glicolitiche, più mitocondri, sede degli enzimi del ciclo dell'acido citrico e della fosforilazione ossidativa e anche un maggior numero di vasi ematici, nel tessuto connettivo, che portano ossigeno alle fibre.

L'ossigeno contenuto all'interno di ciascuna fibra muscolare deve diffondere per raggiungere i mitocondri. Questo processo è facilitato dalla presenza della mioglobina, un pigmento rosso con alta affinità per l'ossigeno. La mioglobina lega l'ossigeno e lo trasporta più velocemente all'interno della fibra. Poiché le fibre ossidative hanno un maggior contenuto in mioglobina, la diffusione dell'ossigeno in queste fibre è facilitata rispetto alle fibre glicolitiche. L'elevato contenuto in mioglobina conferisce alle fibre ossidative il loro caratteristico colore rosso, da cui deriva la denominazione di fibre rosse.

Le fibre ossidative, inoltre hanno un diametro minore, cosicché la distanza che l'ossigeno deve percorrere per raggiungere i mitocondri è più breve. La presenza della mioglobina, l'elevata capillarizzazione e il piccolo diametro permettono alle fibre ossidative di mantenere un apporto di ossigeno sufficiente per produrre ATP attraverso la fosforilazione ossidativa.

Le fibre rapide sono dette anche fibre bianche, a causa del loro minore contenuto in mioglobina, e hanno anche un diametro maggiore. La combinazione del grande diametro, della scarsa quantità di mioglobina e del ridotto numero di vasi sanguigni fa sì che queste cellule spesso esauriscano l'ossigeno durante contrazioni ripetute. Per questo motivo, le fibre glicolitiche utilizzano principalmente la glicolisi anaerobica per sintetizzare ATP e sono soggette a un rapido affaticamento.

Le fibre rapide ossidativo-glicolitiche mostrano proprietà sia ossidative che glicolitiche. Sono più piccole delle fibre rapide glicolitiche e usano una combinazione dei metabolismi ossidativo e glicolitico per produrre ATP. A causa delle dimensioni intermedie e dell'utilizzo della fosforilazione ossidativa, queste fibre sono più resistenti alla fatica delle fibre glicolitiche. Le fibre rapide ossidativo-glicolitiche sono considerate fibre rosse, come le fibre lente, a causa del loro contenuto in mioglobina.

I muscoli nell'uomo sono costituiti da fibre di diverso tipo.

CAPITOLO 2. IL MODELLO

2.1 Lo scopo del modello

Al fine di studiare la richiesta di energia imposta dall'esercizio fisico per mantenere l'omeostasi dell'ATP a livello cellulare, Lai ha sviluppato un modello che si propone di descrivere la stretta relazione esistente tra la respirazione cellulare e la respirazione esterna nell'organismo, come mostrato nella seguente immagine:

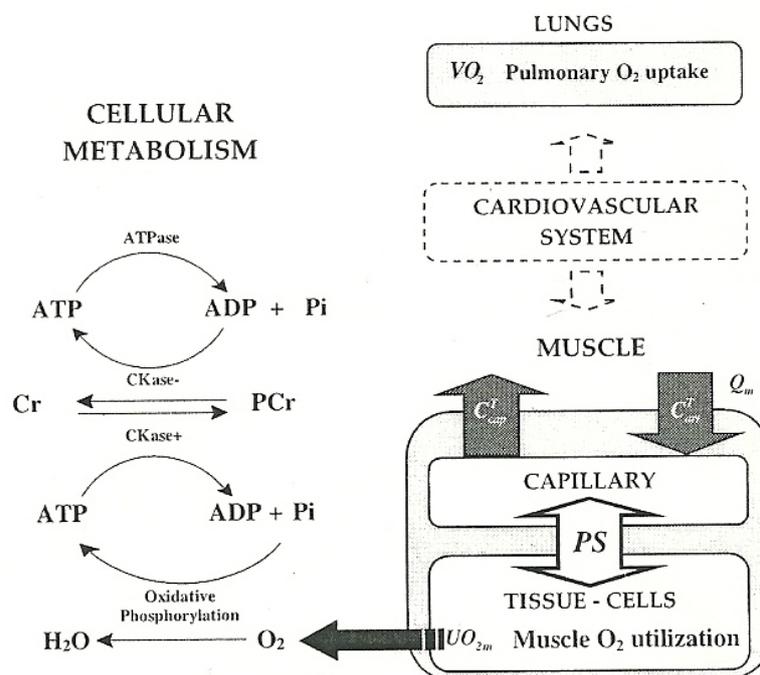


FIGURA 1. Utilizzo e trasporto dell'ossigeno attraverso i polmoni e il muscolo scheletrico e metabolismo cellulare durante l'esercizio.

(Riprodotta da Lai e altri, 2007)

La respirazione cellulare si riferisce alle reazioni intracellulari dell'ossigeno con varie molecole organiche per produrre energia in forma di ATP, acqua e anidride carbonica.

La respirazione esterna è lo scambio di gas tra l'ambiente e le cellule dell'organismo, e si articola in quattro fasi:

1. I polmoni scambiano aria con l'atmosfera;
2. I polmoni e il sangue scambiano ossigeno e anidride carbonica;

3. L'ossigeno e l'anidride carbonica sono trasportati attraverso il sangue;
4. Tra sangue e cellule avviene lo scambio dei gas.

Ed è proprio l'ossigeno che raggiunge le cellule attraverso la respirazione esterna che partecipa alla fosforilazione ossidativa, processo attraverso il quale avviene la sintesi dell'ATP, come accettore finale degli elettroni e degli ioni idrogeno.

La velocità di utilizzo dell'ossigeno nel muscolo scheletrico (UO_{2m}) è relazionata alla velocità di consumo dell'ossigeno nei polmoni (VO_{2p}) attraverso il sistema cardiovascolare che scambia ossigeno con i tessuti, all'interno dei quali agiscono sistemi di trasporto.

È bene definire i parametri dai quali dipende il nostro studio:

- VO_{2p} = consumo di ossigeno a livello polmonare
- C_{cap}^T = concentrazione totale di ossigeno nei capillari
- C_{art}^T = concentrazione totale di ossigeno nelle arterie
- Q_m = flusso sanguigno nel muscolo
- UO_{2m} = ossigeno utilizzato nel muscolo scheletrico
- PS = coefficiente di permeabilità superficiale

Questo modello vuole, quindi, presentare la struttura di un sistema biologico a compartimenti e integrare i dati ottenuti da un lavoro sperimentale con dati ottenuti da un approccio matematico in modo tale da essere in grado di fornire informazioni affidabili sui processi di trasporto e di utilizzo dell'ossigeno che avvengono ai vari livelli del sistema nel percorso dell'ossigeno dall'aria ai mitocondri, in particolare durante l'esercizio.

Secondo l'approccio sperimentale sette soggetti sono stati sottoposti a un esercizio variabile in intensità e sono stati misurati il consumo di ossigeno polmonare tramite calorimetria indiretta e l'ossigenazione del muscolo, tramite la spettroscopia "near-infrared".

Adattando questi dati al modello matematico che traduce in equazioni matematiche i processi del trasporto di ossigeno e del metabolismo nel muscolo scheletrico è possibile simulare e conoscere le dinamiche del consumo di ossigeno muscolare durante l'esercizio.

Conoscendo ora il consumo di ossigeno a livello muscolare è possibile stimare il consumo di ossigeno a livello cellulare durante l'esercizio integrando il modello con

il modello del bilancio di energia nei miociti. Quest'ultimo fornisce un'espressione meccanicistica della fosforilazione ossidativa, che è collegata a due reazioni:

- 1- Reazione dell'ATPase
- 2- Reazione della creatina chinasi (CK)

Infine le simulazioni di modello sono usate per fornire dati sulla concentrazione e la velocità del flusso dei metaboliti chiave: O₂, ADP, PCr, ATP, che partecipano alla fosforilazione ossidativa e all'omeostasi dell'ATP.

Conoscere la dinamica dei flussi metabolici è quindi utile per studiare i meccanismi che regolano le dinamiche della fosforilazione ossidativa durante l'esercizio.

2.2 Tecniche per misurare il consumo di ossigeno polmonare (VO_{2p}) e il consumo di ossigeno muscolare (VO_{2m})

Il consumo di ossigeno polmonare, nel soggetto sottoposto ad esercizio, variabile in intensità, è misurato attraverso una particolare tecnica: la calorimetria indiretta.

La valutazione del metabolismo, o consumo metabolico, cioè del consumo energetico del soggetto consiste nella misura del calore rilasciato dal corpo. Poiché dal punto di vista pratico, valutare il calore totale rilasciato dal corpo non rappresenta un modo semplice per misurare il consumo energetico, si è determinato un nuovo metodo che prevede la misurazione del consumo di ossigeno del soggetto, e cioè la quantità di ossigeno che l'organismo consuma mentre metabolizza i cibi. Il metabolismo del glucosio per trasferire energia nei legami dell'ATP è particolarmente efficiente in presenza di un'adeguata quantità di ossigeno:



Diversi studi hanno dimostrato che il consumo di ossigeno per i differenti alimenti è relativamente costante e corrisponde a 1litro di ossigeno consumato per ogni 4,5-5 Kcal di energia rilasciata dall'alimento stesso quando viene metabolizzato.

L'intensità del consumo di ossigeno, perciò, corrisponde all'entità del metabolismo.

Le misure del consumo di ossigeno polmonare, VO_{2p}, riflettono non solo il metabolismo cellulare, ma anche gli effetti dei componenti del sistema di

distribuzione dell'ossigeno che lo trasporta dall'ambiente esterno fino ai mitocondri: la ventilazione polmonare, la diffusione dell'ossigeno dagli alveoli al sangue, il trasporto di ossigeno nel sangue, disciolto o legato all'emoglobina, la diffusione di ossigeno dal sangue ai tessuti. Quindi le misurazioni di VO_{2p} non possono indicare accuratamente la disponibilità cellulare di ossigeno e la velocità di consumo durante la contrazione del muscolo. Ne consegue che sono insufficienti per dedurre i meccanismi del controllo metabolico a livello cellulare.

Per studiare l'andamento della velocità del consumo di ossigeno, in letteratura sono riportati diversi lavori nei quali si è misurato direttamente il consumo di ossigeno attraverso il letto femorale mentre il paziente pedalava, oppure attraverso preparati isolati di un muscolo scheletrico di cane [Grassi e altri, 1998; Grassi e altri, 2000].

Questi ultimi studi, effettuati sul muscolo, hanno messo in evidenza gli effetti sulle dinamiche del consumo di ossigeno muscolare durante un esercizio di intensità moderata e pesante, determinati alterando il trasporto di ossigeno per convezione e la diffusione periferica di ossigeno. Nonostante ciò, anche queste misurazioni sul muscolo hanno qualche limitazione. Quando il muscolo è stimolato "in loco" da una contrazione volontaria il modello di reclutamento del tipo di fibra muscolare è diverso. Inoltre controllando il trasporto di ossigeno non si controlla necessariamente la perfusione di ossigeno al metabolismo. Infatti il contenuto di ossigeno nel sangue arterioso e venoso non riflette l'attuale ammontare di ossigeno libero a livello dei mitocondri. La disponibilità locale di ossigeno (PO_2 cellulare) nel tessuto muscolare è difficile da stimare.

La disponibilità cellulare di ossigeno può essere stimata nei muscoli contrastando i tipi di fibre con il metodo "quenching phosphorescence" [Behnke e altri, 2003] oppure nell'intero muscolo sotto sforzo con la "spettroscopia a risonanza magnetica" [Jue e altri, 1999] o con la "spettroscopia near-infrared" [Grassi e altri, 2003]. Comunque questi metodi presentano limitazioni nella specificità quando misurano la dinamica del consumo cellulare di ossigeno durante l'esercizio di un grande fascio muscolare. Nonostante ciò, il consumo intracellulare di ossigeno, può essere stimato usando la "spettroscopia P": la risonanza magnetica che approssima il consumo di ossigeno con l'utilizzo della PCr, commettendo un errore del 10%.

Un approccio più adeguato per studiare i meccanismi che controllano la respirazione è di condurre simultaneamente misurazioni dinamiche dei mediatori di controllo intramuscolare (PCr, Cr, Pi, ATP, ADP) e del VO_{2p} quando l'esercizio interessa un

grande fascio muscolare (es. quadricipite). Con questa tecnica si è in grado di dimostrare che VO_{2p} all'inizio dell'esercizio subisce un grande cambiamento e le risposte dinamiche del VO_{2p} possono essere comparate a quelle della PCr.

CAPITOLO 3. IL MODELLO MATEMATICO

Le misure, condotte a livello dell'organello, della cellula, del tessuto e dell'intero corpo, attraverso sperimentazione invasiva e non-invasiva e con gli appropriati tempi di risposta, devono essere integrate con un sistema coordinato per l'interpretazione dei dati e per spiegare i meccanismi del controllo e della regolazione metabolica. Così, al fine di ottenere un'interpretazione quantitativa dei processi di trasporto e metabolici a livello del sistema biologico, Lai e collaboratori hanno introdotto un sistema teorico, che integra i dati e simula le risposte a livello cellulare, tissutale e dell'intero corpo.

Questo modello matematico permette di integrare gli studi sperimentali, condotti sul sistema biologico, inerenti al consumo e utilizzo di ossigeno a varie intensità di esercizio.

Le equazioni del modello descrivono le variazioni dei flussi dell'ATPase cellulare, della fosforilazione ossidativa e di CK nel muscolo scheletrico durante l'esercizio.

Nel muscolo la respirazione cellulare è regolata dal controllo retroazionato dipendente dalle concentrazioni di ADP e di ossigeno.

In letteratura, sono stati proposti molti modelli di controllo retroazionato e anticipatorio per descrivere la regolazione della respirazione cellulare "in vivo", come:

- 1- Il controllo retroazionato che usa la relazione di Michaelis-Menten tra la fosforilazione ossidativa e la concentrazione di ADP;
- 2- Il controllo retroazionato che usa un'espressione in cui il coefficiente di Hill è maggiore di 1;
- 3- L'espressione fondamentale che collega la fosforilazione ossidativa all'energia libera dell'idrolisi di ATP [Jeneson e altri, 1995; Kushmerick, 1998].

Inoltre, altri studiosi hanno proposto un meccanismo di controllo anticipato per la fosforilazione ossidativa.

Tuttavia, i dati sperimentali disponibili non sono sufficienti per affrontare questi problemi; perciò in questo studio è adottato l'approccio precedentemente applicato con successo ai dati ottenuti "in vivo" con la "spettroscopia NMR".

3.1 Sviluppi del modello

La velocità dell'utilizzo di ossigeno nel muscolo scheletrico (UO_{2m}) è collegata al consumo di ossigeno nei polmoni (VO_{2p}) attraverso i processi di trasporto all'interno dei tessuti e del sistema cardiovascolare.

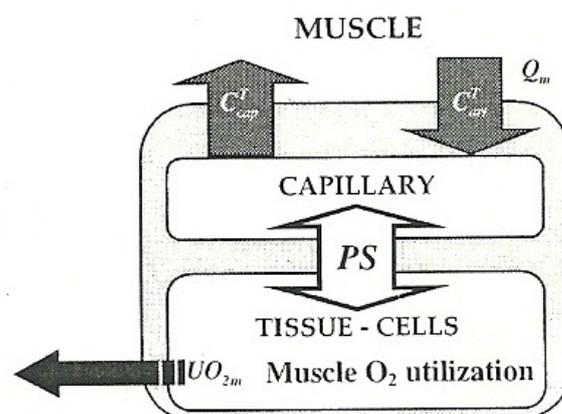
Per analizzare la relazione dinamica tra UO_{2m} e VO_{2p} è necessario un modello matematico. In un primo approccio per sviluppare questa relazione, le simulazioni erano basate su un modello che approssimava l'utilizzo di ossigeno nel muscolo scheletrico, sotto esercizio, come una funzione monoesponenziale dell'intensità di lavoro. Questo modello è stato usato per studiare le risposte dinamiche a diverse intensità di esercizio. Però con questo semplice modello non potevano essere valutati i distinti processi metabolici coinvolti durante l'esercizio.

È stato quindi necessario migliorare il modello considerando un sistema più complesso che fosse in grado di descrivere la fosforilazione ossidativa e le sue reazioni dell'ATPase e della CK.

Combinando questo modello della fosforilazione ossidativa nei miociti, con il modello di trasporto e di utilizzo di ossigeno, si possono studiare le risposte del sistema biologico all'esercizio.

3.2 Bilancio del trasporto di massa

La concentrazione dinamica dell'ossigeno nel muscolo scheletrico è rappresentata attraverso un bilancio di massa a compartimenti.



Queste equazioni di bilancio combinano la concentrazione dell'ossigeno totale (C_{cap}^T , C_{tis}^T) alla concentrazione dell'ossigeno libero (C_{cap}^F , C_{tis}^F) all'interno di capillari e tessuti:

$$V_{cap} \frac{dC_{cap}^T}{dt} = Q_m(t)(C_{art}^T - C_{cap}^T) - PS(t)(C_{cap}^F - C_{tis}^F) \quad (1)$$

$$V_{tis} \frac{dC_{tis}^T}{dt} = PS(t)(C_{cap}^F - C_{tis}^F) - UO_{2m}(t) \quad (2)$$

Nelle equazioni con V_{cap} si indica il volume anatomico dei capillari, con V_{tis} il volume anatomico dei tessuti, con PS il coefficiente di permeabilità di superficie, con Q_m il flusso sanguigno muscolare e con UO_{2m} l'intensità di utilizzo dell'ossigeno.

L'equazione (1) esprime che la quantità di ossigeno totale che si accumula nel compartimento capillare, è data dal bilancio tra la quantità totale di ossigeno che entra nel capillare attraverso il flusso sanguigno e la quantità di ossigeno libero che esce dal capillare diffondendo nel tessuto muscolare in funzione del parametro di permeabilità di superficie.

Quando si considera il primo termine del secondo membro dell'equazione (1) si deve specificare che la quantità totale di ossigeno che entra nel capillare è determinata dalla quantità di ossigeno trasportata dal sangue arterioso (entrante) a cui va sottratta la quantità di ossigeno uscente mediante il sangue venoso.

La seconda equazione (2) esprime che la quantità totale di ossigeno che si accumula nel tessuto muscolare, è data dal bilancio tra la quantità di ossigeno libero entrante,

cioè che diffonde dal capillare al tessuto in funzione del parametro di permeabilità di superficie e la quantità di ossigeno consumato nella fosforilazione ossidativa.

Queste equazioni, che si basano sulle relazioni esistenti tra le concentrazioni di ossigeno totale, trasportato e libero, possono essere rappresentate in modo equivalente attraverso le derivate dell'ossigeno libero: per collegare la concentrazione di ossigeno totale C_x^T alla concentrazione dell'ossigeno libero C_x^F (con x si intende art, cap, tis), si può considerare la concentrazione di ossigeno in forma libera e la concentrazione di ossigeno trasportato attraverso l'emoglobina nel sangue arterioso e capillare ($C_{art}^F, C_{cap}^B, C_{cap}^F, C_{art}^B$) e la concentrazione di ossigeno in forma libera e la concentrazione di ossigeno trasportato attraverso la mioglobina nel tessuto muscolare (C_{tis}^F, C_{tis}^B). Le concentrazioni dell'ossigeno totale contenuto nel sangue arterioso e capillare e nel tessuto muscolare sono le somme delle corrispondenti concentrazioni di ossigeno libero e trasportato:

$$C_x^T = C_x^F + C_x^B \quad x \in \{\text{art, cap, tis}\} \quad (\text{A.1})$$

che sono collegate da equilibrio chimico locale.

Nel sangue la relazione è:

$$\begin{aligned} C_{cap}^B &= 4Hct C_{rbc,Hb} S_{cap,Hb} = \\ &= 4Hct C_{rbc,Hb} \frac{K_{Hb}(C_{cap}^F)^n}{1+K_{Hb}(C_{cap}^F)^n} \end{aligned} \quad (\text{A.2})$$

Nell'equazione A.2 con C_{cap}^B si indica la concentrazione di ossigeno legato nei capillari, che dipende dalla concentrazione di emoglobina nei globuli rossi, $C_{rbc,Hb}$, dall'ematocrito, Hct , e dalla saturazione dell'ossigeno $S_{cap,Hb}$ con l'emoglobina nei capillari. Quest'ultima può essere espressa in funzione della concentrazione libera di ossigeno nei capillari C_{cap}^F e della costante di Hill, K_{Hb} , alla quale l'emoglobina è saturata al 50% da ossigeno.

Nel tessuto la relazione è:

$$C_{tis}^B = W_{mc} C_{mc,Mb} S_{tis,Mb} =$$

$$= W_{mc} C_{mc,Mb} \frac{K_{Mb} C_{tis}^F}{1 + K_{Mb} C_{tis}^F} \quad (A.3)$$

Nell'equazione A.3 la concentrazione di ossigeno legato nel tessuto, C_{tis}^B , dipende dalla frazione in volume dei miociti, W_{mc} , dalla concentrazione di mioglobina nei miociti, $C_{mc,Mb}$, e dalla saturazione di ossigeno per mezzo della mioglobina nel tessuto muscolare, $S_{tis,Mb}$. Quest'ultima può essere espressa in funzione della costante di Hill, K_{Mb} , alla quale la mioglobina è saturata dall'ossigeno al 50% e della concentrazione di ossigeno libero nei tessuti, C_{tis}^F .

Riassumendo queste relazioni dipendono dalle concentrazioni di emoglobina (Hb) e di mioglobina (Mb) nei globuli rossi e nei miociti ($C_{rbc,Hb}$, $C_{mc,Mb}$) e dalle loro rispettive frazioni in volume (Hct, W_{mc}) e dalle saturazioni dell'ossigeno ($S_{cap,Hb}$, $S_{tis,Mb}$).

Da (A.1) si ottiene la relazione differenziale:

$$\begin{aligned} dC_x^T &= d[C_x^F + C_x^B] = \\ &= \left[1 + \frac{dC_x^B}{dC_x^F} \right] dC_x^F = \\ &= \gamma_x dC_x^F \end{aligned} \quad (A.4)$$

Dove

$$\begin{aligned} \gamma_{cap} &= 1 + \frac{4Hct C_{rbc,Hb} K_{Hb} n (C_{cap}^F)^{n-1}}{[1 + K_{Hb} (C_{cap}^F)^n]^2} \\ \gamma_{tis} &= 1 + \frac{W_{mc} C_{mc,Mb} K_{Mb}}{[1 + K_{Mb} C_{tis}^F]^2} \end{aligned} \quad (A.5)$$

Usando le relazioni precedenti possiamo esprimere l'equazione (1)

$$V_{cap} \frac{dC_{cap}^T}{dt} = Q_m(t)(C_{art}^T - C_{cap}^T) - PS(t)(C_{cap}^F - C_{tis}^F)$$

come:

$$\frac{dC_{cap}^F}{dt} = \frac{Q_m(C_{art}^T(C_{art}^F) - C_{cap}^T(C_{cap}^F)) - PS_{cap}(C_{cap}^F - C_{tis}^F)}{\gamma_{cap}V_{cap}}$$

(A.6)

Allo stesso modo si può esprimere l'equazione (2)

$$V_{tis} \frac{dC_{tis}^T}{dt} = PS(t)(C_{cap}^F - C_{tis}^F) - UO_{2m}(t)$$

come:

$$\frac{dC_{tis}^F}{dt} = \frac{PS(C_{cap}^F - C_{tis}^F) - UO_{2m}}{\gamma_{tis}V_{tis}}$$

(A.7)

Il modello a due compartimenti del trasporto di ossigeno e del metabolismo simula i cambiamenti dinamici della concentrazione di ossigeno nel sangue capillare e nelle cellule tissutali all'interno del muscolo scheletrico durante l'esercizio. Pertanto, sotto questa ipotesi, $C_{cap}^F(t)$ è equivalente alla concentrazione di ossigeno libero alla fine del capillare, pari alla concentrazione di ossigeno venoso.

3.3 Bilancio della reazione metabolica

I processi della reazione metabolica della fosforilazione ossidativa durante lo stimolo di un esercizio possono essere espressi come la dinamica della concentrazione di ATP e PCr:

$$\frac{dC_{ATP}}{dt} = -\phi_{ATPase} + \beta\phi_{OxPhos} - \phi_{CK}^r + \phi_{CK}^f \quad (3)$$

Nell'equazione C_{ATP} indica la concentrazione di ATP nel tessuto, ϕ_{ATPase} il flusso della reazione dell'enzima ATPase, ϕ_{OxPhos} il flusso della fosforilazione ossidativa, ϕ_{CK}^r il flusso della reazione inversa della creatina chinasi, ϕ_{CK}^f il flusso della reazione diretta della creatina chinasi.

Il bilancio dell'equazione (3) esprime che la quantità di ATP che si accumula nel tessuto dipende dai flussi delle reazioni metaboliche.

L'equazione si giustifica in quanto il processo dell'ATPase scinde l'ATP in ADP e gruppo fosfato, riducendo la produzione di ATP; il processo della fosforilazione ossidativa comporta formazione di ATP; la reazione diretta della CK riduce la formazione di ATP, in quanto fa aumentare la formazione della PCr a partire da Cr, mentre la reazione inversa incrementa la produzione di ATP, in quanto favorisce la scissione di PCr in Cr e gruppo fosfato che si combina con l'ADP formando ATP.

$$\frac{dC_{PCr}}{dt} = \phi_{CK}^r - \phi_{CK}^f \quad (4)$$

L'equazione (4) esprime che la quantità di fosfocreatina che si accumula nel tessuto è bilanciata dalla quantità di fosfocreatina che si forma tramite la reazione diretta della CK e dalla quantità di fosfocreatina che è scissa tramite la reazione inversa della creatina chinasi.

La creatina chinasi è l'enzima responsabile del trasferimento del gruppo fosfato dalla fosfocreatina all'ADP.

Nelle equazioni β è il rapporto "in vivo" P su O_2 e i flussi di reazione ϕ_j sono funzioni delle concentrazioni di ATP e PCr, che devono soddisfare i bilanci di massa per la conservazione dell'adenosina e della creatina:

$$C_{A,tot} = C_{ADP} + C_{ATP}$$

(5)

L'equazione (5) esprime che la concentrazione totale di adenosina, $C_{A,tot}$, è data dalla somma delle concentrazioni di adenosindifosfato, C_{ADP} , e adenosintrifosfato, C_{ATP} .

$$C_{Cr,tot} = C_{Cr} + C_{PCr}$$

(6)

L'equazione (6) esprime che la concentrazione totale di creatina, $C_{Cr,tot}$, è data dalla somma delle concentrazioni della creatina, C_{Cr} , e della fosfocreatina, C_{PCr} .

Il flusso metabolico dell'ossigeno dipende in modo non lineare dalla concentrazione di ADP e dalla concentrazione di ossigeno:

$$\phi_{OxPhos} = V_{max}^j \left(\frac{C_{ADP}}{K_{ADP} + C_{ADP}} \right) \left(\frac{C_{tis}^F}{K_m + C_{tis}^F} \right)$$

(7)

Nell'equazione (7): V_{max}^j , il coefficiente del flusso massimo della fosforilazione ossidativa dipende dall'intensità dell'esercizio (j), C_{ADP} rappresenta la concentrazione di ADP nei tessuti, C_{tis}^F rappresenta la concentrazione libera di ossigeno nei tessuti, K_{ADP} rappresenta la costante della CK, K_m rappresenta la costante di Michaelis Menten.

Il flusso metabolico per la reazione ATPase è proporzionale alla concentrazione di ATP:

$$\phi_{ATPase} = k_{ATPase}^j C_{ATP}$$

(8)

L'equazione (8) esprime che il flusso della reazione ATPase dipende dalla velocità della reazione, k_{ATPase}^j , che varia con l'intensità dell'esercizio, e dalla concentrazione di ATP nei tessuti.

I flussi della reazione diretta e inversa di CK dipendono in maniera non lineare dalle concentrazioni di Cr, PCr, ADP e ATP:

$$\phi_{CK}^r = \frac{V_{CK}^r \left(\frac{C_{Cr} C_{ATP}}{K_{iq} K_p} \right)}{1 + \frac{C_{ADP}}{K_{ia}} + \frac{C_{ATP}}{K_{iq}} + \frac{C_{PCr}}{K_{ib}} + \frac{C_{ADP} C_{PCr}}{K_b K_{ia}} + \frac{C_{Cr} C_{ATP}}{K_{iq} K_p}} \quad (9)$$

$$\phi_{CK}^f = \frac{V_{CK}^f \left(\frac{C_{ADP} C_{PCr}}{K_b K_{ia}} \right)}{1 + \frac{C_{ADP}}{K_{ia}} + \frac{C_{ATP}}{K_{iq}} + \frac{C_{PCr}}{K_{ib}} + \frac{C_{ADP} C_{PCr}}{K_b K_{ia}} + \frac{C_{Cr} C_{ATP}}{K_{iq} K_p}} \quad (10)$$

Nelle equazioni (9) e (10) i parametri K_{ia} , K_{iq} , K_{ib} , K_p rappresentano le costanti della CK.

I contributi della glicolisi alla sintesi dell'ATP non sono inclusi nel modello matematico, come dimostra l'Eq.3 a questo stadio di sviluppo del modello.

Quindi, i risultati ottenuti dalle simulazioni con questo modello incompleto necessitano pertanto di essere interpretati.

I processi di reazione metabolica, equazioni (3) e (4) sono relazionati ai processi di trasporto di massa, equazioni (1) e (2), attraverso le velocità del metabolismo dell'ossigeno, ϕ_{OxPhos} , e dell'utilizzo di ossigeno:

$$\phi_{OxPhos} V_{tis} = UO_{2m}^j \quad (11)$$

Nell'equazione (11), V_{tis} è il volume dei tessuti e UO_{2m}^j è l'intensità di utilizzo dell'ossigeno nel muscolo, che dipende dall'intensità di esercizio j .

Il volume muscolare totale è definito come $V_m = V_{cap} + V_{tis}$ dove V_m è stimato come una frazione dell'intera massa del corpo (49%) e V_{cap} , V_{tis} sono entrambe stimate come una frazione di V_m .

3.4 Funzioni dipendenti dall'intensità di esercizio

Incrementando l'intensità dell'esercizio dalla condizione stazionaria di riscaldamento, la dinamica della risposta del flusso sanguigno muscolare Q_m^j all'intensità di esercizio j si assume abbia andamento esponenziale:

$$Q_m^j(t) = Q_m^W + \Delta Q_m^j [1 - e^{-\frac{(t^W - t)}{\tau_{Q_m^j}}}] \quad (12)$$

Nell'equazione (12) Q_m^W rappresenta il valore di stato costante durante il riscaldamento, ΔQ_m^j rappresenta la variazione del flusso sanguigno, $\tau_{Q_m^j}$ è la costante di tempo del flusso sanguigno muscolare, t^W è l'istante di tempo iniziale. In risposta all'esercizio, il flusso sanguigno aumenta, poiché incrementa l'intensità di trasporto tra i capillari e i tessuti:

$$PS^j(t) = PS^R + \Delta PS [1 - e^{-\frac{(Q_m^R - Q_m^j)}{Q_c}}] \quad (13)$$

Dove ΔPS , la variazione della permeabilità di superficie, è espressa dalla differenza tra il parametro PS^E , che rappresenta il valore della permeabilità di superficie durante l'esercizio e il parametro PS^R , che rappresenta il valore della permeabilità di superficie in condizioni di riposo.

Q_c esprime la costante del flusso sanguigno muscolare.

$$\Delta PS = PS^E - PS^R.$$

PS^R e Q_c sono costanti.

In questo modello il trasporto di massa dell'ossigeno tra il sangue dei capillari e il tessuto dipende dal parametro PS , che varia in funzione del flusso sanguigno

muscolare, come dimostra l'equazione sopra. A sua volta il flusso sanguigno muscolare varia in funzione dell'intensità dell'esercizio.

La dipendenza di PS da Q_m^j permette al modello di simulare le condizioni di riposo di esercizio.

Il coefficiente PS nelle simulazioni deve essere mantenuto ad un valore sufficientemente alto per garantire un rifornimento di ossigeno sufficiente per la contrazione delle fibre muscolari per far fronte alla richiesta di energia a tutte le intensità, non curanti se è avvenuto un reclutamento capillare durante l'esercizio o solo un aumento nel flusso sanguigno attraverso i capillari già reclutati.

Il parametro Q_c , che influisce sulla relazione $PS - Q_m^j$, deve essere sufficientemente piccolo, così che le simulazioni delle differenze di ossigeno arterioso e venoso si manifestino nell'incremento del flusso sanguigno in funzione dell'intensità dell'esercizio.

3.5 Simulazione di modello

Per confrontare le risposte dell'ossigeno simulate e sperimentali, ottenute da esperimenti sull'uomo con esercizi a diverse intensità, la saturazione dell'ossigeno è stata così espressa:

$$StO_{2m} = [C_{cap}^B V_{cap} + C_{tis}^B V_{tis}] / T_m \quad (14)$$

I parametri T_m (che rappresenta la quantità totale di emoglobina e mioglobina), V_{cap} e V_{tis} sono costanti indipendenti dall'intensità dell'esercizio. Le condizioni iniziali per le simulazioni delle risposte dinamiche sono specifiche per lo stato stazionario di riscaldamento:

$$t = t^W, \quad C_{cap}^F = C_{cap}^{F,W}, \quad C_{tis}^F = C_{tis}^{F,W}, \quad C_{ATP} = C_{ATP}^W, \quad C_{PCr} = C_{PCr}^W \quad (15)$$

Per simulare le risposte all'esercizio, il modello di equazioni è stato risolto numericamente attraverso un complesso algoritmo per equazioni differenziali.

I valori delle concentrazioni in condizioni stazionarie, a tutte le intensità di esercizio j devono soddisfare le seguenti equazioni:

$$0 = Q_m^j (C_{art}^T - C_{cap}^{T,j}(C_{cap}^{F,j})) - PS^j (C_{cap}^{F,j} - C_{tis}^{F,j}) \quad (\text{A.8})$$

$$0 = PS^j (C_{cap}^{F,j} - C_{tis}^{F,j}) - UO_{2m}^j \quad (\text{A.9})$$

$$0 = \beta \phi_{OxPhos}(C_{ADP}^j, C_{tis}^{F,j}) - \phi_{ATPase}(C_{ADP}^j) \quad (\text{A.10})$$

$$0 = \phi_{CK}^r(C_{ADP}^j, C_{ATP}^j, C_{Cr}^j, C_{PCr}^j) - \phi_{CK}^f(C_{ADP}^j, C_{ATP}^j, C_{Cr}^j, C_{PCr}^j) \quad (\text{A.11})$$

$$C_{A,tot} = C_{ADP}^j + C_{ATP}^j \quad (\text{A.12})$$

$$C_{Cr,tot} = C_{Cr}^j + C_{PCr}^j \quad (\text{A.13})$$

Queste sei equazioni coinvolgono otto concentrazioni.

Dunque ad ogni intensità j si devono specificare due concentrazioni e risolvere le altre sei equazioni.

A riposo, $j=R$, si può specificare C_{ATP}^R e $C_{Cr,tot}$, poi risolvere le altre concentrazioni includendo $C_{A,tot}$.

In condizione di riscaldamento, $j=W$, si può specificare $C_{A,tot}$ e $C_{Cr,tot}$, poi risolvere le altre concentrazioni, includendo $C_{cap}^{F,W}$, $C_{tis}^{F,W}$, C_{ATP}^W , C_{PCr}^W .

CAPITOLO 4. STIMA DEI PARAMETRI

I valori della maggior parte dei parametri nelle equazioni del modello descritte nel capitolo 3, sono riportati nelle tabelle 1A, B, e 2 [Lai e altri, 2007].

Altri valori sono stati valutati direttamente da relazioni di stato stazionario (k_{ATPase}^j , PS^R) (tabella 3) o da stime ottime (ΔQ_m^j , V_{max}^j) (tabella 4).

4.1 Valutazione della costante di velocità della ATPase, k_{ATPase}^j , con l'ipotesi di stato stazionario.

Dagli esperimenti sono determinati i valori di V_{tis} e UO_{2m}^j così che ad ogni intensità di esercizio sia possibile valutare ϕ_{OxPhos} dall'equazione (11).

Sotto le seguenti ipotesi:

- a. di stato stazionario;
- b. assumendo $\beta=6$;

le equazioni (3) e (4) possono essere semplificate a:

$$0 = -\phi_{ATPase} + 6\phi_{OxPhos} \quad (16)$$

In quanto per l'ipotesi di stato stazionario in entrambe le equazioni si possono porre uguale a zero le derivate rispetto al tempo rispettivamente della concentrazione di ATP e di PCr. In tal modo risulta dalla equazione (4) che:

$$0 = \phi_{CK}^r - \phi_{CK}^f$$

Quindi

$$\phi_{CK}^r = \phi_{CK}^f$$

E sostituendo questo risultato e il valore 6 a β nell'equazione (3), si ottiene l'espressione semplificata dell'equazione (16).

Combinando l'equazione (16) con l'equazione (8) e attribuendo alla C_{ATP} un valore costante, dovuto all'omeostasi dell'ATP, è possibile valutare la k_{ATPase}^j (vedi tabella 3).

$$\begin{cases} 0 = -\phi_{ATPase} + 6\phi_{OxPhos} \\ \phi_{ATPase} = k_{ATPase}^j C_{ATP} \end{cases}$$

4.2 Valutazione del coefficiente di permeabilità, PS^R , con l'ipotesi di stato stazionario.

Per calcolare PS^R , si considerano le equazioni (1) e (2) :

$$\begin{cases} V_{cap} \frac{dC_{cap}^T}{dt} = Q_m(t)(C_{art}^T - C_{cap}^T) - PS(t)(C_{cap}^F - C_{tis}^F) \\ V_{tis} \frac{dC_{tis}^T}{dt} = PS(t)(C_{cap}^F - C_{tis}^F) - UO_{2m}(t) \end{cases}$$

Facciamo l'ipotesi di :

- a. Stato stazionario in condizioni di riposo

così si può riscrivere il sistema come:

$$\begin{cases} 0 = Q_m^R(C_{art}^T - C_{cap}^T) - PS^R(C_{cap}^F - C_{tis}^F) \\ 0 = PS^R(C_{cap}^F - C_{tis}^F) - UO_{2m}^R \end{cases} \quad (17)$$

(18)

Dagli esperimenti sono determinati: C_{art}^T , $C_{tis}^{F,R}$, Q_m^j e UO_{2m}^R . E' possibile stimare PS^R e $C_{cap}^{F,R}$ risolvendo contemporaneamente le equazioni (17) e (18), e incorporando la relazione $C_{cap}^{T,R}$ ($C_{cap}^{F,R}$).

4.3 Valutazione della variazione del flusso sanguigno muscolare, ΔQ_m^j , e della velocità massima della fosforilazione ossidativa, V_{max}^j , tramite una stima ottimale.

I parametri ΔQ_m^j e V_{max}^j devono essere stimati per ogni soggetto e per ogni intensità di esercizio. A questo scopo, calcoliamo i valori del parametro che meglio approssima i valori numerici, ottenuti con le equazioni di modello, ai dati ottenuti sperimentalmente. Precisamente, per ogni soggetto, ad ogni intensità di esercizio si minimizza la funzione oggetto usando un algoritmo non lineare:

$$\Gamma(\Delta Q_m^j, V_{max}^j) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \left[\left(\frac{StO_{2m}(t_i) - StO_{2m}^W}{StO_{2m}^W} \right)_{exp} - \left(\frac{StO_{2m}(t_i) - StO_{2m}^W}{StO_{2m}^W} \right)_{mod} \right]^2 \quad (19)$$

Dove N è il numero dei dati.

TABELLA 1.

(A) Valori dell'utilizzo di ossigeno muscolare, UO_{2m}^j e del consumo di ossigeno polmonare, VO_{2p}^j (mmol min^{-1}) a diverse intensità di esercizio ($j=R, W, M, H, V$).

(B) Valori del flusso sanguigno Q_m^j (L min^{-1}) a diverse intensità di esercizio ($j=R, W$), tempi di risposta $\tau_{Q_m}^j$ (s) ($j=M, H, V$) e volumi dei compartimenti V (L) per le simulazioni di modello.

Panel A						
Muscle oxygen utilization UO_{2m}^j						
Parameter	UO_{2m}^R	UO_{2m}^W	UO_{2m}^M	UO_{2m}^H	UO_{2m}^V	
Mean \pm SD	2 ± 0.2	15 ± 4	58 ± 18	83 ± 18	109 ± 13	
Pulmonary oxygen uptake VO_{2p}^j						
Parameter	VO_{2p}^R	VO_{2p}^W	VO_{2p}^M	VO_{2p}^H	VO_{2p}^V	
Mean \pm SD	9.8 ± 0.9	23.6 ± 3.5	70.7 ± 17	96 ± 15	122 ± 11.6	
Panel B						
Parameter	Q_m^R	Q_m^W	$\tau_{Q_m}^M$	$\tau_{Q_m}^H$	$\tau_{Q_m}^V$	V_{cap}
Mean \pm SD	0.8 ± 0.1	3.4 ± 0.4	21.3 ± 2	24 ± 1	24 ± 1	2.3 ± 0.3
						V_{tis}
						31 ± 5

(Riprodotta da Lai e altri, 2007)

TABELLA 2. Valori dei parametri di modello per le simulazioni di tutti gli esperimenti.

Transport model			Metabolic model		
Notation	Unit	Value	Notation	Unit	Value
K_{Hb}	$(\text{mM})^{-2.7}$	7800.7	$C_{Cr,tot}$	(mM)	42
K_{Mb}	$(\text{mM})^{-1}$	308.6	C_{ATP}^R	(mM)	8.2
C_{art}^F	(mM)	0.135	V_{CK}	(mM min^{-1})	3008.6
$C_{tis}^{F,R}$	(mM)	3.375×10^{-2} ³⁰	V_{CK}^R	(mM min^{-1})	6000
$C_{rbc,Hb}$	(mM)	5.18	K_b	(mM)	1.11
$C_{mc,Mb}$	(mM)	0.5	K_p	(mM)	3.8
Hct	(-)	0.45	K_{ia}	(mM)	0.135
Q_C	(L min^{-1})	8^a	K_{ib}	(mM)	3.9
V_{cap}	(L)	$7\% V_m$	K_{iq}	(mM)	3.5
V_{tis}	(L)	$93\% V_m$	K_{ADP}	(mM)	0.058
W_{mc}	(-)	0.75	K_m	(mM)	7×10^{-4} ¹⁷
PS^E	(L min^{-1})	20,000			

^a This work.

(Riprodotta da Lai e altri, 2007)

TABELLA 3. (n=7) Coefficienti medi della velocità della reazione ATPase K_{ATPase}^j (min^{-1}) a diverse intensità di esercizio (j=R, W,M,H,V) e della permeabilità a riposo (L min^{-1}).

Parameter	K_{ATPase}^R	K_{ATPase}^W	K_{ATPase}^M	K_{ATPase}^H	K_{ATPase}^V	PS^R
Mean \pm SD	0.048 ± 0.008	0.36 ± 0.04	1.4 ± 0.3	2 ± 0.3	2.6 ± 0.4	113 ± 26

(Riprodotta da Lai e altri, 2007)

TABELLA 4. (n=7) Valori medi dei parametri in funzione dell'intensità dell'esercizio j=M,H,V: cambiamento nel flusso sanguigno muscolare ΔQ_m^j (L min^{-1}) dalla condizione di riscaldamento; velocità massima della fosforilazione ossidativa V_{max}^j (mM min^{-1}).

Parameter	ΔQ_m^M	ΔQ_m^H	ΔQ_m^V	V_{max}^M	V_{max}^H	V_{max}^V
Mean \pm SD	5.6 ± 2.2	7.6 ± 2	9.7 ± 2	45 ± 15	45 ± 15	44 ± 16

(Riprodotta da Lai e altri, 2007)

CAPITOLO 5. RISULTATI

Le simulazioni, effettuate a diverse intensità di esercizio, rappresentano la dinamica delle risposte di:

- 1- Concentrazione di ATP nel muscolo;
- 2- Concentrazione della PCr nel muscolo;
- 3- Saturazione di ossigeno, StO_{2m} ;
- 4- Velocità del flusso dell'ATPase (ϕ_{ATPase});
- 5- Velocità del flusso della fosforilazione ossidativa (ϕ_{OxPhos});
- 6- Velocità del flusso netto della CK ($\phi_{CK}^r - \phi_{CK}^f$).

Adattando i valori della StO_{2m} ottenuti dalle simulazioni, ai dati sperimentali, sono state calcolate le stime ottimali per la velocità di flusso massimale della fosforilazione ossidativa V_{max}^j e i valori delle variazioni del flusso sanguigno muscolare ΔQ_m^j , di sette soggetti sottoposti a intensità di esercizio $j=M,H,V$.

Le sigle delle intensità di esercizio corrispondono a:

M=moderate, intensità moderata;

H=heavy, intensità pesante;

V=very heavy, intensità molto pesante.

Le costanti di tempo medie ottenute dalle simulazioni di modello (τ_{VO2m} , τ_{UO2m} , τ_{PCr}) sono state attribuite rispettivamente:

- a. al consumo di ossigeno muscolare;
- b. all'utilizzo di ossigeno muscolare;
- c. alle cinetiche della PCr.

5.1 RAPPRESENTAZIONE GRAFICA DELL'ANDAMENTO NEL TEMPO DELLA SATURAZIONE DELL'OSSIGENO.

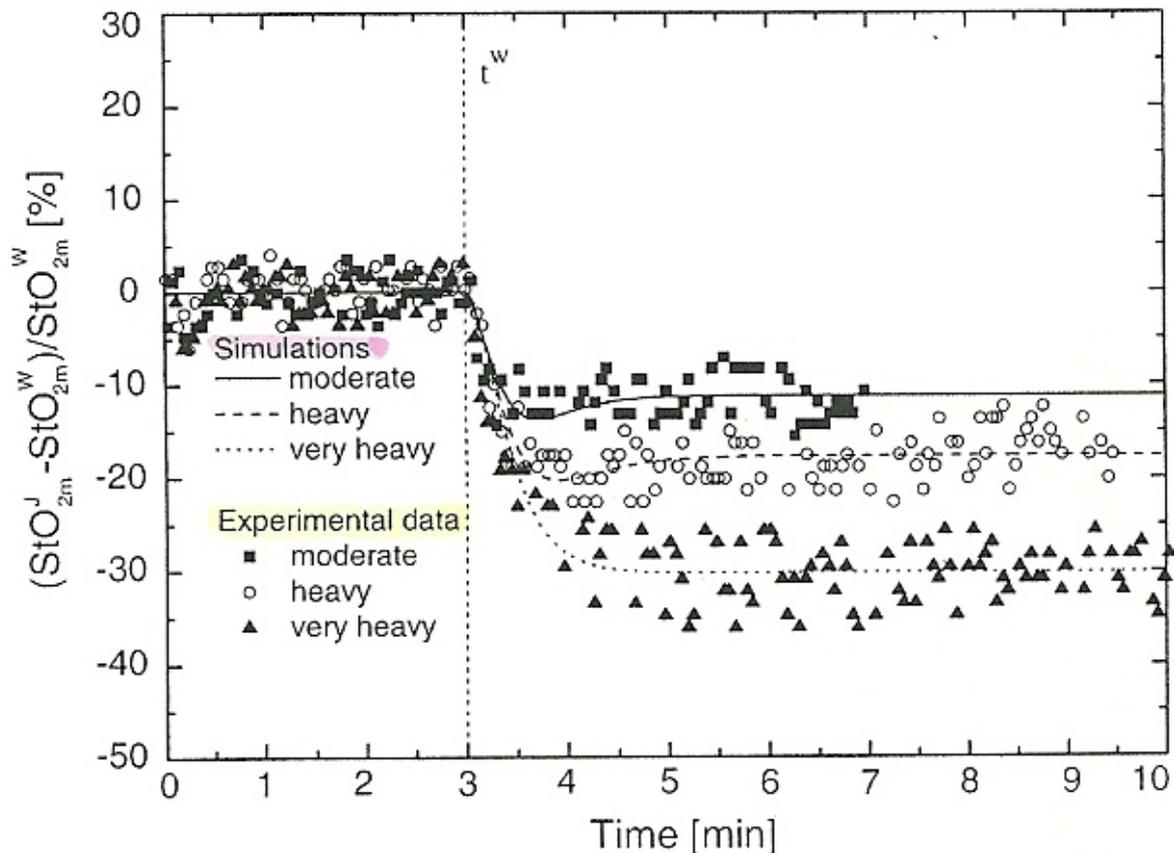


FIGURA 2. Saturazione dell'ossigeno nel muscolo, StO_{2m}^J : risposte del soggetto a cambiamenti a gradino dalla condizione a regime di riscaldamento (W) alla condizione di regime durante esercizio moderato, intenso, molto intenso ($j= M,H,V$). Le simulazioni di modello sono confrontate con i dati sperimentali.

(Riprodotta da Lai e altri, 2007)

Con StO_{2m}^W si indica la saturazione dell'ossigeno nello stato stazionario di riscaldamento.

Con StO_{2m}^J si indica la saturazione dell'ossigeno a diverse intensità di esercizio.

Dal grafico è possibile notare che la saturazione dell'ossigeno, StO_{2m} , risponde con un andamento a gradino passando dalla condizione di riposo stazionaria a un

incremento dell'intensità di esercizio. Il decremento della StO_{2m} è maggiore per intensità di esercizio più pesanti.

È possibile giustificare questo decremento, considerando che, passando da una condizione di riposo e tanto più all'aumentare dell'intensità dell'esercizio, il muscolo necessita di una maggior quantità di energia, perciò serve ossigeno libero che possa partecipare alla fosforilazione ossidativa per produrre nuovo ATP.

5.2 RAPPRESENTAZIONE GRAFICA DELL'ASSORBIMENTO DI OSSIGENO POLMONARE E DELL'UTILIZZO DI OSSIGENO MUSCOLARE.

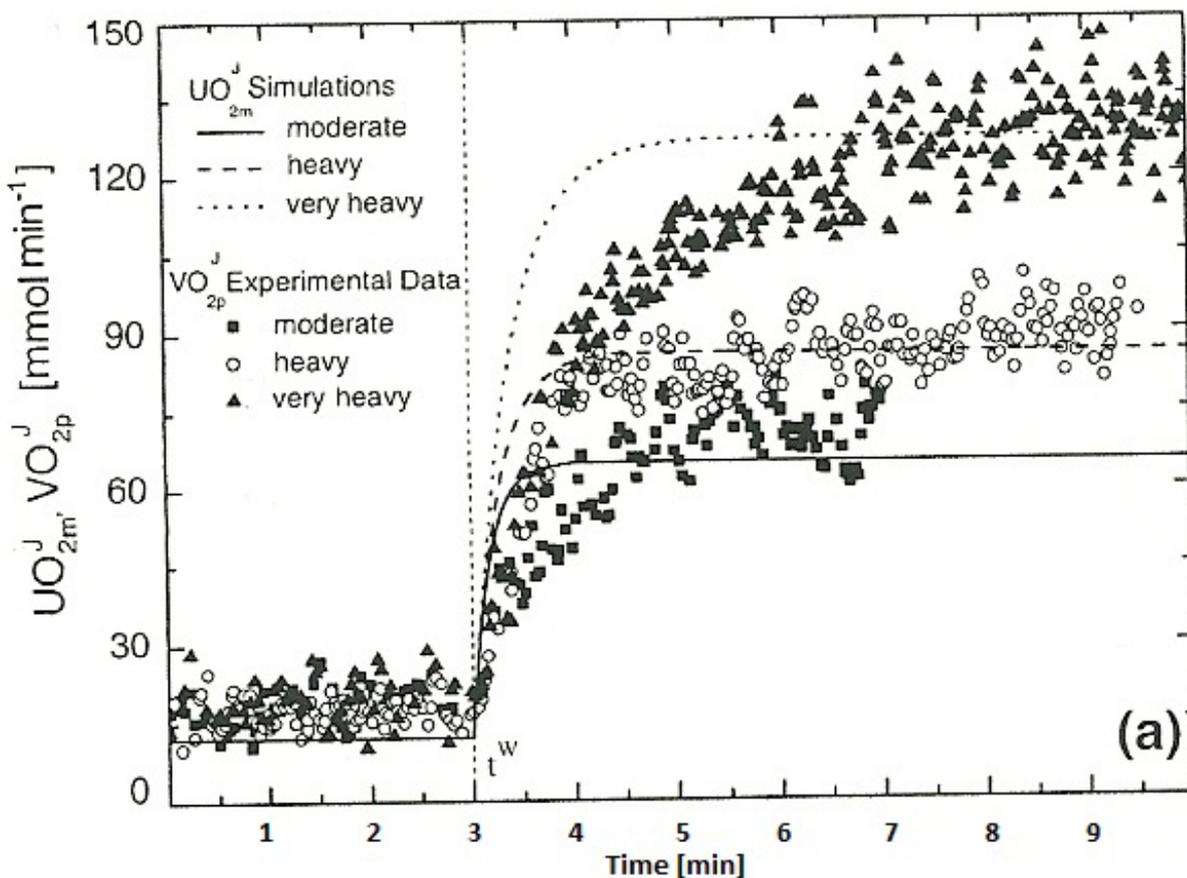


FIGURA 3a. Confronto tra le dinamiche del consumo di ossigeno polmonare sperimentale VO_{2p}^j e dell'utilizzo di ossigeno muscolare simulato UO_{2m}^j per un

soggetto, passando dalla condizione di riscaldamento stazionaria (W) a intensità di esercizio moderata, pesante, molto pesante ($j=M, H, V$).

(Riprodotta da Lai e altri, 2007)

Nella figura 3a sono confrontate le risposte del consumo di ossigeno polmonare ottenute sperimentalmente con quelle simulate del consumo di ossigeno muscolare.

Dal grafico si può notare che passando da una condizione di riposo a intensità di esercizio sempre maggiori, aumentano sia VO_{2p}^j sia UO_{2m}^j , questo è dovuto al fatto che il muscolo necessita di energia per sostenere l'esercizio, perciò i polmoni assorbono una quantità di ossigeno, crescente all'aumentare dell'intensità, che sarà impiegata per produrre ATP.

Le costanti di tempo di UO_{2m}^j sono più veloci delle costanti di tempo di VO_{2m}^j per tutti i soggetti, emerge quindi la predominanza del consumo di ossigeno al fine di produrre di ATP per fosforilazione ossidativa.

Questi tempi di risposta sono riportati nella tabella 5 seguente:

TABELLA 5. (N=7) Costanti di tempo medie per le diverse intensità di esercizio $j=M,H,V$ del consumo di ossigeno muscolare $\tau_{VO_{2m}}^j$ (s), dell'utilizzo di ossigeno muscolare $\tau_{UO_{2m}}^j$ (s), della dinamica del PCr τ_{PCr}^j (s).

Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
$\tau_{VO_{2m}}^M$ 18 \pm 3	$\tau_{VO_{2m}}^H$ 18 \pm 2	$\tau_{VO_{2m}}^V$ 20 \pm 3
$\tau_{UO_{2m}}^M$ 14 \pm 3	$\tau_{UO_{2m}}^H$ 15 \pm 4	$\tau_{UO_{2m}}^V$ 18 \pm 4
τ_{PCr}^M 14 \pm 3	τ_{PCr}^H 15 \pm 4	τ_{PCr}^V 18 \pm 4

(Riprodotta da Lai e altri, 2007)

Dalla tabella si legge che:

1. se il soggetto è sottoposto ad un esercizio di intensità moderata la costante di tempo del consumo di ossigeno muscolare $\tau_{VO_{2m}}$ è pari a 18 \pm 3 secondi, mentre la costante di tempo dell'utilizzo di ossigeno muscolare $\tau_{UO_{2m}}$ è pari a 14 \pm 3 secondi;

2. se il soggetto è sottoposto ad un esercizio di intensità pesante la costante di tempo del consumo di ossigeno muscolare $\tau_{VO_{2m}}$ è pari a 18 ± 2 secondi, mentre la costante di tempo dell'utilizzo di ossigeno muscolare $\tau_{UO_{2m}}$ è pari a 15 ± 4 secondi;
3. se il soggetto è sottoposto ad un esercizio di intensità molto pesante la costante di tempo del consumo di ossigeno muscolare $\tau_{VO_{2m}}$ è pari a 20 ± 3 secondi, mentre la costante di tempo dell'utilizzo di ossigeno muscolare $\tau_{UO_{2m}}$ è pari a 18 ± 4 secondi.

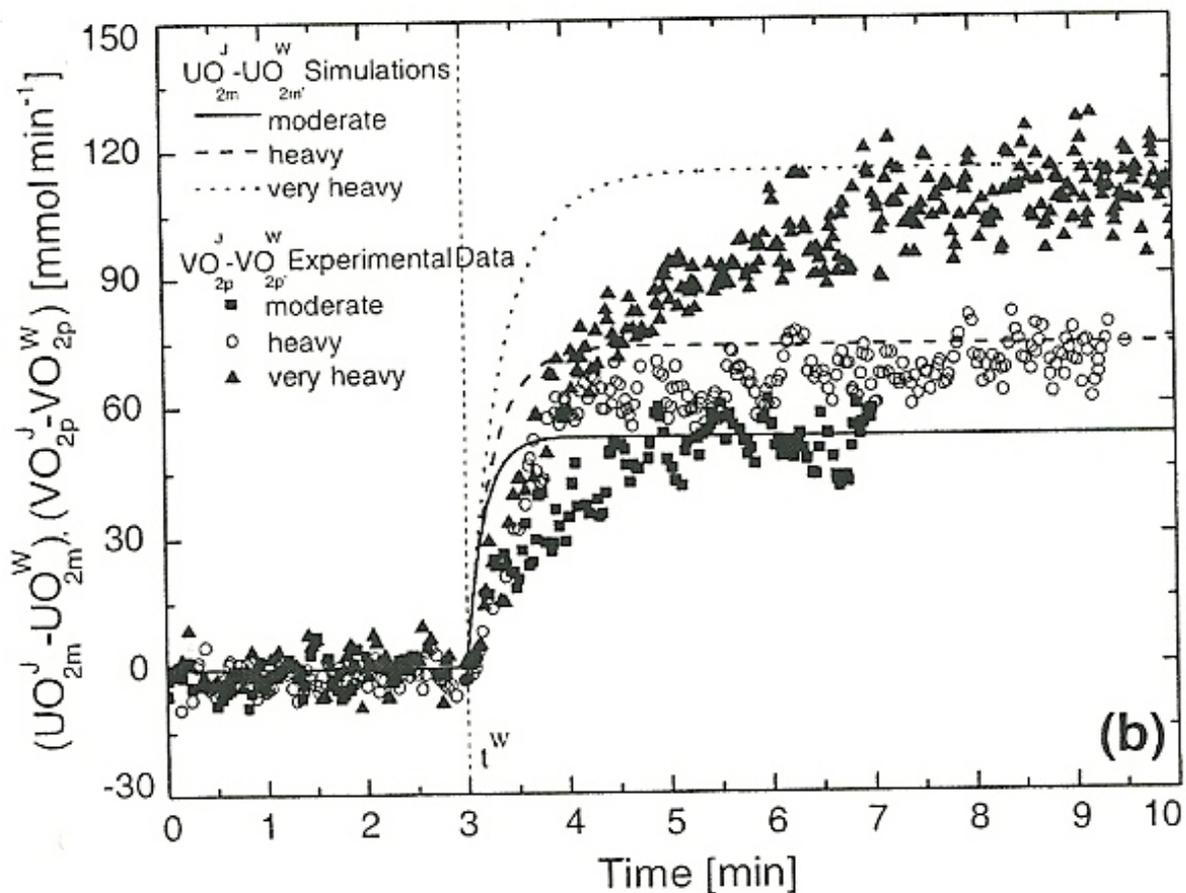


FIGURA 3b. Confronto tra le dinamiche del consumo di ossigeno polmonare sperimentale e dell'utilizzo di ossigeno muscolare simulato per un soggetto. In particolare sono rappresentate le variazioni dallo stato stazionario di riscaldamento alle diverse intensità di esercizio, rispettivamente del consumo di ossigeno polmonare $VO_{2p}^j - VO_{2p}^w$ e dell'utilizzo di ossigeno muscolare $UO_{2m}^j - UO_{2m}^w$.

(Riprodotta da Lai e altri, 2007)

Dalle figure 3a e 3b deduciamo che la costante di tempo $\tau_{UO_{2m}}$ dell'utilizzo di ossigeno muscolare simulato, UO_{2m} , che indichiamo anche come ϕ_{OxPhos} , è sempre più veloce della costante di tempo $\tau_{VO_{2p}}^j$ del consumo di ossigeno polmonare misurato, VO_{2p} , a tutte le intensità di esercizio.

È stato calcolato che, quando il soggetto è sottoposto ad un esercizio di intensità moderata la costante di tempo $\tau_{VO_{2p}}^j$ assume i valori 65 ± 7 s; quando l'esercizio è di intensità pesante la costante di tempo $\tau_{VO_{2p}}^j$ assume i valori 100 ± 24 s; infine quando l'esercizio passa a intensità molto pesante la costante di tempo $\tau_{VO_{2p}}^j$ assume i valori 82 ± 31 s.

Tuttavia, $\tau_{UO_{2m}}$ basata sul modello di simulazione nel quale ϕ_{OxPhos} dipende dalla concentrazione di ossigeno, come descritto dall'equazione 7,

$$\phi_{OxPhos} = V_{max}^j \left(\frac{C_{ADP}}{K_{ADP} + C_{ADP}} \right) \left(\frac{C_{tis}^F}{K_m + C_{tis}^F} \right)$$

è di 2-3 secondi maggiore rispetto alla $\tau_{UO_{2m}}$ calcolato attraverso una funzione esponenziale derivata empiricamente per UO_{2m} . Questa differenza vien meno quando ϕ_{OxPhos} non include la dipendenza dall'ossigeno. Che ϕ_{OxPhos} sia dipendente dall'ossigeno è evidente in corrispondenza di bassi valori della concentrazione di ossigeno, specialmente ad alte intensità di esercizio.

5.3 Indipendenza di V_{max}^j da j e dipendenza di ΔQ_m^j da j.

Sottoponendo sette soggetti ad esercizi che variano in intensità, e misurando i valori di V_{max}^j corrispondenti ai vari livelli di intensità, si è notato che questo parametro non dipende dall'intensità dell'esercizio. Come si può notare dalla Tabella 4, il flusso massimale della fosforilazione ossidativa assume in tutti e tre i casi di intensità media, pesante, molto pesante il valore di 45 (mM min^{-1}).

TABELLA 4. (n=7) Valori dei parametri in funzione dell'intensità dell'esercizio j=M,H,V: cambiamento nel flusso sanguigno muscolare ΔQ_m^j (L min⁻¹) dalla condizione di riscaldamento; velocità massima della fosforilazione ossidativa V_{max}^j (mM min⁻¹).

Parameter	ΔQ_m^M	ΔQ_m^H	ΔQ_m^V	V_{max}^M	V_{max}^H	V_{max}^V
Mean \pm SD	5.6 \pm 2.2	7.6 \pm 2	9.7 \pm 2	45 \pm 15	45 \pm 15	44 \pm 16

(Riprodotta da Lai e altri, 2007)

Al contrario il parametro ΔQ_m^j incrementa di circa l'80% all'aumentare dell'intensità dell'esercizio. Come si può notare dalla tabella 4, il flusso sanguigno muscolare assume un valore pari a:

- 5.6 \pm 2.2 (L min⁻¹) per esercizi di intensità moderata;
- 7.6 \pm 2 (L min⁻¹) per esercizi di intensità pesante;
- 9.7 \pm 2 (L min⁻¹) per esercizi di intensità molto pesante.

5.4 Rappresentazione grafica dei flussi metabolici dell'ATPase, della fosforilazione ossidativa, della creatina chinasi.

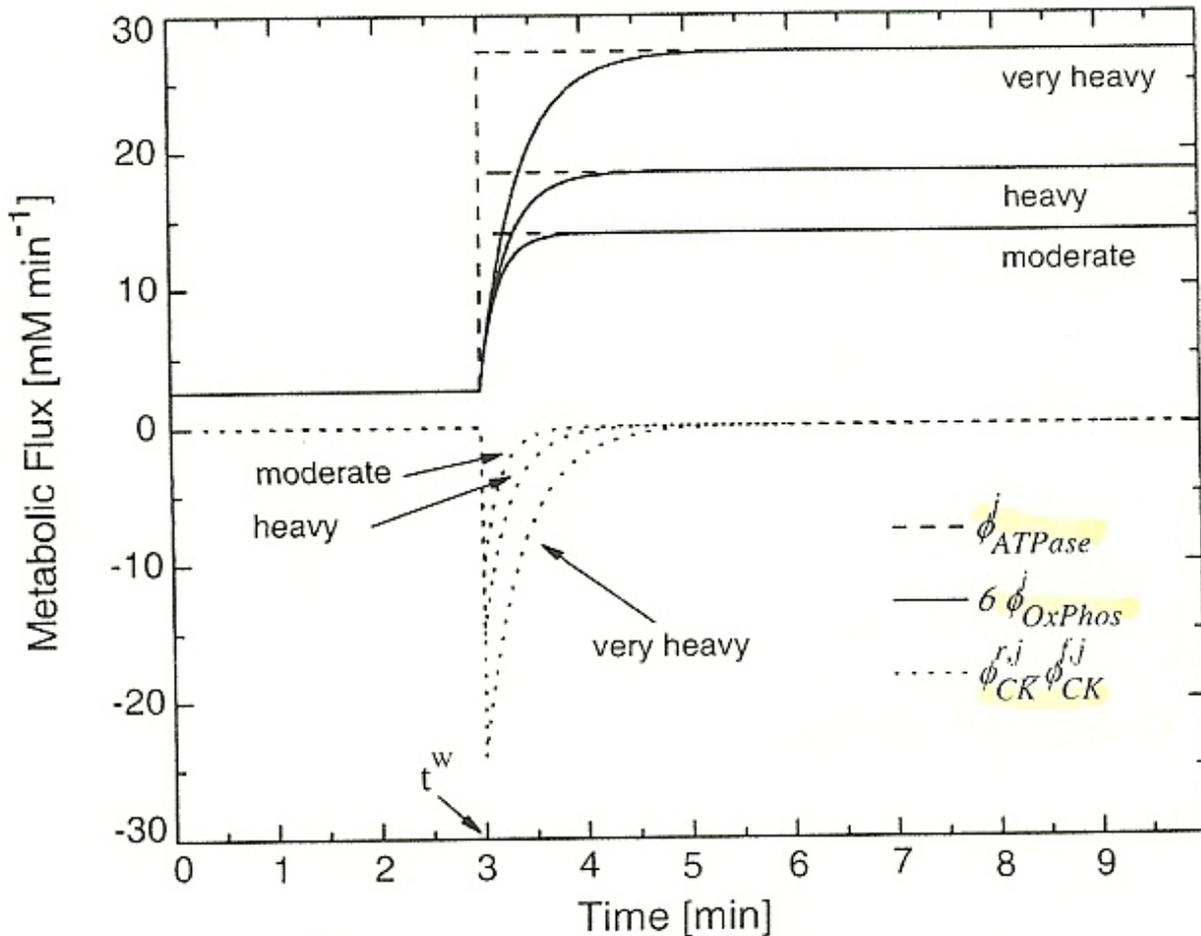


FIGURA 4. Risultati simulati di un soggetto rappresentativo per il flusso dell'ATPase, il flusso della fosforilazione dell'ossigeno ϕ_{OxPhos}^j , il flusso della creatina chinase $\phi_{CK}^{r,j} - \phi_{CK}^{f,j}$. Le simulazioni sono condotte partendo dallo stato stazionario di riscaldamento e raggiungendo i tre livelli d'intensità di esercizio: moderato, pesante, molto pesante ($j=M,H,V$).

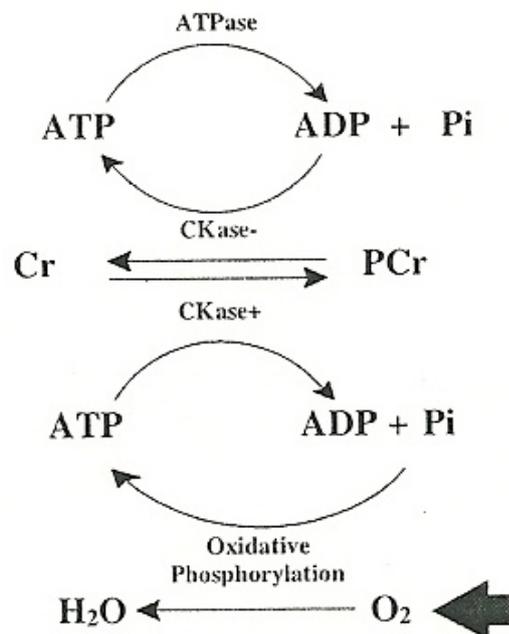
(Riprodotta da Lai e altri, 2007)

Le velocità dei flussi metabolici: ϕ_{OxPhos} e $\phi_{CK}^r - \phi_{CK}^f$, simulati dal modello in risposta ad una variazione a gradino nel flusso dell'ATPase, in funzione dell'intensità dell'esercizio, sono rappresentate in figura 4.

In corrispondenza alla variazione a gradino dell'ATPase, dal grafico è possibile notare l'incremento del flusso della fosforilazione ossidativa, questo perché l'ATPase determina una riduzione nelle riserve di ATP, infatti scinde ATP per liberare energia, necessaria per sostenere l'esercizio, ne consegue allora l'incremento del flusso della fosforilazione ossidativa per formare nuovo ATP e ripristinare l'equilibrio omeostatico.

Il flusso della fosforilazione ossidativa ϕ_{OxPhos} è associato ai flussi metabolici delle reazioni dirette e inverse della creatina chinasi ϕ_{CK}^r , ϕ_{CK}^f , in quanto:

CELLULAR METABOLISM



Dal grafico si nota inoltre, che il flusso della fosforilazione ossidativa ϕ_{OxPhos} (rappresentato dalla linea continua) non riesce a sintetizzare abbastanza velocemente ATP per mantenerne l'omeostasi all'inizio dell'esercizio. Infatti a partire dall'istante t^w il ϕ_{OxPhos} non raggiunge immediatamente i livelli di stato

stazionario che corrispondono alle diverse intensità, bensì li raggiunge dopo un certo intervallo di tempo.

Dal grafico si nota che, a tutte le intensità di esercizio, $6\phi_{OxPhos}$ raggiunge lo stesso stato stazionario del ϕ_{ATPase} , per ripristinare l'equilibrio omeostatico dell'ATP.

Questo risultato è conforme al modello proposto dall'equazione 3:

$$\frac{dC_{ATP}}{dt} = -\phi_{ATPase} + \beta\phi_{OxPhos} - \phi_{CK}^r + \phi_{CK}^f$$

In accordo alla proporzionalità diretta tra ϕ_{OxPhos} e UO_{2m}^j , come dichiara l'equazione 11:

$$\phi_{OxPhos}V_{tis} = UO_{2m}^j$$

La costante di tempo del ϕ_{OxPhos} espressa da $\tau_{UO_{2m}}$ aumenta di circa il 35% passando da un esercizio di intensità moderata a intensità molto pesante, come dimostra la tabella 5.

TABELLA 5. (N=7) Costanti di tempo medie per le diverse intensità di esercizio j=M,H,V del consumo di ossigeno muscolare $\tau_{VO_{2m}}^j$ (s), dell'utilizzo di ossigeno muscolare $\tau_{UO_{2m}}^j$ (s), della dinamica del PCr τ_{PCr}^j (s).

Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
$\tau_{VO_{2m}}^M$ 18 ± 3	$\tau_{VO_{2m}}^H$ 18 ± 2	$\tau_{VO_{2m}}^V$ 20 ± 3
$\tau_{UO_{2m}}^M$ 14 ± 3	$\tau_{UO_{2m}}^H$ 15 ± 4	$\tau_{UO_{2m}}^V$ 18 ± 4
τ_{PCr}^M 14 ± 3	τ_{PCr}^H 15 ± 4	τ_{PCr}^V 18 ± 4

(Riprodotta da Lai e altri, 2007)

Mentre ϕ_{OxPhos} aumenta secondo un andamento monotono fino a raggiungere lo stato costante, $\phi_{CK}^r - \phi_{CK}^f$ mostra inizialmente un decremento a gradino, poi aumenta in maniera esponenziale verso lo zero.

Le risposte dinamiche dei flussi del $\phi_{CK}^r - \phi_{CK}^f$ e del ϕ_{OxPhos} sono strettamente bilanciati al fine di mantenere l'ATP omeostasi.

5.5 Concentrazione dell'ADP

La concentrazione di ADP a regime, C_{ADP} , raggiunta nelle simulazioni durante l'esercizio a tutte le intensità, (figure 2 e 5) aumenta in maniera consistente passando da intensità di esercizio moderata a molto pesante, secondo le seguenti stime:

- a. Intensità moderata: $C_{ADP} = 2,32 \cdot 10^{-3}$ mM;
- b. Intensità pesante: $C_{ADP} = 5,26 \cdot 10^{-3}$ mM;
- c. Intensità molto pesante: $C_{ADP} = 1,45 \cdot 10^{-2}$ mM.

Questi valori della C_{ADP} simulati sono coerenti con i valori della C_{ADP} computati:

- a. Intensità di esercizio moderata: $C_{ADP} = 2,74 \cdot 10^{-3}$ mM;
- b. Intensità di esercizio pesante: $C_{ADP} = 5,94 \cdot 10^{-3}$ mM;
- c. Intensità di esercizio molto pesante: $C_{ADP} = 1,54 \cdot 10^{-2}$ mM

La computazione della C_{ADP} è stata effettuata a regime, durante esercizio a intensità costante, basata sull'ipotesi di equilibrio, usando la costante di equilibrio del CK $K_{eq}=177$ (pH=7, T=38°) e C_{ATP} , C_{PCr} , C_{cr} ottenute da simulazioni usando le espressioni cinetiche per CK (equazioni 9-10).

5.6 Concentrazione dell'ATP e della fosfocreatina PCr

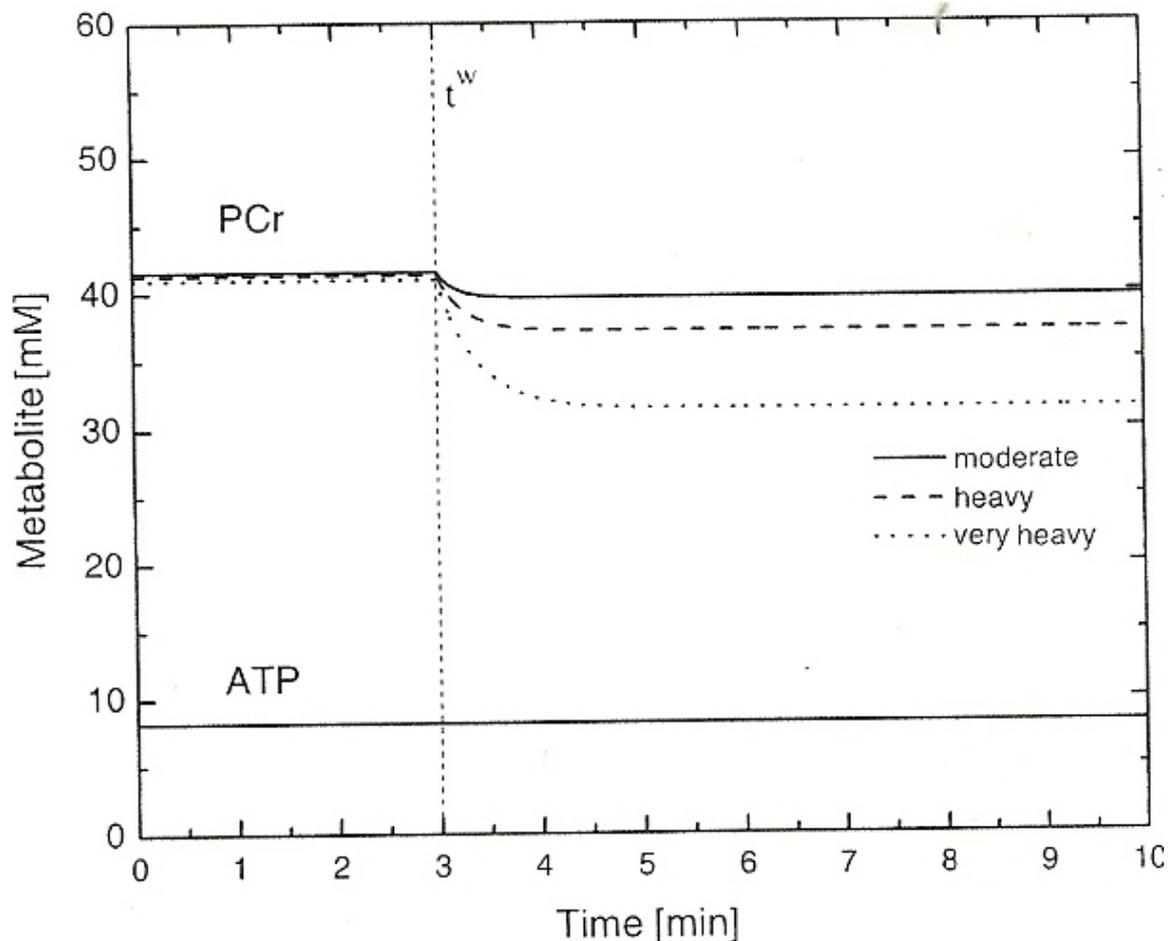


FIGURA 5. Simulazione per un soggetto rappresentativo. E' confrontata la variazione tra la scomposizione della PCr e il consumo di ATP. Le simulazioni sono condotte partendo dalla condizione di stato stazionario di riscaldamento e variando l'intensità dell'esercizio nei tre livelli: moderato, pesante, molto pesante.

(Riprodotta da Lai e altri, 2007)

Dal grafico si può notare che la variazione della concentrazione di ATP è piccola rispetto alla variazione della concentrazione del PCr che cala in corrispondenza alla variazione nell'intensità dell'esercizio. Il tempo di risposta medio del PCr, τ_{PCr} , mostra un cambiamento con l'esercizio che è simile al cambiamento del τ_{UO2m} .

Questo modello descrive come la dinamica della scomposizione netta della fosfocreatina PCr ($\phi_{CK}^r - \phi_{CK}^f$) si manifesta in un calo della concentrazione della PCr (C_{PCr}) per far fronte alla richiesta di ATP (Fig. 5), dato che il flusso della fosforilazione ossidativa ϕ_{OxPhos} non riesce a sintetizzare abbastanza velocemente ATP (Fig.4) per mantenerne l'omeostasi all'inizio dell'esercizio (Fig.5).

Inoltre, le simulazioni di modello sono state condotte assumendo che il parametro di Michaelis-Menten, K_m , sia sufficientemente piccolo in modo che ϕ_{OxPhos} sia indipendente dalla concentrazione di ossigeno.

Infatti consideriamo l'equazione (7) :

$$\phi_{OxPhos} = V_{max}^j \left(\frac{C_{ADP}}{K_{ADP} + C_{ADP}} \right) \left(\frac{C_{tis}^F}{K_m + C_{tis}^F} \right)$$

ipotizzando K_m sufficiente piccolo possiamo trascurare il suo contributo e semplificare a uno il quoziente in cui compare:

$$\phi_{OxPhos} = V_{max}^j \left(\frac{C_{ADP}}{K_{ADP} + C_{ADP}} \right)$$

dimostrando così che ϕ_{OxPhos} non dipende dalla concentrazione di ossigeno, ma dalla concentrazione di ADP.

In risposta all'esercizio, i tempi di risposta medi per l'utilizzo di ossigeno muscolare $\tau_{UO_2m}^j$ e per la cinetica della concentrazione del PCr C_{PCr} , indicati rispettivamente come τ_{UO_2m} e τ_{PCr} , assumono circa gli stessi valori per intensità di esercizio moderato, pesante, molto pesante.

Per intensità di esercizio moderato τ_{UO_2m} e τ_{PCr} sono stimati a 13 secondi.

Per intensità di esercizio pesante τ_{UO_2m} e τ_{PCr} sono stimati a 13 secondi.

Per intensità di esercizio molto pesante τ_{UO_2m} e τ_{PCr} sono stimati a 15 secondi.

Questi tempi di risposta, calcolati con ϕ_{OxPhos} indipendente dall'ossigeno, sono di circa 2-3 secondi più piccoli rispetto a quelli per i quali ϕ_{OxPhos} dipende dalla concentrazione di ossigeno.

Come si può notare dalla tabella 5:

TABELLA 5. (N=7) Costanti di tempo medie per le diverse intensità di esercizio j=M,H,V del consumo di ossigeno muscolare $\tau^j_{VO_{2m}}$ (s), dell'utilizzo di ossigeno muscolare $\tau^j_{UO_{2m}}$ (s), della dinamica del PCr τ^j_{PCr} (s).

Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
$\tau^M_{VO_{2m}}$ 18 \pm 3	$\tau^H_{VO_{2m}}$ 18 \pm 2	$\tau^V_{VO_{2m}}$ 20 \pm 3
$\tau^M_{UO_{2m}}$ 14 \pm 3	$\tau^H_{UO_{2m}}$ 15 \pm 4	$\tau^V_{UO_{2m}}$ 18 \pm 4
τ^M_{PCr} 14 \pm 3	τ^H_{PCr} 15 \pm 4	τ^V_{PCr} 18 \pm 4

(Riprodotta da Lai e altri, 2007)

Inoltre, considerando sempre ϕ_{OxPhos} indipendente dall'ossigeno, i valori medi del V^j_{max} sono così stimati:

- $V^j_{max} = 44 \text{ mM min}^{-1}$ per intensità moderata;
- $V^j_{max} = 43 \text{ mM min}^{-1}$ per intensità pesante;
- $V^j_{max} = 37 \text{ mM min}^{-1}$ per intensità molto pesante.

Confrontiamo questi valori di V^j_{max} con quelli in tabella 4:

TABELLA 4. (n=7) Valori medi dei parametri in funzione dell'intensità dell'esercizio j=M,H,V: cambiamento nel flusso sanguigno muscolare ΔQ^j_m ($L \text{ min}^{-1}$) dalla condizione di riscaldamento; velocità massima della fosforilazione ossidativa V^j_{max} ($mM \text{ min}^{-1}$).

Parameter	ΔQ^M_m	ΔQ^H_m	ΔQ^V_m	V^M_{max}	V^H_{max}	V^V_{max}
Mean \pm SD	5.6 \pm 2.2	7.6 \pm 2	9.7 \pm 2	45 \pm 15	45 \pm 15	44 \pm 16

(Riprodotta da Lai e altri, 2007)

Si può notare che differiscono solo i valori V^j_{max} corrispondenti ad intensità di esercizio molto pesante (j=V).

Poiché V^V_{max} cala da 44 a 37 $mM \text{ min}^{-1}$ senza la dipendenza dall'ossigeno, l'espressione originale per ϕ_{OxPhos} proposta da Vicini e Kushmerick è stata modificata

in questo modello, includendo la dipendenza dall'ossigeno, che è importante ad intensità di esercizio elevate, alle quali la quantità di ossigeno può essere molto bassa e incidere sul metabolismo.

Mentre il tempo di risposta medio del consumo di ossigeno muscolare τ_{VO2m} non è influenzato dalla dipendenza dall'ossigeno, in quanto la concentrazione di ossigeno venoso non ne è molto influenzato. Poiché τ_{VO2m} non è dipendente dall'ossigeno, mentre τ_{UO2m} aumenta con la dipendenza dall'ossigeno, nel modello si assume che l'intensità della produzione di ATP dovuta alla fosforilazione ossidativa è sei volte l'intensità del consumo di ossigeno, che si esprime imponendo $\beta=6$.

Le simulazioni di modello indicano che una riduzione del volume muscolare da 40 a 9 l induce:

- a. grandi cambiamenti del flusso dell'ATPase, del flusso netto di $\phi_{CK}^r - \phi_{CK}^f$, della concentrazione della fosfocreatina, C_{PCr} ;
- b. un aumento di circa il 50% della costante di tempo della cinetica della fosfocreatina, τ_{PCr} , e della costante di tempo dell'utilizzo di ossigeno muscolare, τ_{UO2m} ;
- c. V_{max}^j assume valori compresi tra 45 e 25 mM min^{-1} e risulta indipendente dall'intensità dell'esercizio.

CAPITOLO 6. LIMITAZIONI DEL MODELLO

6.1 Riduzione del volume muscolare

Le simulazioni di modello indicano che una riduzione del volume muscolare attivo, V_m da 40 a 9 l e conseguentemente una riduzione del volume capillare e del volume tissutale (V_{cap} , V_{tis}) coinvolti durante l'esercizio, si ripercuote:

1. sull'andamento temporale dei metaboliti;
2. sulla velocità massima della fosforilazione ossidativa V_{max}^j ;
3. sulla costante di tempo media dell'utilizzo di ossigeno cellulare τ_{UO2m}^j .

Quando V_m varia tra 40 e 9 l, il valore di V_{max}^j stimato da Vicini e Kushmerick, che vale 30 mM min^{-1} rientra nell'intervallo di valori ottenuti dalle simulazioni del modello, compresi tra 45 e 25 mM min^{-1} .

La stima del parametro V_{max}^j è limitata dall'incertezza sperimentale nel determinare il volume muscolare attivo e la distribuzione del volume microvascolare durante l'esercizio.

In questo studio, il volume del muscolo reclutato da ogni soggetto durante l'esercizio è considerato essere una percentuale dell'intero volume del corpo; ne consegue la necessità di determinare in maniera più accurata la relazione funzionale tra il volume muscolare attivo coinvolto e l'intensità dell'esercizio.

Misure sperimentali dei metaboliti chiave, come PCr nei grandi gruppi muscolari, possono essere combinate al modello sviluppato per stimare il volume muscolare attivo.

Lo sviluppo futuro del modello prenderà in considerazione il modello di reclutamento dell'unità motoria per spiegare l'incremento del volume muscolare durante l'esercizio.

6.2 Limitata accuratezza e specificità nelle misurazioni NIRS

La carente accuratezza e specificità delle misurazioni NIRS nella contrazione del muscolo scheletrico è un'altra limitazione relativa al volume muscolare coinvolto durante l'esercizio.

Precisamente, il limite nell'utilizzo della tecnica NIRS per valutare la saturazione dell'ossigeno nel muscolo scheletrico StO_{2m} è il suo potere discriminatorio insufficiente nel distinguere tra i contributi relativi della pelle, del tessuto adiposo, dei capillari e delle piccole arteriole e venule, al segnale NIRS ottenuto dal volume coinvolto della regione investigata.

Perciò, i valori potrebbero essere fuorvianti rispetto all'intensità del metabolismo ossidativo.

Cambiamenti nel volume sanguigno capillare possono influire sulle concentrazioni dell'emoglobina ossigenata e deossigenata misurata con la tecnica NIRS e causare variabilità nella valutazione del consumo di ossigeno.

Un'altra potenziale fonte d'interferenza è il contributo dell'emoglobina e della mioglobina al segnale NIRS. Molti studi si concentrano sui cambiamenti dell'emoglobina, da quando è stato scoperto che la mioglobina intracellulare incide meno del 10% sul segnale NIRS totale.

Oggi la strumentazione NIRS disponibile non può determinare in maniera accurata il contributo della mioglobina al segnale NIRS totale.

CAPITOLO 7. SVILUPPI FUTURI

La complessità del modello richiesta in futuri sviluppi dipende dall'informazione sperimentale disponibile e dalla verifica delle ipotesi.

La validità delle simulazioni del modello dipende dall'accuratezza e dalla precisione associate alla stima dei parametri incogniti. Nella creazione del modello il collegamento tra i processi che si verificano a livello dell'intero corpo, a livello del tessuto e a livello cellulare con i bilanci di massa, l'analisi delle risposte dinamiche, è in funzione dei volumi stimati dei tessuti.

In pratica, se la scala di osservazione è ridotta al livello microvascolare, il volume del tessuto perfuso che si sta considerando è molto difficile da determinare.

Inoltre la distribuzione spaziale e la variazione temporale del flusso sanguigno e della concentrazione di ossigeno possono avere un effetto determinante nell'interpretazione delle misurazioni.

Si potrebbero produrre, con appropriati dati sperimentali, modelli più dettagliati e generali, per studiare:

- a. La distribuzione spaziale dei processi di trasporto e di reazione nei capillari e nei tessuti extra-vascolari,
- b. La struttura a compartimenti intracellulare,
- c. Le caratteristiche strutturali e metaboliche dei tessuti (i tipi di fibre muscolari).

Specificamente, per gli studi umani del metabolismo del muscolo scheletrico in risposta all'esercizio, miglioramenti nell'analisi delle dinamiche dell'ossigeno polmonare e muscolare possono essere effettuati attraverso esperimenti che combinano contemporaneamente tecniche invasive e non invasive.

Le variabili che devono essere misurate sono:

- a. Contenuto di ossigeno venoso;
- b. Flusso sanguigno muscolare;
- c. Ossigenazione muscolare durante l'esercizio.

Le misurazioni dell'utilizzo di ossigeno devono essere il più vicino possibile al sito della respirazione cellulare al fine di valutare le dinamiche della fosforilazione ossidativa "in vivo" durante l'esercizio.

Le misurazioni di P e O attraverso la spettroscopia a risonanza magnetica possono fornire le concentrazioni delle specie chiave nella fosforilazione ossidativa.

Attuali studi utilizzano le misurazioni del consumo di ossigeno polmonare, VO_{2p} per conoscere i processi bioenergetici coinvolti durante l'esercizio.

Il consumo di ossigeno polmonare medio, VO_{2p} , misurato nella nostra popolazione alla fine di un esercizio a intensità costante può essere espresso come una percentuale del consumo di ossigeno polmonare massimo:

1. A intensità moderata $VO_{2p} = 49 \pm 11\%$;
2. A intensità pesante $VO_{2p} = 68 \pm 9\%$;
3. A intensità molto pesante $VO_{2p} = 87 \pm 6\%$.

La presenza della componente lenta è stata ricavata, dai dati durante un esercizio di intensità pesante e molto pesante. Non esiste un'inequivocabile spiegazione per un funzionamento come questo, perché molti fattori possono condurre a un eccesso nella velocità di consumo di ossigeno muscolare, durante un esercizio di intensità costante e pesante, come già hanno riportato molti autori [Barstow e altri, 1994].

La parte predominante della componente lenta (86%) può essere associata alla contrazione dei muscoli, mentre il reclutamento della fibra a livelli più alti può influire sul modello del consumo di ossigeno polmonare, VO_{2p} , misurato alla bocca. Il reclutamento fibroso potrebbe contribuire solo in parte alla componente lenta. Il modello qui sviluppato non è in grado di riprodurre la componente lenta per VO_{2p} ; comunque questa può essere considerata per permettere di testare i meccanismi risultanti nell'eccesso di consumo di ossigeno durante esercizi ad intensità elevata.

Inoltre, se le misurazioni dinamiche dell'ossigeno, dell'anidride carbonica, e del pH sono state condotte nel sangue venoso che perfonde il muscolo che si contrae, allora l'effetto della regolazione acido-base può essere presentata per studiare il controllo della respirazione durante l'esercizio. Sebbene misurazioni condotte "in vivo" dell'utilizzo di ossigeno muscolare UO_{2m} non sono praticabili durante l'esercizio che coinvolge una grande massa muscolare, una stima indiretta di UO_{2m} può essere ottenuta con un approccio a più livelli. Questo potrebbe combinare la

modellistica computazionale e le simulazioni con i dati sperimentali e le misurazioni a livello dell'intero corpo, del tessuto, e della cellula.

CAPITOLO 8. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

8.1 Considerazioni relative alla respirazione interna ed esterna alla luce dei dati sperimentali.

La regolazione del consumo cellulare di ossigeno nel muscolo scheletrico durante l'esercizio "in vivo" dipende da molti fattori quali: il flusso di elettroni, il pompaggio di protoni, i flussi metabolici del NADH, il controllo a "feedback" dipendente dall'ADP, il trasporto di ossigeno.

Dagli studi condotti "in vitro" su mitocondri isolati, a livello cellulare, la dinamica della fosforilazione ossidativa in corrispondenza ad un incremento a gradino nella richiesta energetica è stimata veloce (< 450 ms).

Questo tempo di risposta risulta essere di almeno due ordini di grandezza più veloce del consumo di ossigeno misurato in vivo in prossimità della bocca(circa 45 s).

Misurare direttamente il consumo di ossigeno muscolare in vivo nell'uomo sotto esercizio è difficile. Una stima indiretta è ottenuta misurando il consumo di ossigeno polmonare, considerando variabili misurabili all'apertura delle vie respiratorie. In tutti gli studi si è fatta l'ipotesi di stato stazionario, in quanto sotto le condizioni di stato non stazionario la VO_{2p} non può garantire una stima reale del consumo di ossigeno muscolare a causa delle differenze delle dinamiche all'inizio dell'esercizio.

Sperimentalmente, Grassi [Grassi e altri, 1996] notò che non si presentavano differenze significative nelle risposte dinamiche del consumo di ossigeno muscolare e polmonare, in corrispondenza della variazione dell'intensità dell'esercizio da leggera a moderata.

Però il metodo utilizzato per misurare le dinamiche del consumo di ossigeno muscolare attraverso il letto femorale durante l'esercizio non è sufficientemente accurato, perché la risposta del VO_{2m} dipende dal contenuto di ossigeno nella vena femorale e dalle misurazioni quantitative del flusso sanguigno femorale, e si è dimostrato che il consumo di ossigeno polmonare approssima il consumo di ossigeno muscolare, solo quando quest'ultimo è lento.

Molti studi hanno ipotizzato che la lentezza del consumo di ossigeno osservato all'inizio dell'esercizio sia dovuto o all'inerzia nella velocità di trasporto dell'ossigeno o ad una intrinseca lentezza del metabolismo intracellulare ossidativo.

8.2 Considerazioni relative ai flussi misurati e simulati.

In questo studio le misurazioni della saturazione dell'ossigeno muscolare e del consumo di ossigeno polmonare sono relazionate attraverso un modello matematico che quantifica i flussi metabolici coinvolti nella respirazione cellulare del muscolo scheletrico durante ritmiche contrazioni volontarie in un ciclo ergometrico.

In accordo con il modello del metabolismo energetico cellulare di Vicini e Kushmerick [Vicini e altri, 2000], il flusso della fosforilazione ossidativa ϕ_{OxPhos} è associato ai flussi metabolici delle reazioni dirette e inverse della creatina chinasi $\phi_{\text{CK}}^r, \phi_{\text{CK}}^f$ (Figura 4). Questo modello descrive come la dinamica della scomposizione netta della fosfocreatina PCr ($\phi_{\text{CK}}^r - \phi_{\text{CK}}^f$) si manifesta in un calo della concentrazione della PCr (C_{PCr}) per far fronte alla richiesta di ATP (Fig. 5), dato che il flusso della fosforilazione ossidativa ϕ_{OxPhos} non riesce a sintetizzare abbastanza velocemente ATP (Fig.4) per mantenerne l'omeostasi all'inizio dell'esercizio (Fig.5).

La fosfocreatina è contenuta nel muscolo come energia di riserva. I legami fosfato di questa molecola sono ad alta energia e sono creati a partire da creatina e ATP quando il muscolo è a riposo. Quando il muscolo entra in attività, il gruppo fosfato ad alta energia della fosfocreatina è trasferito all'ADP, formando nuovo ATP. La creatina chinasi (CK) è l'enzima responsabile del trasferimento del gruppo fosfato dalla PCr all'ADP, ed è contenuto in grande quantità nel muscolo.

Come Vicini e Kushmerick, questo modello descrive il bilancio energetico cellulare nel muscolo scheletrico non considerando il processo glicolitico come sorgente della sintesi di ATP. Sotto particolari condizioni, quale esercizio massimale o sopramassimale, così come all'inizio di un esercizio ad alta intensità, il contributo glicolitico alla sintesi dell'ATP non può essere più trascurato.

Ne consegue che i risultati della simulazione all'inizio di un esercizio d'intensità pesante o molto pesante siano molto diversi, poiché è necessario considerare il contributo glicolitico. Precisamente si ipotizza che la velocità di scomposizione della fosfocreatina potrebbe ridursi in proporzione alla velocità di formazione netta del lattato dalla glicolisi durante il periodo di esercizio.

La costante di tempo $\tau_{\text{UO}_{2m}}$ dell'utilizzo di ossigeno muscolare simulato, UO_{2m} , che indichiamo anche come ϕ_{OxPhos} , è sempre più veloce della costante di tempo $\tau_{\text{VO}_{2p}}^i$

del consumo di ossigeno polmonare misurato, VO_{2p} , a tutte le intensità di esercizio, come dimostrato dalla Figura 3.

Tuttavia, $\tau_{UO_{2m}}$ basato sul modello di simulazione nel quale ϕ_{OxPhos} dipende dalla concentrazione di ossigeno, come descritto dall'equazione 7, è di 2-3 secondi maggiore rispetto al $\tau_{UO_{2m}}$ calcolato attraverso una funzione esponenziale derivata empiricamente per UO_{2m} . Questa differenza vien meno quando ϕ_{OxPhos} non include la dipendenza dall'ossigeno. Che ϕ_{OxPhos} sia dipendente dall'ossigeno è evidente in corrispondenza di bassi valori della concentrazione di ossigeno, specialmente ad alte intensità di esercizio.

Si può notare che senza la dipendenza dall'ossigeno, il valore massimo stimato del flusso della fosforilazione ossidativa in condizioni d'intensità di esercizio molto pesanti V_{max}^V è ridotto da 44 a 37 $mmol\ l^{-1}\ min^{-1}$. Quindi l'espressione originale per ϕ_{OxPhos} proposta da Vicini e Kushmerick è stata modificata in questo modello, includendo la dipendenza dall'ossigeno, che è importante ad intensità di esercizio elevate, alle quali la quantità di ossigeno può essere molto bassa e incidere sul metabolismo.

Durante l'esercizio, la dipendenza dall'ossigeno incide sulle dinamiche dell'utilizzo di ossigeno a livello muscolare, ma non incide sull'assorbimento di ossigeno muscolare, $\tau_{VO_{2m}}$, in quanto la concentrazione di ossigeno venoso non ne è molto influenzato. Questo è il motivo per cui, nel modello si assume che l'intensità della produzione di ATP dovuta alla fosforilazione ossidativa è sei volte l'intensità del consumo di ossigeno, che si esprime imponendo $\beta=6$.

Sebbene il rapporto P su O_2 assume valori quali 5 e 6, come propongono alcuni autori, una recente lavoro [Hinkle, 2005] propone valori compresi tra 3 e 6. Tuttavia quando valori diversi di β sono usati nelle simulazioni, le dinamiche stimate della fosforilazione ossidativa rimangono le stesse a tutte le intensità di esercizio, anche se questo influisce il valore della K_{ATPase}^j e la stima del V_{max}^j .

I parametri cinetici del metabolismo cellulare, rappresentati nelle equazioni 9 e 10:

$$\phi_{CK}^r = \frac{V_{CK}^r \left(\frac{C_{Cr} C_{ATP}}{K_{iq} K_p} \right)}{1 + \frac{C_{ADP}}{K_{ia}} + \frac{C_{ATP}}{K_{iq}} + \frac{C_{PCr}}{K_{ib}} + \frac{C_{ADP} C_{PCr}}{K_b K_{ia}} + \frac{C_{Cr} C_{ATP}}{K_{iq} K_p}}$$

(9)

$$\phi_{CK}^f = \frac{V_{CK}^f \left(\frac{C_{ADP} C_{PCr}}{K_b K_{ia}} \right)}{1 + \frac{C_{ADP}}{K_{ia}} + \frac{C_{ATP}}{K_{iq}} + \frac{C_{PCr}}{K_{ib}} + \frac{C_{ADP} C_{PCr}}{K_b K_{ia}} + \frac{C_{Cr} C_{ATP}}{K_{iq} K_p}}$$

(10)

sono stati precedentemente stimati attraverso stimolazione nervosa delle dita e del polso flessio. Gli stessi valori dei parametri sono stati usati in questo studio, sebbene i muscoli coinvolti nell'esercizio con la bicicletta siano attivati volontariamente. Tuttavia, le simulazioni di modello della dinamica della fosforilazione ossidativa e del PCr, caratterizzate dalle costanti di tempo medie τ_{UO_2m} e τ_{PCr} , sono in accordo con i precedenti studi pubblicati, condotti su soggetti umani sotto le stesse condizioni.

Riferimenti Bibliografici

Andreassen, S., and S. E. Rees. Mathematical models of oxygen and carbon dioxide storage and transport: interstitial fluid and tissue stores and whole-body transport. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 33:265–298, 2005.

Balaban, R. S. Myocardial energy metabolism in health and disease cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34:1259–1271, 2002.

Barstow, T. J., S. Buchthal, S. Zanconato, and D. M. Cooper. Muscle energetics and pulmonary oxygen uptake kinetics during moderate exercise. *J. Appl. Physiol.* 77:1742–1749, 1994.

Barstow, T. J., A. M. Jones, P. H. Nguyen, and R. Casaburi. Influence of muscle fiber type and pedal frequency on oxygen uptake kinetics of heavy exercise. *J. Appl. Physiol.* 81:1642–1650, 1996.

Beard, D. A., and J. B. Bassingthwaite. Modeling advection and diffusion of oxygen in complex vascular networks. *Ann. Biomed. Eng.* 29:298–310, 2001.

Beard, D. A., K. A. Schenkman, and E. O. Feigl. Myocardial oxygenation in isolated hearts predicted by an anatomically realistic microvascular transport model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285:H1826–H1836, 2003.

Behnke, B. J., C. A. Kindig, P. McDonough, D. C. Poole, and W. L. Sexton. Dynamics of microvascular oxygen pressure during rest-contraction transition in skeletal muscle of diabetic rats. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 283:H926–H932, 2002.

Behnke, B. J., P. McDonough, T. I. Musch, D. C. Poole, and R. Arena. Comparison of oxygen uptake on-kinetics calculations in heart failure. *Med. Sci. Sports Exerc.* 35:708–709, 2003.

Behnke, B. J., P. McDonough, D. J. Padilla, T. I. Musch, and D. C. Poole. Oxygen exchange profile in rat muscles of contrasting fibre types. *J. Physiol.* 549:597–605, 2003.

Binzoni, T., W. Colier, E. Hiltbrand, L. Hoofd P. Cerretelli. Muscle O₂ consumption by NIRS: a theoretical model. *J. Appl. Physiol.* 87:683–688, 1999.

Caldwell, J. H., G. V. Martin, G. M. Raymond, and J. B. Bassingthwaite. Regional myocardial flow and capillary permeability-surface area products are nearly proportional. *Am. J. Physiol.* 267:H654–H666, 1994.

Chance, B., D. Jamieson, and H. Coles. Energy-linked pyridine nucleotide reduction: inhibitory effects of hyperbaric oxygen in vitro and in vivo. *Nature* 206:257–263, 1965.

Chance, B., J. S. Leigh Jr, J. Kent, K. McCully, S. Nioka, B. J. Clarkii, J. M. Maris, and T. Graham. Multiple controls of oxidative metabolism in living tissues as studied by phosphorus magnetic resonance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9458–9462, 1986.

Chance, B., and G. R. Williams. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.* 217:383–394, 1955.

Chance, B., G. R. Williams, W. F. Holmes, and J. Higgins. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. V A mechanism for oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 217:439–452, 1955.

Chung, Y., P. A. Mole, N. Sailasuta, T. K. Tran, R. Hurd, and T. Jue. Control of respiration and bioenergetics during muscle contraction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288:C730–C738, 2005.

Dash, R. K., and J. B. Bassingthwaite. Simultaneous blood-tissue exchange of oxygen, carbon dioxide, bicarbonate, and hydrogen ion. *Ann. Biomed. Eng.* 34:1129–1148, 2006.

DeLorey, D. S., J. M. Kowalchuk, and D. H. Paterson. Relationship between pulmonary O₂ uptake kinetics and muscle deoxygenation during moderate-intensity exercise. *J. Appl. Physiol.* 95:113–120, 2003.

Dennis, J. E., D. M. Gay, and R. E. Welsch. An adaptive non linear least squares algorithm. *ACM, Trans. Math. Software* 7:348–383, 1981.

D. U. Silverthorn. *Fisiologia, un approccio integrato*, terza edizione, 2007.

Engelen, M., J. Porszasz, M. Riley, K. Wasserman, K. Maehara, and T. J. Barstow. Effects of hypoxic hypoxia on O₂ uptake and heart rate kinetics during heavy exercise. *J. Appl. Physiol.* 81:2500–2508, 1996.

Gaesser, G. A., and D. C. Poole. The slow component of oxygen uptake kinetics in humans. *Exerc. Sport. Sci. Rev.* 24:35–71, 1996.

Goldman, D., and A. S. Popel. Computational modeling of oxygen transport from complex capillary networks. Relation to the microcirculation physiome. *Adv. Exp. Med. Biol.* 471:555–563, 1999. LAI et al.

Grassi, B. Regulation of oxygen consumption at exercise onset: is it really controversial?. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 29:134–138, 2001.

Grassi, B., L. B. Gladden, M. Samaja, C. M. Stary, and M. C. Hogan. Faster adjustment of O₂ delivery does not affect VO₂ on-kinetics in isolated in situ canine muscle. *J. Appl. Physiol.* 85:1394–1403, 1998.

Grassi, B., L. B. Gladden, C. M. Stary, P. D. Wagner, and M. C. Hogan. Peripheral O₂ diffusion does not affect VO₂ on-kinetics in isolated in-situ canine muscle. *J. Appl. Physiol.* 85:1404–1412, 1998.

Grassi, B., M. C. Hogan, P. L. Greenhaff, J. J. Hamann, K.M. Kelley, W. G. Aschenbach, D. Constantin, and B. L. Gladden. Oxygen uptake on-kinetics in dog gastrocnemius in situ following activation of pyruvate dehydrogenase by dichloroacetate. *J. Physiol.* 538:195–207, 2002.

Grassi, B., M. C. Hogan, K. M. Kelley, W. G. Aschenbach, J. J. Hamann, R. K. Evans, R. E. Patillo, and B. L. Gladden. Role of convective O₂ delivery in determining VO₂ on-kinetics in canine muscle contracting at peak VO₂. *J. Appl. Physiol.* 89:1293–1301, 2000.

Grassi, B., S. Pogliaghi, S. Rampichini, V. Quaresima, and M. Ferrari. Muscle oxygenation and pulmonary gas exchange kinetics during cycling exercise on-transitions in humans. *J. Appl. Physiol.* 95:149–158, 2003.

Grassi, B., D. C. Poole, R. S. Richardson, D. R. Knight, B. K. Erickson, and P. D. Wagner. Muscle O₂ uptake kinetics in humans: implications for metabolic control. *J. Appl. Physiol.* 80:988–998, 1996.

Guyton, A. C., and J. E. Hall. Transport of oxygen and carbon dioxide in the blood and body fluids. In: *The Textbook of Medical Physiology*, 10th ed. Philadelphia: W.B., Saunders Company, 2000, pp. 463–473.

Hindmarsh, A. C. ODEPACK a systematized collection of ode solvers. In: Scientific Computing, edited by R. S. Stepleman. Amsterdam: North Holland, 1983, pp. 55–64.

Hinkle, P. C. P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1706:1–11, 2005.

Honig, C. R., C. L. Odoroff, and J. L. Frierson. Capillary recruitment in exercise: rate, extent, uniformity, and relation to blood flow. *Am. J. Physiol.* 238:H31–H42, 1980.

Jeneson, J. A. L., H. V. Westerhoff, T. R. Brown, C. J. A. Van Echteld, and R. Berger. Quasi-linear relationship between Gibbs free energy of ATP hydrolysis and power output in human forearm muscle. *Am. J. Physiol.* 268:C1474–C1484, 1995.

Jeneson, J. A. L., R. W. Wiseman, H. V. Westerhoff, and M. J. Kushmerick. The signal transduction function for oxidative phosphorylation is at least second order in ADP. *J. Biol. Chem.* 271:27995–27998, 1996.

Jue, T., T. K. Tran, P. Mole, Y. Chung, N. Sailasuta, R. Hurd, U. Kreutzer, and S. Kuno. Myoglobin and O₂ consumption in exercising human gastrocnemius muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* 471:289–294, 1999.

Kemp, G. Kinetics of muscle oxygen use, oxygen content, and blood flow during exercise. *J. Appl. Physiol.* 99:2463–2468, 2005.

Knight, D. R., D. C. Poole, M. C. Hogan, D. E. Bebout, and P. D. Wagner. Effect of inspired O₂ concentration on leg lactate release during incremental exercise. *J. Appl. Physiol.* 81:246–251, 1996.

Knight, D. R., D. C. Poole, W. Schaffartzik, H. J. Guy, R. Prediletto, M. C. Hogan, and P. D. Wagner. Relationship between body and leg VO₂ during maximal cycle ergometry. *J. Appl. Physiol.* 73:1114–1121, 1992.

Korzeniewski, B. Regulation of ATP supply in mammalian skeletal muscle during resting state intensive work transition. *Biophys. Chem.* 83:19–34, 2000.

Kushmerick, M. J. Energy balance in muscle activity: simulations of ATPase coupled to oxidative phosphorylation and to creatine kinase. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 120:109–123, 1998.

Lai, N., R. K. Dash, M. M. Nasca, G. M. Saidel, and M. E. Cabrera. Relating pulmonary oxygen uptake to muscle oxygen consumption at exercise onset: in vivo and in silico

studies. *Eur. J. Appl. Physiol.* 97:380–394, 2006.

Lai, M. Camesasca, G.M. Saidel, R. K. Dash, M. E. Cabrera. Linking pulmonary oxygen uptake, muscle oxygen utilization and cellular metabolism during exercise, 2007.

Lin, L., M. Niwayama, T. Shiga, N. Kudo, M. Takahashi, and K. Yamamoto. Influence of a fat on muscle oxygenation measurement using near-IR spectroscopy: quantitative analysis based on two-layered phantom experiments and Monte Carlo simulation. *Front. Med. Biol. Eng.* 10:43–58, 2000.

Mancini, D. M., L. Bolinger, H. Li, K. Kendrick, B. Chance, and J. R. Wilson. Validation of near-infrared spectroscopy in humans. *J. Appl. Physiol.* 77:2740–2747, 1994.

Nelson, D., and M. Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry* 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000.

Ovadi, J., and V. Saks. On the origin of intracellular compartmentation and organized metabolic systems. *Mol. Cell Biochem.* 256–257:5–12, 2004.

Ozyener, F., H. B. Rossiter, S. A. Ward, and B. J. Whipp. Influence of exercise intensity on the on- and off-transient kinetics of pulmonary oxygen uptake in humans. *J. Physiol.* 533:891–902, 2001.

Pittman, R. N. Oxygen supply to contracting skeletal muscle at the microcirculatory level: diffusion vs. convection. *Acta Physiol. Scand.* 168:593–602, 2000.

Poole, D. C. VO₂ kinetics in COPD patients under hyperoxic conditions. *J. Appl. Physiol.* 80:1070–1072, 1996.

Poole, D. C., G. A. Gaesser, M. C. Hogan, D. R. Knight, and P. D. Wagner. Pulmonary and leg VO₂ during submaximal exercise: implications for muscular efficiency. *J. Appl. Physiol.* 72:805–810, 1992.

Poole, D. C., W. Schaffartzik, D. R. Knight, T. Derion, B. Kennedy, H. J. Guy, R. Prediletto, and P. D. Wagner. Contribution of exercising legs to the slow component of oxygen uptake kinetics in humans. *J. Appl. Physiol.* 71:1245–1260, 1991.

Pringle, J. S. M., J. H. Doust, H. Carter, K. Tolfrey, I. T. Campbell, and A. M. Jones. Oxygen uptake kinetics during moderate, heavy and severe intensity ‘submaximal’

exercise in humans: the influence of muscle fibre type and capillarisation. *Eur. J. Appl. Physiol.* 89:289–300, 2003.

Rossiter, H. B., S. A. Ward, V. L. Doyle, F. A. Howe, J. R. Griffiths, and B. J. Whipp. Inferences from pulmonary O₂ uptake with respect to intramuscular [phosphocreatine] kinetics during moderate exercise in humans. *J. Physiol.* 518:921–932, 1999.

Rossiter, H. B., S. A. Ward, F. A. Howe, J. M. Kowalchuk, J. R. Griffiths, and B. J. Whipp. Dynamics of intramuscular ³¹P-MRS Pi peak splitting and the slow components of PCr and O₂ uptake during exercise. *J. Appl. Physiol.* 93:2059–2069, 2002.

Rossiter, H. B., S. A. Ward, J. M. Kowalchuk, F. A. Howe, J. R. Griffiths, and B. J. Whipp. Effects of prior exercise on oxygen uptake and phosphocreatine kinetics during highintensity knee-extension exercise in humans. *J. Physiol.* 537:291–303, 2001. Model of Respiration during Exercise

Salway, J. G. *Metabolism at a Glance*. 3rd ed. Blackwell Publishing Professional, 2004.

Teague, W. E. Jr, and G. P. Dobson. Effect of temperature on the creatine kinase equilibrium. *J. Biol. Chem.* 267:14084–14093, 1992.

Territo, P. R., S. A. French, M. C. Dunleavy, F. J. Evans, and R. S. Balaban. Calcium activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 276:2586–2599, 2001.

Tordi, N., L. Mourot, B. Matusheski, and R. L. Hughson. Measurements of cardiac output during constant exercises: comparison of two non-invasive techniques. *Int. J. Sports Med.* 25:145–149, 2004.

Tran, T. K., N. Sailasuta, U. Kreutzer, R. Hurd, Y. Chung, P. Mole, S. Kuno, and T. Jue. Comparative analysis of NMR and NIRS measurements of intracellular PO₂ in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 276:R1682–R1690, 1999.

Tschakovsky, M. E, and R. L. Hughson. Interaction of factors determining oxygen uptake at the onset of exercise. *J. Appl. Physiol.* 86:1101–1113, 1999.

Vicini, P., and M. J. Kushmerick. Cellular energetics analysis by a mathematical model of energy balance: estimation of parameters in human skeletal muscle. *Am. J.*

Physiol. Cell Physiol. 279:C213–C224, 2000.

Westerhoff, H. V., C. J. Van Echteld, and J. A. Jeneson. On the expected relationship between Gibbs energy of ATP hydrolysis and muscle performance. *Biophys. Chem.* 54:137–142, 1995.

Whipp, B. J., and R. Casaburi. Characterizing O₂ uptake response kinetics during exercise. *Int. J. Sports Med.* 3:97–99, 1982.

Whipp, B. J., H. B. Rossiter, S. A. Ward, D. Avery, V. L. Doyle, F. A. Howe, and J. R. Griffiths. Simultaneous determination of muscle 31P and O₂ uptake kinetics during whole body NMR spectroscopy. *J. Appl. Physiol.* 86:742–747, 1999.

Whipp, B. J., S. A. Ward, and H. B. Rossiter. Pulmonary O₂ uptake during exercise: conflating muscular and cardiovascular responses. *Med. Sci. Sports Exerc.* 37:1574–1585, 2005.

Wilson, D. F., M. Erecinska, C. Drown, and I. A. Silver. Effect of oxygen tension on cellular energetics. *Am. J. Physiol.* 233:C135–C140, 1977.

Wilson, D. F., M. Erecinska, C. Drown, and I. A. Silver. The oxygen dependence of cellular energy metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 195:485–493, 1979.

Wilson, D. F., C. S. Owen, and A. Holian. Control of mitochondrial respiration: a quantitative evaluation of the roles of cytochrome c and oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.* 182:749–762, 1977