

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ
DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE
Corso di Laurea Magistrale in Matematica

Metodi numerici per la risoluzione di
modelli di dinamica del Ca^{2+} nella
cellula

Tesi in Analisi Numerica

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa
Germana Landi

Presentata da:

Maria Rita
D'Orio

Correlatore:

Chiar.ma Prof.ssa
Fabiana Zama

II sessione
ANNO ACCADEMICO 2016/2017

Ai miei genitori e a mio fratello,
anche se nessuna dedica
sarà mai abbastanza per ringraziarli
per quello che fanno per me.

Alla mia famiglia tutta,
per avermi sostenuta in questi anni.

A chi mi guarda da lassù.

Indice

Introduzione	iv
1 Lo ione Ca^{2+} nella fisiologia cellulare e la sua dinamica	1
1.1 Meccanismi di estrusione di Ca^{2+}	3
1.2 Meccanismi che regolano l'ingresso di Ca^{2+}	3
1.3 Sistemi tampone per il Ca^{2+}	5
1.4 Concentrazioni e flussi di Ca^{2+} : modelli cellulari <i>Well-Mixed</i>	7
1.4.1 Afflusso di Ca^{2+} , mitocondri e buffers di Ca^{2+}	9
1.4.2 Pompe di calcio: la Ca^{2+} -ATPasi	10
1.4.3 <i>IPR</i> : recettore dell'inositolo trifosfato IP_3	14
2 Meccanismi che determinano le oscillazioni di calcio	24
2.1 Modelli di dinamica del Ca^{2+}	30
2.2 Modello di Classe I	34
2.3 Modello Ibrido	36
2.4 Modello di Classe II	37
2.5 Modello Non Oscillatorio	38
2.6 Prova dinamica sotto l'azione dell'impulso di IP_3	38
3 Solutori di equazioni differenziali ordinarie in Matlab	43
3.1 Problema ai valori iniziali	43
3.2 Convergenza numerica dei metodi	45
3.3 Assoluta stabilità dei metodi numerici	46
3.4 Metodi di Runge Kutta	47

3.4.1	Metodi di Runge Kutta impliciti	49
3.4.2	Metodi di Runge Kutta Fehlberg	50
3.5	Formule di differenziazione all'indietro	51
3.5.1	Formule di differenziazione numerica (NDF)	51
3.6	Il concetto di Stiffness	52
3.7	Il pacchetto ODE di Matlab	54
3.7.1	ode23	55
3.7.2	ode45	56
3.7.3	ode23s	57
3.7.4	ode15s	57
4	Risoluzione numerica dei modelli	62
4.1	Analisi dei metodi per la risoluzione del modello Ibrido	64
4.2	Analisi dei metodi per la risoluzione del modello di Classe I	67
4.2.1	Distribuzione dei tempi in cui è stata calcolata la so- luzione	73
4.3	Analisi dei metodi per la risoluzione dei modelli di Classe II	74
4.3.1	Distribuzione dei tempi in cui è stata calcolata la so- luzione in un problema relativo al modello di Classe II	81
4.4	Analisi dei metodi per la risoluzione dei modelli senza impulso di p	82
4.5	Analisi dei risultati numerici	83
	Bibliografia	87

INTRODUZIONE

Nell'ambito della matematica applicata, lo studio numerico dei sistemi di *equazioni differenziali*, ad oggi uno degli strumenti più efficaci nella costruzione di modelli matematici, assume un ruolo di fondamentale importanza. In questa tesi ci occupiamo in particolare di risolvere numericamente alcuni tra i più recenti modelli di dinamica del calcio cellulare (in simboli Ca^{2+}), presenti in letteratura, noti come: Modello di Classe I, Modello di Classe II e Modello Ibrido; tali modelli descrivono i diversi meccanismi con cui avvengono le oscillazioni di Ca^{2+} in differenti tipi di cellule, muscolari e non.

L'obiettivo è quello di riprodurre le classiche oscillazioni di Ca^{2+} che caratterizzano ciascuno di questi modelli, in particolar modo quelli sottoposti alla cosiddetta 'prova dinamica' basata sull'applicazione di un impulso istantaneo di inositolo trifosfato, indicato con il simbolo $IP3$ e noto per le sue proprietà di stimolatore-inibitore della produzione di Ca^{2+} .

Una prima analisi di questi modelli riguarda l'implementazione delle funzioni che li descrivono, tenendo conto di numerosi parametri fissi, tratti dalla fisiologia cellulare del Ca^{2+} , e di quelli variabili al fine di riprodurre dinamiche prestabilite, e la determinazione dei valori iniziali da attribuire ai problemi, per ottenere soluzioni in accordo col modello biologico. Non disponendo della soluzione esatta, nel tentativo di ottenere una soluzione numerica che la approssimi al meglio, conduciamo un'analisi dei metodi implementati in Matlab per la risoluzione di equazioni differenziali, confrontando le soluzioni

numeriche ottenute con ciascun metodo, per diversi valori di accuratezza, al fine di identificare quello più efficace ed efficiente, che risolva correttamente i modelli al costo computazionale più basso. Questo è utile in una prospettiva di stima dei parametri per cui i problemi andrebbero risolti un numero elevato di volte.

L'*analisi comparativa dei metodi*, realizzata attraverso una vasta sperimentazione su problemi test relativi a ciascuno dei modelli, mette in luce la natura *stiff* che hanno tali problemi, per cui il metodo prescelto, che meglio approssima la soluzione esatta ad un più basso costo computazionale in termini di valutazioni di funzioni, risulta essere *ode15s*, metodo implicito per la risoluzione di problemi *stiff* con ordine di accuratezza variabile.

La tesi sarà articolata in quattro capitoli:

Nel *primo capitolo* descriveremo la fisiologia del Ca^{2+} e il modo in cui vengono costruiti i modelli di dinamica del Ca^{2+} , a partire dalla modellizzazione del 'toolkit' di segnalazione cellulare, ovvero di quei complessi macromolecolari che interagiscono con il calcio.

Nel *secondo capitolo* descriveremo nei dettagli le principali classi di modelli e i sistemi di equazioni differenziali che li rappresentano, ponendo l'attenzione sul valore delle variabili e dei parametri che intervengono in questa dinamica, e mostrando come cambia la forma delle oscillazioni al variare di questi.

Nel *terzo capitolo* introdurremo alcuni aspetti matematici che caratterizzano i metodi numerici implementati nel pacchetto ODEsuite di Matlab per la risoluzione delle equazioni differenziali.

Nel *quarto capitolo* analizzeremo i vari metodi, applicandoli a problemi relativi a ciascuno dei modelli principali e perturbando il dato iniziale, mostrando come la variazione di quest'ultimo renda il problema più o meno *stiff* e determinando, di volta in volta, i metodi migliori per una risoluzione efficace ed efficiente dei diversi modelli.

Capitolo 1

Lo ione Ca^{2+} nella fisiologia cellulare e la sua dinamica

Lo ione calcio nella fisiologia della cellula assume un ruolo di fondamentale importanza, in quanto regola una vasta gamma di funzioni cellulari, e quei meccanismi con cui la cellula controlla la concentrazione di Ca^{2+} sono fondamentali per il suo funzionamento.

Il calcio è necessario, infatti, per il corretto svolgimento di numerosi processi, sia intracellulari che extracellulari; tra questi ricordiamo la contrazione muscolare, la conduzione dell'impulso nervoso, il rilascio ormonale, la coagulazione del sangue. Inoltre, in tutti i tipi di cellule, dai semplici batteri ai neuroni del cervello, il calcio ionizzato Ca^{2+} svolge il ruolo di secondo messaggero nei meccanismi di segnalazione intracellulare, in quanto trasmette alla macchina biochimica della cellula i segnali elettrici e chimici che giungono dalla superficie della membrana plasmatica, ed è coinvolto nel controllo delle attività enzimatiche e la modulazione di recettori, canali e trasportatori. Ecco perchè il mantenimento dell'omeostasi di Ca^{2+} è di fondamentale importanza per la cellula.

Ciò che rende lo ione calcio un ottimo messaggero intracellulare è l'enorme differenza di concentrazione di Ca^{2+} libero tra il liquido extracellulare ed il citosol (parte liquida di cui è composto il citoplasma, il quale costituisce la parte interna della cellula), e tra i depositi cellulari (compartimenti interni alla cellula rivestiti da membrane cellulari) ed il citosol. Nel liquido extracellulare la concentrazione di Ca^{2+} libero è di circa $1mM$, mentre nel citosol è molto più bassa, intorno al valore di $0.1\mu M (= 100nM)$ e nei depositi intracellulari, come il reticolo endoplasmatico ER, ha valori tra $0.1 - 1mM$. Questa differenza di concentrazione consente di accumulare molto rapidamente Ca^{2+} nel citosol e di regolare quindi velocemente le funzioni Ca^{2+} -dipendenti, ma con lo svantaggio che per fare ciò è necessario un dispendio di energia per mantenere bassa la concentrazione citosolica di Ca^{2+} , poichè alte concentrazioni di calcio per tempi prolungati sono tossiche; un incremento incontrollato della concentrazione di calcio a livello citosolico causa un danneggiamento cellulare che può portare la cellula alla morte.

Così, all'interno delle cellule avvengono dei meccanismi che hanno giusto la funzione di controllare le variazioni di Ca^{2+} citosolico, consentendo l'ingresso e/o l'efflusso di Ca^{2+} ; tali meccanismi si attivano in base alla necessità della cellula di incrementare o di ridurre la concentrazione di questo ione nel citosol e riguardano l'apertura dei canali di Ca^{2+} sulla membrana cellulare e lo svuotamento dei depositi (detti anche organuli) intracellulari, dove il calcio si accumula.

La regolazione del calcio intracellulare coinvolge:

- il controllo dell'ingresso di Ca^{2+} ;
- il controllo dell'estrusione di Ca^{2+} ;
- lo scambio di Ca^{2+} tra il citosol e i siti di accumulo intracellulare;

1.1 Meccanismi di estrusione di Ca^{2+}

Il calcio può essere rimosso dal citosol in due modi principali:

- viene pompato fuori dalla cellula attraverso la membrana plasmatica
- viene accumulato nei depositi intracellulari, in particolare nel reticolo endoplasmatico (ER)

Essendo la concentrazione di Ca^{2+} nel citosol inferiore rispetto alla concentrazione extracellulare o a quella dei depositi intracellulari, entrambi i meccanismi di efflusso richiedono dispendio di energia. La Ca^{2+} -ATPasi è la principale via di estrusione del Ca^{2+} citosolico e si attiva tramite l'interazione con il complesso Ca^{2+} -calmodulina: l'energia immagazzinata sotto forma di ATP viene utilizzata per pompare Ca^{2+} fuori dalla cellula o all'interno dei depositi intracellulari.

1.2 Meccanismi che regolano l'ingresso di Ca^{2+}

L'influsso di Ca^{2+} avviene in due modi:

1. attraverso i canali di Ca^{2+} lungo la membrana plasmatica
2. attraverso il rilascio di Ca^{2+} dai depositi interni

I canali di membrana sono proteine che creano delle strutture in grado di mettere in comunicazione il citoplasma con l'esterno della cellula e favoriscono l'ingresso di calcio nella cellula.

Il secondo importante modo con cui Ca^{2+} entra nel citosol è il rilascio di questo dai depositi interni. I maggiori depositi di Ca^{2+} a livello intracellulare sono rappresentati dal reticolo endoplasmatico (ER), nelle cellule non muscolari, e dal reticolo sarcoplasmatico (SR), caratterizzato dall'alta

concentrazione di proteine responsabili dell'accumulo, del deposito e della liberazione del calcio, nel muscolo cardiaco e scheletrico [1].

Il flusso degli ioni Ca^{2+} dal lume di questi organuli verso il citosol circostante avviene attraverso due tipi di canali: i recettori dell' IP_3 (IPR) e i recettori della rianodina (RyR), così detti perchè legano selettivamente tale alcaloide naturale.

Il recettore della rianodina (RyR) gioca un ruolo fondamentale nell'eccitazione - contrazione delle cellule del muscolo cardiaco e scheletrico, e si pensa che stia alla base del rilascio di calcio indotto da calcio (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release: $CICR$), secondo cui vi è l'entrata di Ca^{2+} all'interno della cellula che provoca un rilascio esplosivo di altro Ca^{2+} dal SR .

Il recettore dell' IP_3 (IPR), anche se simile in struttura al recettore della rianodina, si trova principalmente in cellule non muscolari. Questo viene attivato dall' IP_3 , un secondo messaggero che viene prodotto dall'interazione di liganti (antagonisti extracellulari come ormoni o neurotrasmettitori) con i loro recettori specifici accoppiati a proteine G, sulla membrana plasmatica. L' IP_3 idrosolubile è libero di diffondersi attraverso il citoplasma della cellula e di legarsi ai recettori per l' IP_3 situati sulla membrana del ER , portando all'apertura di questi canali-recettori e al successivo rilascio di Ca^{2+} dal ER . Così come i recettori della rianodina, anche i recettori dell' IP_3 dipendono dalla concentrazione citosolica di Ca^{2+} , con il rilascio di Ca^{2+} dall'attivazione e inattivazione stessa del Ca^{2+} , ma a velocità differenti. Di conseguenza, il rilascio di Ca^{2+} indotto da Ca^{2+} si verifica anche per i recettori IPR .

In conclusione, sia IPR che RyR sono sensibili al Ca^{2+} e si aprono più velocemente all'aumentare del Ca^{2+} intracellulare: un iniziale aumento di Ca^{2+} promuove il rilascio di altro Ca^{2+} dal SR/ER .

Il richiamo di Ca^{2+} nei depositi è effettuato dalle pompe SERCA (Ca^{2+} -ATPasi del SR e del ER). Ci sono poi depositi di Ca^{2+} insensibili all' IP_3 come il complesso del Golgi, le vescicole secretorie e altri organuli citoplasmatici che, benchè contengano una quantità consistente di calcio, non sono in equilibrio dinamico con il citosol e quindi svolgono un ruolo marginale nel controllo della concentrazione di Ca^{2+} .

1.3 Sistemi tampone per il Ca^{2+}

I sistemi tampone, detti buffers, riguardano lo scambio di Ca^{2+} tra il citosol e i siti di accumulo intracellulare di Ca^{2+} .

Concentrazioni elevate di calcio, essendo dannose per la cellula in quanto attivano una cascata enzimatica che distrugge il citoscheletro portando alla morte cellulare per apoptosi, vengono tamponate mediante la sintesi di sostanze chelanti, insieme di proteine eterogenee per affinità e capacità di legare il calcio, che svolgono un'azione enzimatica Ca^{2+} - dipendente o regolatoria.

La figura 1.1 descrive i flussi principali coinvolti nella dinamica di Ca^{2+} .

Da diversi anni i modellisti sono interessati alla dinamica del Ca^{2+} e la motivazione principale che ha fatto nascere in essi questo interesse è il comportamento spazio-temporale alquanto complesso che ha la concentrazione di Ca^{2+} nella cellula. Tale ione ha infatti un ruolo importante nei meccanismi di segnalazione intracellulare e il segnale di Ca^{2+} assume la forma di onde di concentrazione che si propagano da un punto all'altro della cellula.

L'importanza del calcio nei numerosi processi cellulari dipende dal fatto che le cellule possiedono un 'toolkit' di segnalazione di Ca^{2+} , un set di componenti, complessi macromolecolari come recettori, proteine, canali, scambiatori, pompe, buffers, in grado di usare le oscillazioni nella concentrazione

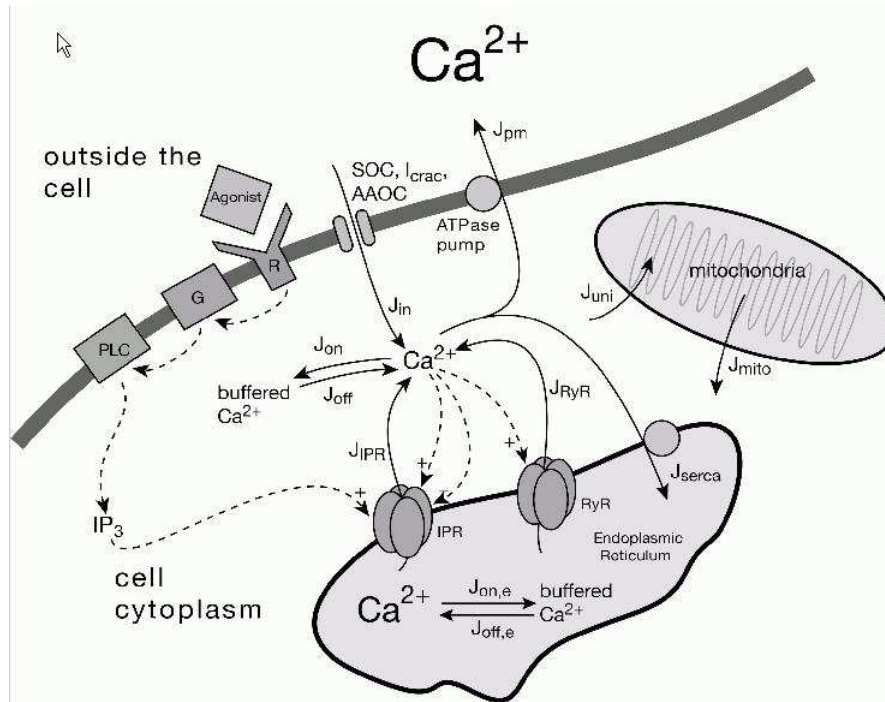


Figura 1.1. Diagramma dei principali flussi coinvolti nel controllo della concentrazione citoplasmatica di Ca^{2+} . Il legame dell'agonista (*agonist*) al recettore (*R*) sulla membrana porta all'attivazione della G-proteina (*G*), e alla conseguente attivazione della fosfolipasi C (*PLC*). Ciò comporta la fosforilazione del fosotidilinositolo bifosfato in diacilglicerolo e inositolo trifosfato (IP_3), il quale è libero di diffondersi attraverso il citoplasma della cellula. Quando IP_3 si lega al recettore per l' IP_3 (*IPR*) sulla membrana del *ER* ciò provoca il rilascio di Ca^{2+} dal *ER*, e questo Ca^{2+} a sua volta regola la probabilità di apertura di *IPR* e di *RyR*. I flussi di calcio sono descritti dalle frecce. Il calcio può essere rilasciato dal *ER* attraverso *IPR* (J_{IPR}) oppure attraverso *RyR* (J_{RyR}), può essere pompato dal citoplasma dentro *ER* (J_{serca}), oppure fuori da *ER* (J_{pm}), può essere accumulato dentro i mitocondri (J_{uni}) o rilasciato da questi (J_{mito}), e può essere legato ai buffers di Ca^{2+} (J_{on}) o rilasciato da questi (J_{off}). L'entrata dall'esterno della cellula (J_{in}) è controllata da una varietà di canali possibili, tra cui: *SOC* (store-operated channels), *I_{crac}* (Ca^{2+} -release-activated channels), e *AAOC* (arachidonic-acid-operated channels). Figura tratta da [8]

di Ca^{2+} come segnale per regolare una varietà di processi sensibili al Ca^{2+} . Questi complessi possono operare come unità autonome oppure si possono mescolare e abbinare in maniera opportuna creando così sistemi di segnalazione alquanto diversi.

Modelli di dinamica del Ca^{2+} si ottengono attraverso la modellizzazione di ogni membro del toolkit cellulare. Per costruire modelli 'whole-cell' si combinano in modo appropriato alcuni di questi componenti.

Descriviamo il flusso di Ca^{2+} , tenendo conto dei principali elementi che lo regolano, riferendoci alla figura 1.1, che sintetizza gran parte dei meccanismi di regolazione.

1.4 Concentrazioni e flussi di Ca^{2+} : modelli cellulari *Well-Mixed*

La maggior parte dei modelli di dinamica del calcio, presi in considerazione dai modellisti negli ultimi anni, sono modelli in cui si assume che la cellula è *well-mixed*, ovvero che la concentrazione di ogni suo contenuto è omogenea su tutta la cellula.

Indicheremo con c la concentrazione di ioni di Ca^{2+} libero nel citoplasma. Si osservi che $c = c(t)$, ovvero, c dipende dal tempo e non dallo spazio. Allo stesso modo denotiamo con c_e la concentrazione omogenea di Ca^{2+} nel reticolo endoplasmatico (*ER*). Le equazioni differenziali per c e per c_e seguono dalla legge di conservazione di Ca^{2+} .

Il numero di ioni in ogni compartimento varia in base al flusso attraverso ciascuna delle membrane che separano tra loro i vari compartimenti. Indichiamo il flusso netto di calcio dentro il compartimento, ovvero il numero di particelle che attraversano il confine del compartimento in una unità di

tempo, con \tilde{J}_{net} , il quale ha per unità di misura il numero di moli al secondo, e indichiamo con v il volume del compartimento.

Il tasso di variazione del calcio totale è uguale al flusso netto di calcio dentro il compartimento, ovvero, in notazione matematica:

$$\frac{d(vc)}{dt} = \tilde{J}_{net}, \quad (1.1)$$

Se assumiamo che il volume della cellula e i volumi dei compartimenti non variano nel tempo e cioè sono costanti, l'equazione di conservazione può essere scritta in questo modo:

$$\frac{dc}{dt} = J_{net} = \tilde{J}_{net}/v \quad (1.2)$$

Qui, J_{net} è il flusso netto dentro il citoplasma sul volume del citoplasma e ha per unità di misura la concentrazione al secondo.

In applicazioni in cui il volume cambia, ad esempio nei modelli di controllo del volume cellulare, o modelli di controllo della secrezione di fluido attraverso le oscillazioni di Ca^{2+} , è necessario utilizzare \tilde{J}_{net} anziché J_{net} . Ma questo è un caso che non riguarda lo studio dei nostri modelli.

In vista dei flussi descritti nella 1.1, abbiamo:

$$\frac{dc}{dt} = J_{IPR} + J_{RyR} + J_{in} - J_{pm} - J_{serca} - J_{on} + J_{off} + J_{uni} - J_{mito} \quad (1.3)$$

Per l'equazione riguardante il Ca^{2+} nel reticolo endoplasmatico (ER), si deve tener conto del fatto che il volume del citoplasma è diverso dal volume del ER . Anche in questo caso, in considerazione dei flussi della figura 1.1, abbiamo che:

$$\frac{dc_e}{dt} = \gamma(J_{serca} - J_{IPR} - J_{RyR}) + J_{off,e} - J_{on,e} \quad (1.4)$$

dove $\gamma = \frac{v_{cyt}}{v_{ER}}$ è il rapporto tra il volume del citoplasma e il volume del re-

ticolo endoplasmatico. Ciascuno dei flussi che compare in queste equazioni corrisponde a un componente del 'toolkit' di segnalazione di Ca^{2+} .

Nel costruire modelli di dinamica del calcio i modellisti non hanno incluso tutti i possibili componenti del toolkit ma solo quelli che svolgono un ruolo determinante e che appaiono più frequentemente nei modelli studiati negli anni precedenti. Terremo conto, dunque, degli elementi del toolkit che intervengono in maniera determinante in questa dinamica.

In generale, le equazioni che descrivono il flusso di calcio sono poi accoppiate ad equazioni differenziali aggiuntive che descrivono l'apertura del recettore *IPR* o del recettore *RyR*, o ad equazioni che descrivono la dinamica delle pompe e degli scambiatori. Tuttavia, prima di analizzare ciò che accade complessivamente, discuteremo la modellizzazione di ogni componente del *toolkit*.

1.4.1 Afflusso di Ca^{2+} , mitocondri e buffers di Ca^{2+}

Da che cosa dipenda l'afflusso di calcio è una questione presa in esame da tanti studiosi nel corso degli anni. Quello che si evince da risultati sperimentali è che in generale l'afflusso di Ca^{2+} dall'esterno verso l'interno della cellula dipende dalla tensione. Tuttavia, quando le oscillazioni di Ca^{2+} avvengono ad una tensione costante (come nel caso di cellule non eccitabili) non c'è dipendenza dalla tensione, ma certamente l'afflusso dipenderà da altri fattori, tra cui la concentrazione del calcio stesso, la presenza di acido arachidonico, di *IP₃* e dalla concentrazione di Ca^{2+} nel *ER*.

Studi effettuati da *Clapham* nel 1995 hanno dimostrato che in alcuni tipi di cellule, la riduzione del reticolo endoplasmatico provoca un aumento dell'afflusso di Ca^{2+} attraverso i canali che mettono in comunicazione i vari compartimenti della cellula, i cosiddetti SOCs e questi canali svolgono una funzione solo ad alta concentrazione agonista [1].

Studi successivi, effettuati da *Shuttleworth* e *Thompson* nel 1999, hanno dimostrato che a basse concentrazioni agoniste l'afflusso di Ca^{2+} è con-

trollato dall'acido arachidonico, in particolare questo produce un aumento dell'afflusso di Ca^{2+} nella cellula [3].

Ad ogni modo, l'esatto meccanismo con cui questo accade è sconosciuto e resta noto che J_{in} aumenta all'aumentare della concentrazione agonista. Questo si traduce nella seguente espressione matematica:

$$J_{in} = \alpha_1 + \alpha_2 p \quad (1.5)$$

per qualche costante α_1 e α_2 .

Significa che J_{leak} , con cui indichiamo la fuoriuscita di Ca^{2+} dal *ER* e che allo stesso tempo rappresenta un aumento di Ca^{2+} citoplasmatico, è una funzione lineare crescente della concentrazione di IP_3 , che denotiamo con p . Allo stato attuale delle conoscenze non è stato possibile realizzare modelli più dettagliati e un tale modello è accettabile a basse concentrazioni.

In gran parte dei modelli attuali sono stati trascurati sia i mitocondri che i buffers, i quali intervengono principalmente nel comportamento oscillatorio delle onde di calcio. Sembra che la funzione dei mitocondri sia quella di attivare il rilascio di grandi quantità di Ca^{2+} e che questo avvenga in maniera relativamente lenta. Così i mitocondri tendono a ridurre l'ampiezza delle onde di calcio modificando il comportamento oscillatorio con l'andare del tempo [1].

1.4.2 Pompe di calcio: la Ca^{2+} -ATPasi

Si riportano due modelli noti della Ca^{2+} -ATPasi.

Dati sperimentali ottenuti da *Lytton et al.* nel 1992 [1] hanno mostrato che il flusso attraverso la pompa Ca^{2+} -ATPasi, la quale attraverso la membrana cellulare trasferisce ioni Ca^{2+} all'interno della cellula, era approssimativamente una funzione sigmoideale di c , così che i primi modelli di Ca^{2+} -ATPasi furono rappresentati dall'equazione di Hill con coefficiente 2.

Un modello comune per rappresentare la Ca^{2+} -ATPasi era il seguente,

$$J_{serca} = \frac{v_p c^2}{K_p^2 + c^2} \quad (1.6)$$

Questo modello si rivelò fallimentare per il fatto che il flusso non ha alcuna dipendenza dalla concentrazione di Ca^{2+} nel *ER* ed ha sempre lo stesso segno, mentre è noto che con una elevata concentrazione di Ca^{2+} nel *ER*, la pompa possa invertire il processo generando *ATP*; pertanto modelli più realistici hanno superato questo modello.

Per esempio, *MacLennan et al.*, nel 1997 [1] costruirono un modello più dettagliato, descritto nella figura 1.2. La pompa può trovarsi in una delle

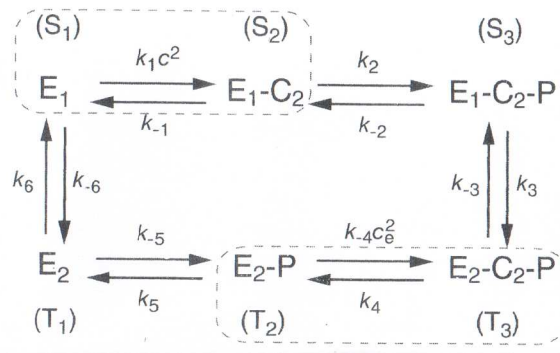


Figura 1.2. Diagramma del modello SERCA di MacLennan et al. (1997). E_1 è la conformazione in cui i siti di legame del Ca^{2+} sono esposti al citoplasma, ed E_2 è la conformazione in cui questi sono esposti al lume ed hanno bassa affinità di legame con il Ca^{2+} . Con P viene indicato il fatto che la pompa è stata defosforilata; per semplicità sono stati omessi dal diagramma *ATP* e *ADP*. Anche il cotrasporto di H^+ è stato omesso. Assumiamo un veloce equilibrio tra le parti degli stati nel riquadro tratteggiato, da cui deriveremo una semplificazione più avanti. (Figura tratta da [1]).

due conformazioni di base: E_1 oppure E_2 . Quando la pompa si trova nella conformazione E_1 , allo stato di riposo, questa lega uno o due ioni Ca^{2+} nel sito di legame, nel citoplasma, e intanto sul sito di fosforilazione viene

rilasciato un fosforo dall'*ATP*, dando la possibilità alla pompa di cambiare conformazione. La pompa, infatti, una volta fosforilata passa alla conformazione E_2 , per cui adesso i siti di legame di Ca^{2+} sono esposti al lume del *ER*, cioè al lato non citosolico, e hanno un'affinità assai inferiore con il Ca^{2+} .

Così, il Ca^{2+} viene rilasciato dentro il *ER*, la pompa è defosforilata, e completa il ciclo passando di nuovo alla conformazione E_1 .

Per ogni ione di Ca^{2+} trasportato dal citoplasma al *ER*, un protone è cotrasportato dal *ER* al citoplasma. Calcolare il flusso di un tale modello è relativamente semplice: per comodità indichiamo gli stati della pompa con S_i e T_i , e lasciamo che s_i e t_i indichino la percentuale di pompe allo stato S_i , rispettivamente T_i . Per il principio di conservazione si ha che:

$$\sum_{i=1}^3 (s_i + t_i) = 1 \quad (1.7)$$

Allo stato stazionario, il flusso di Ca^{2+} dal citoplasma al *ER* è dato dalla differenza di velocità, in una direzione e nella direzione inversa, di ciascun stato di reazione e tale differenza deve essere la stessa per ogni stato del modello, perchè il modello si trovi allo stato stazionario. Quindi, se indichiamo con J il flusso di Ca^{2+} dal citoplasma al *ER*, abbiamo:

$$\begin{aligned} J &= k_1 s_1 c^2 - k_{-1} s_2 \\ &= k_2 s_2 - k_{-2} s_3 \\ &= k_3 s_3 - k_{-3} t_3 \\ &= k_4 t_3 - k_{-4} t_2 c_e^2 \\ &= k_5 t_2 - k_{-5} t_1 \\ &= k_6 t_1 - k_{-6} t_1 \end{aligned} \quad (1.8)$$

Si tratta di sei equazioni per sei variabili ($s_1, s_2, s_3, t_1, t_2, J$). La soluzione di questo sistema di equazioni ci permette di esprimere J come funzione delle velocità costanti che indichiamo con α , e di cui non ci occuperemo nei dettagli. Otteniamo:

$$J_{serca} = \frac{c^2 - K_1 K_2 K_3 K_4 K_5 K_6 c_e^2}{\alpha_1 c^2 + \alpha_2 c_e^2 + \alpha_3 c^2 c_e^2 + \alpha_4} \quad (1.9)$$

dove $K_i = k_{-i}/k_i$.

Nella descrizione originale del modello, MacLennan assume che il legame e il rilascio di Ca^{2+} avviene rapidamente. Ciò si traduce in un modello più semplice con una espressione del flusso stazionario simile a quella descritta prima. Il modello si riduce basandoci su un presupposto di veloce-equilibrio, che descriviamo in riferimento al grafico 1.2.

Gli stati S_1 ed S_2 sono raggruppati insieme nel rettangolo tratteggiato, e così anche gli stati T_2 e T_3 . Assumiamo che queste due coppie di stati sono in equilibrio istantaneo, per cui

$$c^2 s_1 = K_1 s_2 \quad (1.10)$$

e

$$t_3 = K_4 c_e^2 t_2 \quad (1.11)$$

Ricordiamo che s_1 è la percentuale di pompe allo stato S_1 , e analogamente per gli altri stati. Definiamo due nuove variabili $\bar{s}_1 = s_1 + s_2$ e $\bar{t}_2 = t_2 + t_3$. Dalla 1.10 segue che

$$\bar{s}_1 = s_1 \left(1 + \frac{c^2}{K_1}\right) = s_2 \left(1 + \frac{K_1}{c^2}\right) \quad (1.12)$$

e

$$\bar{t}_2 = t_2(1 + K_4 c_e^2) = t_3 \left(1 + \frac{1}{K_4 c_e^2}\right) \quad (1.13)$$

La velocità con cui \bar{S}_1 viene convertito in S_3 è $k_2 s_2 = \frac{c^2 k_2 \bar{s}_1}{c^2 + K_1}$.

Analogamente, la velocità con cui \bar{S}_1 viene convertito in T_1 è $k_{-6} s_1 = \frac{K_1 k_{-6} \bar{s}_1}{K_1 + c^2}$.

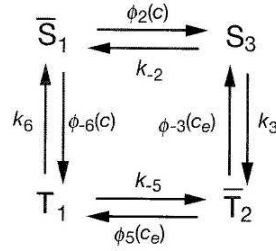


Figura 1.3. Diagramma della versione semplificata del modello SERCA di MacLennan et al. (1997). Le funzioni della velocità di transizione sono $\phi_2 = c^2 k_2 / (c^2 + K_1)$, $\phi_{-3} = k_{-3} K_4 c_e^2 / (1 + K_4 c_e^2)$, $\phi_5 = k_5 / (1 + K_4 c_e^2)$ e $\phi_{-6} = K_1 k_{-6} / (K_1 + c^2)$. Figura tratta da [1].

Ripetendo tale procedimento per ciascuna transizione, il modello scritto prima si traduce nel modello semplificato di figura 1.3. Si osserva che all'aumentare di c , l'equilibrio tra S_1 ed S_2 viene spostato ulteriormente verso S_2 . Questo aumenta la velocità con cui si raggiunge lo stato S_3 , ma diminuisce la velocità con cui si passa dallo stato S_1 allo stato T_1 . Pertanto, il passaggio da \bar{S}_1 a S_3 è una funzione crescente di c , mentre la transizione da \bar{S}_1 a T_1 è una funzione decrescente di c . Il flusso, molto simile all'equazione (1.9), diventa

$$J_{serca} = \frac{c^2 - K_1 K_2 K_3 K_4 K_5 K_6 c_e^2}{\beta_1 c^2 + \beta_2 c_e^2 + \beta_3 c^2 c_e^2 + \beta_4} \quad (1.14)$$

con costanti β_i che sono valori limite delle costanti α_i che appaiono nella 1.9.

1.4.3 *IPR*: recettore dell'inositolo trifosfato IP_3

La caratteristica principale dei recettori dell' IP_3 è che questi rispondono al graduale incremento di Ca^{2+} o di IP_3 stesso, in dipendenza dal tempo. Così, quando l' IP_3 o il Ca^{2+} aumentano gradualmente, la probabilità di apertura del recettore sale prima a picco, ma dopo un pò scende ad un livello più basso. Questo declino è detto 'adattamento' del recettore, nel senso che questo tende ad adattarsi ad una concentrazione mantenuta di Ca^{2+} o di

IP_3 . Significa che l' IPR non dipende da concentrazioni assolute di IP_3 o di Ca^{2+} , ma dalle variazioni di tali concentrazioni nel tempo. In altre parole, il recettore risponde ai cambiamenti di concentrazione del Ca^{2+} , e a quelli di concentrazione dell' IP_3 .

L'adattamento dell' IPR si ritiene essere il risultato, almeno in parte, del fatto che il Ca^{2+} stimola non solo il proprio rilascio, ma dopo un certo tempo lo inibisce. Sono stati costruiti diversi modelli fondati sull'idea che l'attivazione e l'inattivazione sequenziale del recettore dell' IP_3 mediata dal Ca^{2+} produce oscillazioni nella concentrazione di Ca^{2+} , IP_3 -dipendenti; si riportano il modello di *De Young e Keizer*, e la riduzione di questo ad un modello più semplice.

De Young e Keizer: un modello di recettore dell' IP_3 a otto stati

Il modello di *De Young e Keizer* [5], realizzato nel 1992, basato su misurazioni quantitative fatte in laboratorio, è stato uno dei primi modelli in grado di descrivere l'attivazione e l'inattivazione sequenziale dell' IPR , dovuta al Ca^{2+} .

Il modello nasce dall'idea di voler mostrare che combinando la Ca^{2+} - ATPasi e l'attività del Ca^{2+} nel reticolo endoplasmatico, e mantenendo fissa la concentrazione di IP_3 , si hanno oscillazioni della concentrazione di Ca^{2+} nel citoplasma. Se si aggiunge poi l'attività della fosfolipasi C, che provoca l'aumento di IP_3 , si hanno oltre alle oscillazioni della concentrazione di Ca^{2+} anche oscillazioni della concentrazione di IP_3 .

Il modello si fonda sul fatto che il recettore dell' IP_3 consiste di tre subunità equivalenti e indipendenti tra loro, ciascuna delle quali deve trovarsi in uno stato di conduzione perchè ci sia flusso di Ca^{2+} . Ogni subunità ha un sito di legame per l' IP_3 , un sito di legame di attivazione del Ca^{2+} , un sito

di legame di inattivazione del Ca^{2+} , e ciascuno dei quali può essere occupato oppure no; ogni subunità può trovarsi in uno degli otto stati.

Ogni stato viene etichettato con δ_{ijk} , in cui il primo indice si riferisce al sito di legame dell' IP_3 , il secondo al sito di attivazione del Ca^{2+} e il terzo al sito di inattivazione del Ca^{2+} ; i, j, k assumono il valore 0 se il sito di legame non è occupato, invece assumono il valore 1 se il sito di legame è occupato.

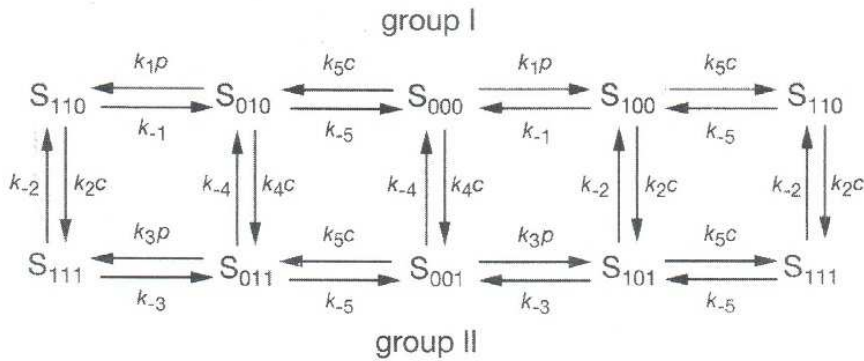


Figura 1.4. Diagramma dei legami per il modello di recettore dell' IP_3 , dove c denota $[Ca^{2+}]$ e p denota $[IP_3]$. Figura tratta da [1].

Questo modello presenta 24 costanti di velocità non tutti indipendenti. Per ridurre tale numero sono state fatte due ipotesi: le costanti di velocità sono indipendenti dal fatto che il Ca^{2+} sia legato o meno al sito di attivazione e le cinetiche di attivazione del Ca^{2+} non dipendono dall' IP_3 o dall'inattivazione del Ca^{2+} . Restano così soltanto 10 costanti di velocità k_1, \dots, k_5 e k_{-1}, \dots, k_{-5} . Denotiamo con x_{ijk} il numero di subunità negli stati δ_{ijk} . Le equazioni differenziali per questi sono basati sulla cinetica di massa-azione, e quindi, per esempio:

$$\frac{dx_{000}}{dt} = -(V_1 + V_2 + V_3) \quad (1.15)$$

con,

$$V_1 = k_1 p x_{000} - k_{-1} x_{100}, \quad (1.16)$$

$$V_2 = k_4 c x_{000} - k_{-4} x_{001}, \quad (1.17)$$

$$V_3 = k_5 c x_{000} - k_{-5} x_{010}, \quad (1.18)$$

dove p denota $[IP_3]$, e c denota $[Ca^{2+}]$.

V_1 è la velocità con cui l' IP_3 si lega al sito di legame dell' IP_3 e con cui lo lascia; V_2 è la velocità con cui il Ca^{2+} si lega al sito di inattivazione e con cui lo lascia, analogamente V_3 . Poichè i dati sperimentali indicano che le subunità del recettore agiscono in modo cooperativo, il modello assume che il recettore IP_3 libera il Ca^{2+} presente solo quando le tre subunità sono allo stato S_{110} e così la probabilità di apertura del recettore è x_{110}^3 .

Il modello fa riferimento a dati sperimentali di *Bezprozvanny et al.* [5], rispetto ai quali è stato elaborato un grafico della probabilità di apertura in funzione di $[Ca^{2+}]$, che ha la forma di una campana: per bassi valori di $[Ca^{2+}]$, all'aumentare di $[Ca^{2+}]$ aumenta anche la probabilità di apertura del recettore; non appena $[Ca^{2+}]$ oltrepassa un certo valore, questa probabilità di apertura comincia a diminuire. Si veda la fig. 1.5.

Riduzione del modello a otto stati del recettore dell' IP_3

La complessità del modello a otto stati, caratterizzato da sette equazioni differenziali e da numerosi parametri, ci induce a ricercare un modello più semplice, che possa conservare le proprietà essenziali del modello appena descritto. Poichè l' IP_3 si lega rapidamente al suo sito di legame e il Ca^{2+} si lega rapidamente al suo sito di attivazione, possiamo trascurare i dettagli che riguardano tali processi e assumere che il recettore si trovi allo stato quasi-stazionario rispetto al sito di legame dell' IP_3 e rispetto al sito di attivazione del Ca^{2+} [1],[5]. Questo implica che i valori dei parametri del modello sono quelli riportati in Tabella 1.1.

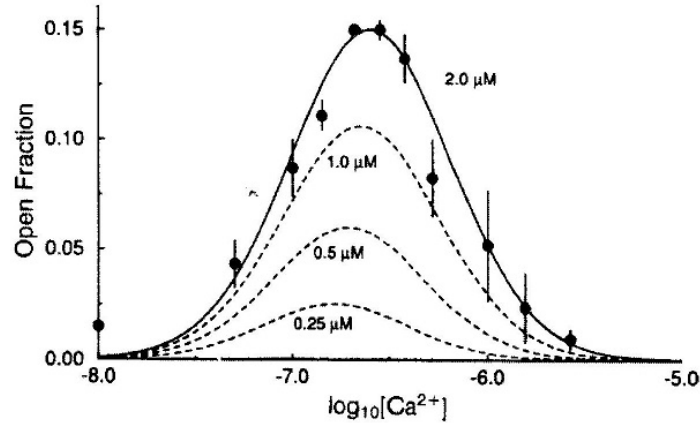


Figura 1.5. La probabilità di apertura del recettore dell' IP_3 , allo stato stazionario, come funzione di $[Ca^{2+}]$, nel modello di De Young e Keizer, con i dati sperimentali formulati da Bezprozvanny, per quattro differenti valori della concentrazione di IP_3 . Figura tratta da [5].

$k_1 = 400\mu M^{-1}s^{-1}$	$k_{-1} = 52s^{-1}$
$k_2 = 0.2\mu M^{-1}s^{-1}$	$k_{-2} = 0.21s^{-1}$
$k_3 = 400\mu M^{-1}s^{-1}$	$k_{-3} = 377.2s^{-1}$
$k_4 = 0.2\mu M^{-1}s^{-1}$	$k_{-4} = 0.029s^{-1}$
$k_5 = 20\mu M^{-1}s^{-1}$	$k_{-5} = 1.64s^{-1}$

Tabella 1.1. Parametri per il modello IPR a otto stati [5].

Dividiamo in due gruppi gli stati del recettore: quelli senza Ca^{2+} legato al sito di inattivazione (S_{000} , S_{010} , S_{100} , S_{110}) e quelli con Ca^{2+} legato al sito di inattivazione (S_{001} , S_{011} , S_{101} , S_{111}). Poichè il legame di IP_3 e il legame di Ca^{2+} al sito di attivazione avvengono velocemente, in ciascun gruppo gli stati del recettore vengono considerati allo stato quasi-stazionario. Tuttavia, le transizioni da un gruppo all'altro avvengono in maniera lenta e così gli stati del primo gruppo non sono in equilibrio con quelli del secondo.

Poniamo

$$y = x_{001} + x_{011} + x_{101} + x_{111} \quad (1.19)$$

e troviamo che

$$\frac{dy}{dt} = \left[\frac{(k_{-4}K_1K_2 + k_{-2}pK_4)c}{K_4K_2(p + K_1)} \right] (1 - y) - \left(\frac{k_{-2}p + k_{-4}K_3}{p + K_3} \right) y \quad (1.20)$$

L'equazione 1.20 può essere scritta nella forma

$$\tau_y(c, p) \frac{dy}{dt} = y_\infty(c, p) - y \quad (1.21)$$

che ci permette di confrontare un tale modello con le equazioni di Hodgkin-Huxley. La probabilità di apertura si ottiene dall'equazione

$$x_{110} = \frac{pc(1 - y)}{(p + K_1)(c + K_5)} \quad (1.22)$$

Si noti che $1 - y$, la percentuale di recettori che non vengono inattivati dal Ca^{2+} , gioca il ruolo di una variabile di inattivazione, simile alla variabile h delle equazioni di Hodgkin-Huxley. Il modello può così essere ridotto nella forma

$$x_{110} = \frac{pc}{(p + K_1)(c + K_5)} h \quad (1.23)$$

$$\tau_h(c, p) \frac{dh}{dt} = h_\infty(c, p) - h \quad (1.24)$$

in cui $h = 1 - y$ e, τ_h e h_∞ si calcolano dalla corrispondente equazione differenziale in y .

Studi recenti hanno dimostrato che un modello come questo presenta dei difetti. Questo modello, infatti, prevede che il Ca^{2+} si leghi all' IPR mediante cinetica di massa-azione, per cui la velocità di attivazione e di inattivazione dell' IPR aumenterebbe in maniera approssimativamente lineare con la concentrazione di Ca^{2+} , in disaccordo con un fatto provato sperimentalmente, che il ritmo di apertura dell' IPR , varia su un solo ordine di grandezza, mentre le due concentrazioni, $[Ca^{2+}]$ e $[IP_3]$, variano su diversi ordini di grandezza. Segue che, l'apertura dell' IPR non può essere controllata dalla semplice cinetica di massa-azione del legame di Ca^{2+} e di IP_3 , ma deve seguire uno schema cinetico che preveda una saturazione della velocità di legame.

Sneyd e Dufour: modello con saturazione della velocità di legame

Per saturazione della velocità di legame si intende che all'aumentare della concentrazione di $[Ca^{2+}]$ e di $[IP_3]$, ad un certo punto, tale velocità raggiunge un livello massimo, oltre il quale non può andare.

Tralasciamo la descrizione degli schemi di reazione e vediamo invece come è fatto il modello di Sneyd e Dufour. Per maggiori dettagli si veda [6].

Alcune proprietà che caratterizzano i vecchi modelli, nel modello di Sneyd e Dufour sono state mantenute. Per esempio, la proprietà secondo cui l' IPR è modulato dal legame di Ca^{2+} e di IP_3 , o la proprietà secondo cui il Ca^{2+} gioca un doppio ruolo, di attivazione e di inattivazione dell' IPR ; la differenza sta sostanzialmente nell'introduzione in questo nuovo modello dello schema di saturazione della velocità di legame.

Elenchiamo le principali caratteristiche del modello di Sneyd e Dufour:

1. L' IPR può essere aperto dall' IP_3 in assenza di Ca^{2+} , anche se con una conducibilità inferiore.
2. L' IPR può essere inattivato dal Ca^{2+} , in assenza di IP_3 .

3. Una volta che l' IP_3 è legato, l' IPR può inattivarsi spontaneamente indipendentemente dalla presenza di Ca^{2+} .
4. Una volta che l' IP_3 è legato, l' IPR può anche legarsi al Ca^{2+} per attivare il recettore. Pertanto vi è un rapporto intrinseco tra l'attivazione del recettore mediata dal Ca^{2+} e l'inattivazione spontanea del recettore.
5. Una volta che l' IPR è attivato dal legame con il Ca^{2+} , potrebbe essere inattivato dal legame con altro Ca^{2+} .
6. Il legame di Ca^{2+} ed IP_3 è sequenziale, non indipendente.

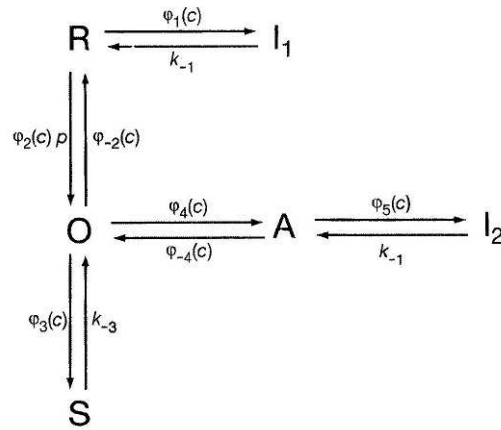


Figura 1.6. Modello dell' IP_3 -recettore con saturazione della velocità di legame. R sta per recettore, O per stato aperto, S per stato chiuso, A per stato attivato ed I_1 e I_2 stanno per stato inattivato. Figura tratta da [6].

Al modello che segue da queste assunzioni, descritto nella figura 1.6, corrispondono le equazioni:

$$\frac{dR}{dt} = \phi_{-2}O - \phi_2pR + k_{-1}I_1 - \phi_1R \quad (1.25)$$

$$\frac{dO}{dt} = \phi_2pR - (\phi_{-2} + \phi_4 + \phi_3)O + \phi_{-4}A + k_{-3}S \quad (1.26)$$

$$\frac{dA}{dt} = \phi_4O - \phi_{-4}A - \phi_5A + k_{-1}I_2 \quad (1.27)$$

$$\frac{dI_1}{dt} = \phi_1 R - K_{-1} I_1 \quad (1.28)$$

$$\frac{dI_2}{dt} = \phi_5 A - k_{-1} I_2 \quad (1.29)$$

dove $R + O + A + S + I_1 + I_2 = 1$, e

$$\phi_1(c) = \frac{\alpha_1 c}{\beta_1 + c}, \quad \phi_2(c) = \frac{\alpha_2 + \beta_2 c}{\beta_1 + c}, \quad \phi_3(c) = \frac{\alpha_3}{\beta_3 + c},$$

$$\phi_4(c) = \frac{\alpha_4 c}{\beta_3 + c}, \quad \phi_5(c) = \frac{\alpha_5 c}{\beta_5 + c},$$

$$\phi_{-2}(c) = \frac{\alpha_{-2} + \beta_{-2} c}{\beta_3 + c}, \quad \phi_{-4}(c) = \frac{\alpha_{-4}}{\beta_5 + c}$$

$\alpha_1 = 0.3s^{-1}$	$\beta_1 = 0.02\mu M$
$\alpha_2 = 0.77s^{-1}$	$\beta_2 = 1.38\mu M^{-1}s^{-1}$
$\alpha_{-2} = 76.6\mu Ms^{-1}$	$\beta_{-2} = 137s^{-1}$
$\alpha_3 = 6\mu Ms^{-1}$	$\beta_3 = 54.7\mu M$
$\alpha_4 = 4926s^{-1}$	$\alpha_{-4} = 1.43s^{-1}$
$\alpha_5 = 1.78s^{-1}$	$\beta_5 = 0.12\mu M$
$k_{-1} = 0.84s^{-1}$	$k_{-3} = 29.8s^{-1}$

Tabella 1.2. Parametri del modello per l'*IPR* con saturazione del tasso di legame.

I parametri sono stati determinati su base sperimentale e sono riportati nella tabella 1.2.

Assumiamo che l'*IPR* sia costituito da quattro subunità identiche e indipendenti, e che permette il passaggio di Ca^{2+} quando tutte e quattro le subunità si trovano allo stato O aperto o allo stato A attivo. Si assume inoltre che più subunità sono nello stato A, maggiore è la conducibilità. Un modo semplice per esprimere quanto detto è scrivere la probabilità di apertura, che indichiamo con P_0 , come

$$P_0 = (a_1 O + a_2 A)^4, \quad (1.30)$$

per alcune costanti a_1 e a_2 . Nel modello originale sono stati attribuiti i valori $a_1 = 0.1$ e $a_2 = 0.9$, ma possiamo attribuire a tali costanti valori differenti senza andare a modificare in maniera sensibile il comportamento del modello.

Capitolo 2

Meccanismi che determinano le oscillazioni di calcio

Nel capitolo precedente sono stati esposti i modelli che descrivono i flussi che intervengono nei meccanismi di controllo del Ca^{2+} per i principali componenti del 'toolkit' di segnalazione della cellula, tra cui l'afflusso di Ca^{2+} dovuto alla presenza di Ca^{2+} stesso, di acido arachidonico e di IP_3 nel citoplasma; la pompa Ca^{2+} ATP-asi, che favorisce il flusso di Ca^{2+} dall'esterno della cellula all'interno attraverso la membrana plasmatica, con la distinzione di due modelli: un modello descritto dall'equazione di Hill con coefficiente 2, poco realistico perchè non tiene conto della concentrazione di Ca^{2+} nel *ER*, e un modello formulato da MacLennan et al. che introduce rispetto ai primi modelli di Ca^{2+} ATP-asi la dipendenza dalla concentrazione di Ca^{2+} nel *ER*; il recettore dell' IP_3 , che svolge un ruolo di fondamentale importanza nella determinazione delle oscillazioni nella concentrazione di calcio.

Mettendo insieme la modellizzazione del 'toolkit' di segnalazione cellulare si costruiscono i modelli di dinamica del calcio. Si sceglie un modello per l'*IPR*, per l'ATPasi di Ca^{2+} e per l'afflusso, e si mettono insieme nella [1.3](#) e nella [1.4](#). Per ulteriori approfondimenti, in merito all'analisi di due modelli di questo tipo, si veda la Tesi di Laurea Triennale di D'Orio Maria Rita [\[10\]](#).

L'analisi del *modello complesso* nella tesi [10] mostra l'importanza che l' IP_3 ha nel determinare le oscillazioni di Ca^{2+} e che la frequenza di oscillazione dipende direttamente dal livello (in quel caso mantenuto costante) di IP_3 , nella misura in cui, questa aumenta all'aumentare del valore di p .

Si era concluso che, nella realtà, di modelli di *IPR* e *ATP*-asi di calcio ve ne sono in grandi quantità; denominatore comune di tutti i modelli esistenti è il fatto che la concentrazione di Ca^{2+} oscilla. L'unica differenza è data dalla differente forma delle oscillazioni, a seconda del modello.

A tal proposito, si è deciso di analizzare le due classi fondamentali di meccanismi che determinano le oscillazioni di Ca^{2+} : quelli basati sul feedback positivo-negativo al recettore dell'inositolo trisfosfato (IP3) e quelli basati sul feedback positivo-negativo al metabolismo dell'IP3. Queste due classi possono essere distinte sperimentalmente, in base alle loro diverse risposte agli impulsi di IP3. In generale, nella maggior parte delle cellule, questi due tipi di meccanismo saranno presenti contemporaneamente ed uno dei due è sempre dominante. Il modello risponde in maniera diversa in base alla forza dell'impulso di IP3. Negli ultimi anni i modellisti hanno provato ad interpretare questi risultati e altre risposte agli impulsi di IP3, in termini di un'analisi della dinamica del calcio in una scala temporale veloce-lenta, in cui il trasporto di calcio attraverso la membrana cellulare si presenta su una scala temporale lenta.

Ricordiamo ancora una volta che il calcio svolge un ruolo importante nel fornire segnali dall'esterno all'interno della cellula e che i meccanismi con cui questo avviene sono parecchio complicati. Comunemente, la segnalazione avviene per via di variazioni della concentrazione di Ca^{2+} all'interno della cellula, ovvero mediante oscillazioni di Ca^{2+} intracellulari. Le cellule interpretano questi segnali codificati in frequenza e controllano i loro processi rispondendo ai cambiamenti di frequenza.

Si è cercato di analizzare i meccanismi che stanno sotto alle oscillazioni di Ca^{2+} . Di solito, queste nascono in risposta ad una stimolazione esterna da parte di un agonista, tipicamente un ormone o un neurotrasmettitore: l'agonista si lega ai recettori sulla membrana cellulare e inizia una catena di reazioni che porta all'attivazione della fosfolipasi C (PLC), che poi catalizza la formazione di IP3; l'IP3 si diffonde attraverso il citoplasma cellulare e si lega ai recettori sul ER; la parte interna della cellula contiene una elevata concentrazione di Ca^{2+} ; i recettori di IP3 fungono da canali di Ca^{2+} e, quando l'IP3 si lega, si aprono, portando ad un grande afflusso di Ca^{2+} dal ER al citoplasma. Una volta rilasciato, il Ca^{2+} può essere pompato indietro nel ER, o pompato fuori dalla cellula. Se questi fossero gli unici processi, in risposta alla stimolazione agonista, la concentrazione di calcio potrebbe solo aumentare o annullarsi. Tuttavia, in molti tipi di cellule questa concentrazione oscilla, passando da \ a ER.

Ci sono due principali classi di meccanismi di feedback che sono stati studiati negli ultimi 20 anni e queste due classi sono state la base per la maggior parte degli studi quantitativi fatti sulle oscillazioni di Ca^{2+} :

1. Su una scala di tempo veloce il Ca^{2+} si lega al recettore dell'IP3 e lo attiva, aumentandone la probabilità di apertura, formando così un ciclo di feedback positivi. Tuttavia, su una scala temporale più lenta, il Ca^{2+} si lega ai recettori dell'IP3 in un sito di legame diverso e diminuisce la sua probabilità di apertura, formando così un ciclo di feedback negativi più lento. C'è una dipendenza dal tempo per cui il calcio attiva ed inattiva il recettore dell'IP3, che ha un ruolo cruciale nel generare oscillazioni.
2. Il Ca^{2+} esercita anche un feedback positivo e negativo sulla produzione e sul degrado di IP3. Il Ca^{2+} può attivare la PLC, portando alla formazione di più IP3, o può attivare l'enzima che degrada IP3 in IP4. Questo tipo di metabolismo dell'IP3, dipendente da Ca^{2+} , può anche dare origine ad elevate oscillazioni di Ca^{2+} .

Due sono le principali classi di modelli che si basano su questi due meccanismi. La Classe I è quella dei modelli che presuppongono che le oscillazioni dipendano dalla dinamica di apertura del recettore dell'IP3; mentre i modelli di Classe II presuppongono che il metabolismo dell'IP3, dipendente dal Ca^{2+} , alimenti le oscillazioni di Ca^{2+} .

Nei modelli di Classe I si verificano oscillazioni di Ca^{2+} a concentrazione costante di IP3 e non appena aumenta la concentrazione di IP3 aumenta la frequenza di oscillazione. Nei modelli di Classe II, invece, le oscillazioni di Ca^{2+} sono necessariamente accompagnate dalle oscillazioni di IP3.

Per via dell'importanza fisiologica delle oscillazioni di Ca^{2+} , sono state fatte numerose indagini sperimentali che cercano di determinare quali classi di meccanismo controllano le oscillazioni di Ca^{2+} osservate; non sempre risulta facile dare una risposta generale a questo quesito, perchè i meccanismi sottostanti possono dipendere fortemente dai tipi di cellule.

Diversi esperimenti sostengono che in alcuni tipi di cellule il Ca^{2+} può oscillare in assenza di oscillazioni di IP3. Per esempio, le oscillazioni di Ca^{2+} hanno dimostrato di persistere nelle cellule acinose pancreatiche del topo, in presenza di un analogo non metabolizzabile di IP3, in presenza di inibitori di sintesi di IP3, e quando il metabolismo di IP3, dipendente da Ca^{2+} , viene eliminato. L'efficacia del bloccaggio di IP3 negli esperimenti è però sconosciuta, e quindi i risultati sono difficili da interpretare, ed inoltre, il disegno sperimentale non può replicare il comportamento delle cellule in vivo. Ad esempio, è possibile che le oscillazioni possano persistere quando si mantiene costante l'IP3, ma questo potrebbe non essere il meccanismo effettivo che guida le oscillazioni in vivo. Si risolve la questione ricorrendo alla tecnologia per misurare direttamente la concentrazione di IP3.

Si è visto che in qualche tipo di cellula le oscillazioni di Ca^{2+} sono accompagnate da oscillazioni di IP3, mentre in altri tipi di cellule l'IP3 è costante durante il corso delle oscillazioni di Ca^{2+} . Il *modello complesso* [10] aveva mostrato il primo di questi comportamenti, mentre il *modello semplice* [10]

aveva mostrato il secondo di questi.

Sebbene quest'ultimo esperimento mostra inequivocabilmente che le oscillazioni di Ca^{2+} devono essere governate da un meccanismo di Classe I, i precedenti esperimenti sono più difficili da interpretare; le oscillazioni di IP3 possono passivamente seguire alle oscillazioni di Ca^{2+} , piuttosto che guidarle. In questo caso, le oscillazioni di Ca^{2+} continuerebbero, anche se forse leggermente alterate, se scomparissero le oscillazioni di IP3.

Un altro svantaggio di queste misurazioni dirette di concentrazione di IP3 è che essi sono estremamente difficili da realizzare. Queste difficoltà hanno motivato lo sviluppo di metodi più indiretti per la determinazione dei meccanismi sottostanti alle oscillazioni di Ca^{2+} .

Recentemente, Sneyd et al. hanno proposto un semplice metodo sperimentale in grado di distinguere tra i meccanismi di Classe I e II. Hanno studiato una gamma di modelli differenti (13 in totale), ciascuno dei quali appartenente a meccanismi di Classe I o di Classe II ed hanno provato la risposta di ciascuno di questi modelli ad un impulso di IP3 applicato a una cellula che presenta oscillazioni indotte da agonisti. Tutti i modelli della Classe I hanno risposto qualitativamente nello stesso modo, con un aumento della frequenza delle oscillazioni, mentre i modelli di Classe II hanno risposto tutti quanti con un ritardo prima del picco successivo. Sneyd et al. hanno testato queste predizioni teoriche in due tipi diversi di cellule, cellule acinose pancreatiche e muscoli lisci delle vie aeree. Applicando un impulso di IP3 a una cellula hanno mostrato oscillazioni di Ca^{2+} indotte da agonisti e misurato la risposta delle oscillazioni di Ca^{2+} . Se aumenta la frequenza di oscillazione, le oscillazioni Ca^{2+} dipendono dal tempo di apertura del recettore del IP3 (cioè si tratta di un meccanismo della Classe I). Al contrario, una conseguente fase di ritardo nelle oscillazioni di Ca^{2+} , senza alcuna successiva modifica della frequenza, indica che il metabolismo di IP3 dipendente dal Ca^{2+} determina le oscillazioni Ca^{2+} e che quindi è più appropriata la Classe II dei modelli. La conclusione è stata questa: nelle cellule acinose pancreatiche come in

altri tipi di cellule, il metabolismo dell'IP3 dipendente dal calcio guida le oscillazioni; mentre nelle cellule muscolari lisce delle vie aeree come in altri tipi ancora di cellule, l'apertura tempo-dipendente del recettore dell' IP3 è responsabile delle oscillazioni di Ca^{2+} . Una potenziale difficoltà con questo semplice approccio sperimentale è che la maggior parte di tipi di cellule avranno entrambi i meccanismi, ciascuno in una certa misura. In questo caso, è possibile che la risposta ad un impulso di IP3 sia ambigua, essendo governata in parte da un meccanismo di Classe I e in parte da un meccanismo di Classe II, e quindi impossibile da interpretare. Per risolvere una tale ambiguità è stato importante per i modellisti acquisire una comprensione teorica migliore dell'interazione dei due meccanismi oscillatori, così da prevedere più accuratamente quale sarà la risposta di una cellula con entrambi i meccanismi presenti.

Si è analizzato il comportamento delle due classi di modelli quando sottoposti a impulsi di IP3, utile a comprendere meglio il caso in cui sono presenti entrambi i meccanismi nella cellula. Abbiamo analizzato un modello di basse dimensioni, un sistema di quattro equazioni differenziali ordinarie, del primo ordine, accoppiate. Variando i parametri è stato possibile classificare il modello in quattro diversi modelli. Due forme di questi sono i modelli di Classe I e di Classe II, mentre le altre due forme costituiscono due casi estremi; questi ultimi sono importanti per comprendere l'interazione dei primi due meccanismi oscillatori.

Tutti i modelli di oscillazioni di Ca^{2+} sono stati sottoposti alla 'prova dinamica da IP3', cioè, si è studiata la risposta ad un impulso di IP3 applicato esternamente durante le oscillazioni indotte da agonisti. Sono stati sfruttati i diagrammi di biforcazione per dare una spiegazione qualitativa della risposta di ogni modello ad un impulso di IP3 applicato esternamente.

Inoltre, quando sono presenti sia i meccanismi di Classe I che di Classe II, uno è sempre dominante e regola la risposta ad un impulso di IP3. Il ricorso alla 'prova dinamica' con un impulso di IP3 è stata sufficiente ai modellisti

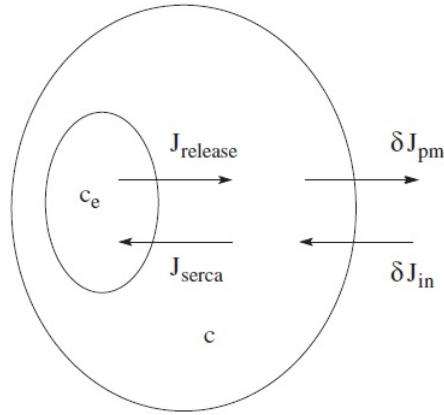


Figura 2.1. Diagramma dei principali flussi di Ca^{2+} basati sullo scambio di Ca^{2+} e sulla modulazione di IP3 indotta dalle oscillazioni di Ca^{2+}

per determinare il meccanismo oscillatorio sottostante.

2.1 Modelli di dinamica del Ca^{2+}

Il modello che abbiamo considerato si basa su quello di Atri et al. È fondato su due importanti proprietà dei recettori dell'IP3:

1. Allo stato stazionario, la probabilità di apertura dei recettori dell'IP3 ha una dipendenza a campana dalla concentrazione di Ca^{2+} (1.5);
2. Un aumento graduale della concentrazione di Ca^{2+} porta ad una rapida attivazione e ad una successiva inattivazione più lenta dei recettori dell'IP3.

Il modello Atri assume che la Ca^{2+} -attivazione dei recettori dell'IP3 sia istantanea, e introduce una variabile di inattivazione n che si evolve su una scala temporale più lenta, governata dal parametro τ . Le concentrazioni di Ca^{2+} nel citoplasma e nel reticolo endoplasmatico sono indicate con c e c_e rispettivamente. Le dinamiche di c e c_e sono ciascuna determinate da una equazione differenziale che descrive i flussi di Ca^{2+} (2.1). Il rilascio di Ca^{2+}

dai recettori dell'IP3, indicato da $J_{release}$, è proporzionale alla differenza tra la concentrazione di calcio nel ER e quella nel citoplasma. Ci sono due termini di rimozione (ovvero negativi), uno per la pompa SERCA, J_{serca} , che modella il sequestro di Ca^{2+} nel ER, e uno per la pompa che si trova sulla membrana plasmatica, J_{pm} , che modella l'estruzione di Ca^{2+} dalla cellula. L'entrata di Ca^{2+} attraverso la membrana plasmatica, J_{in} , è modellizzata da una funzione lineare di ν , che regola la velocità massima della formazione di IP3 e dipende direttamente dal livello di agonista applicato alla cellula. In sintesi,

$$\frac{dc}{dt} = J_{release} - J_{serca} + \delta(J_{in} - J_{pm}), \quad (2.1)$$

$$\frac{dc_e}{dt} = \gamma(J_{serca} - J_{release}), \quad (2.2)$$

dove, il parametro γ è il rapporto tra volume citosolico e volume del ER, mentre la a-dimensionalizzazione del parametro δ è un fattore in scala del flusso totale di Ca^{2+} della membrana plasmatica rispetto al flusso del ER. La dinamica dell'IP3 e dei recettori dell'IP3 sono incorporati nel modello, assumendo che la produzione di IP3 attivata dal Ca^{2+} sia quella descritta dal modello di De Young and Keizer [5].

Lasciamo che p continui ad indicare la concentrazione di IP3 nella cellula. La variabile n indica la percentuale di recettori non disattivati dal Ca^{2+} . La sua evoluzione comporta implicitamente nel modello, un ritardo di tempo per il feedback negativo di Ca^{2+} sui recettori dell'IP3; questo è controllato dal tasso di velocità τ . Dunque,

$$\frac{dn}{dt} = \frac{1}{\tau} \left(\frac{k_2^2}{k_2^2 + c^2} - n \right), \quad (2.3)$$

$$\frac{dp}{dt} = \nu \left(\frac{c + (1 - \alpha)k_4}{c + k_4} \right) - \beta p, \quad (2.4)$$

dove $0 \leq \alpha \leq 1$.

I vari flussi di Ca^{2+} sono:

$$J_{release} = \left[k_{flux} \left(\mu_0 + \frac{\mu_1 p}{k_\mu + p} \right) n \left(b + \frac{V_1 c}{k_1 + c} \right) \right] (c_e - c), \quad (2.5)$$

$$J_{serca} = \frac{V_e c}{k_e + c} \quad (2.6)$$

$$J_{pm} = \frac{V_p c^2}{k_p^2 + c^2}, \quad (2.7)$$

$$J_{in} = \alpha_1 + \alpha_2 \frac{\nu}{\beta} \quad (2.8)$$

Il modello è costruito in modo che la risposta del Ca^{2+} alla formazione di IP3 e ai recettori dell'IP3 possa essere controllata regolando i parametri α e τ ; tutti gli altri valori dei parametri sono riportati nella tabella 2.1. La costante di tempo τ non è mai negativa, ma può essere arbitrariamente vicina a 0. Quando $\tau > 0$, la modulazione del Ca^{2+} per via dell'apertura del recettore dell'IP3 si verifica con un ritardo, in modo che l'apertura del recettore dell'IP3 sia dipendente dal tempo e il modello appartenga alla Classe I (maggiore è il valore di τ , più è lenta la risposta effettiva dei recettori dell'IP3 ai cambiamenti della concentrazione di Ca^{2+}). Quando $\tau \rightarrow 0$, la dinamica di n si riduce ad una risposta istantanea alle variazioni di c :

$$n(c) = \frac{k_2^2}{k_2^2 + c^2}. \quad (2.9)$$

Si noti che questa riduzione non rende indipendente dalla concentrazione di Ca^{2+} lo stato di stabilità dei recettori dell'IP3. Tuttavia, questa riduzione elimina la dipendenza dal tempo di apertura del recettore utilizzata nei modelli di Classe I. Di conseguenza, i modelli con 2.9 al posto di 2.3 non sono di Classe I. Allo stesso modo, se $\alpha > 0$, ovvero la concentrazione p di IP3 oscilla insieme alla concentrazione c di Ca^{2+} , il modello appartiene alla Classe II. Nel caso $\alpha = 0$, l'equazione 2.4 si riduce a:

$$\frac{dp}{dt} = \nu - \beta p, \quad (2.10)$$

$\delta = 0.01$	$k_1 = 1.1\mu M$
$\gamma = 5.405$	$k_2 = 0.7\mu M s^{-1}$
$k_{flux} = 6.0\mu M s^{-1}$	$k_\mu = 4\mu M$
$V_p = 24\mu M s^{-1}$	$\mu_0 = 0.567$
$k_p = 0.4\mu M$	$\mu_1 = 0.433$
$V_e = 20\mu M s^{-1}$	$b = 0.111$
$k_e = 0.06\mu M s^{-1}$	$V_1 = 0.889$
$\alpha_1 = 1\mu M s^{-1}$	$\alpha_2 = 0.2s^{-1}$
$\beta = 0.08s^{-1}$	$k_4 = 1.1\mu M$

Tabella 2.1. Valori dei parametri del modello.

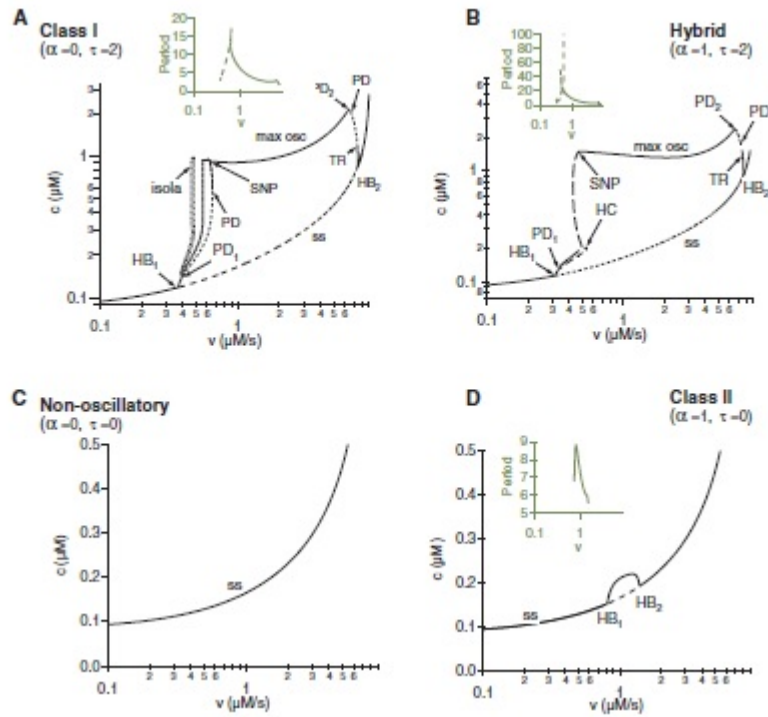


Figura 2.2. Diagramma di biforcazione dei quattro modelli. Il comportamento di ciascun modello viene presentato come una funzione della stimolazione agonista ν .

In questo caso il modello non ha un metabolismo di IP3 dipendente dal Ca^{2+} , e quindi la concentrazione di IP3 tende all'equilibrio stabile ($p = \frac{\nu}{\beta}$). Mettendo insieme α e τ possiamo interpolare i modelli e studiare così il passaggio da un modello di Classe I ad uno di Classe II e viceversa.

Il comportamento di ciascun modello è riassunto in uno schema di biforcazione (2.2), con ν , il tasso massimo di formazione di IP3, come parametro principale di biforcazione.

Descriviamo ciascun modello nei dettagli.

2.2 Modello di Classe I

In questo modello, l'apertura tempo-dipendente del recettore dell'IP3 guida le oscillazioni di Ca^{2+} , mentre la concentrazione di IP3 tende allo stato stazionario stabile. I parametri di controllo sono impostati su $\alpha = 0$ e $\tau = 2$. Come si evince dallo schema di biforcazione del modello di Classe I (2.2) le oscillazioni di Ca^{2+} si verificano per un range di valori di ν limitato da due biforcazioni di Hopf supercritiche, HB1 e HB2.

La curva denominata 'max osc' indica il massimo valore nelle oscillazioni di c . La frequenza delle oscillazioni di Ca^{2+} aumenta all'aumentare di ν .

Nelle figure 2.3 e 2.4 sono state mostrate tipiche oscillazioni di Ca^{2+} , note come oscillazioni spike [10], per due differenti valori di ν in un modello di Classe I e, insieme a queste, il grafico della concentrazione p di IP3.

Si osserva che all'aumentare di ν si ha un aumento della frequenza delle oscillazioni e che, come ci si aspettava dall'analisi del diagramma di biforcazione, il picco massimo di concentrazione di Ca^{2+} è al di sotto del valore 1.

I valori iniziali del problema sono stati $c = 0.2$, $c_e = 7$, $n = 0.6$ e $p = 5$.

Il sistema di equazioni differenziali è stato risolto in Matlab. Per un'analisi numerica dettagliata si rimanda la discussione più avanti.

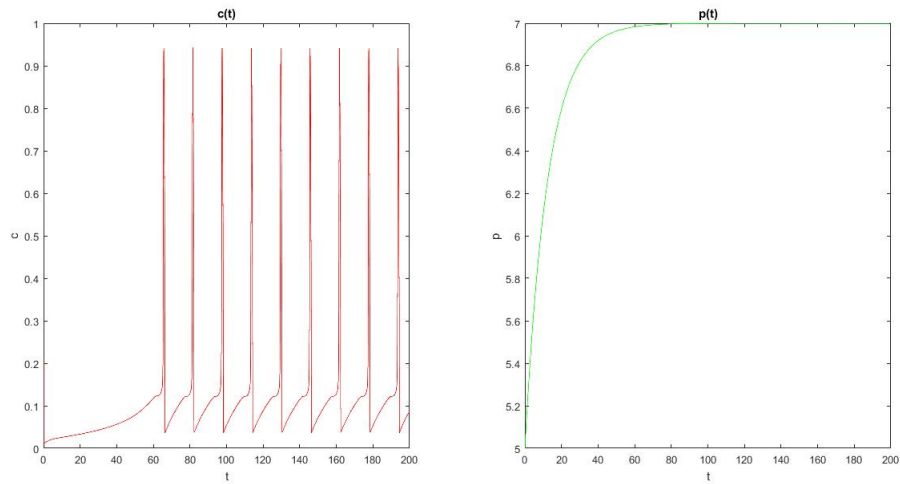


Figura 2.3. Modello di Classe I in cui $\nu = 0.56$, $\alpha = 0$, $\tau = 2$

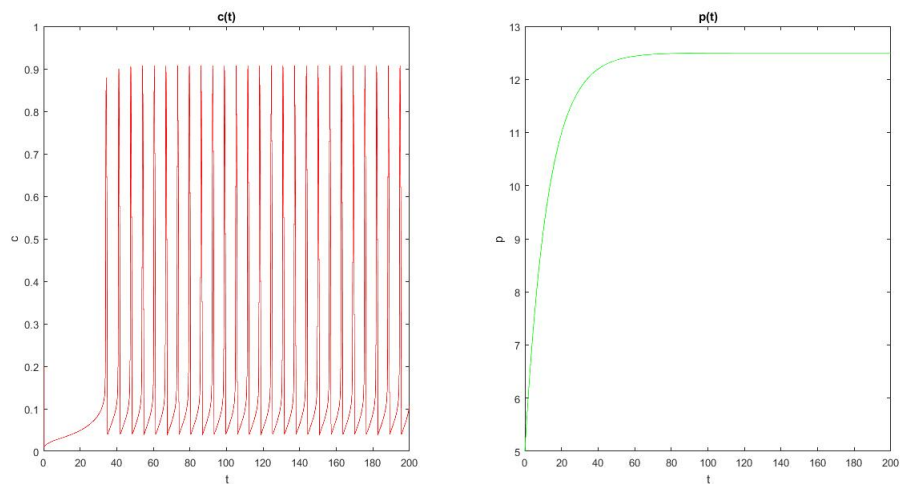


Figura 2.4. Modello di Classe I in cui $\nu = 1$, $\alpha = 0$, $\tau = 2$

2.3 Modello Ibrido

Questo modello è un ibrido tra i modelli di Classe I e quelli di Classe II. Tiene conto del feedback del Ca^{2+} al metabolismo IP3 (ovvero $\alpha = 1$). Inoltre, presuppone che l'inattivazione da parte del Ca^{2+} dei recettori dell'IP3 è lenta (ovvero $\tau = 2$), e questo vale a dire che l'apertura del recettore dell'IP3 è dipendente dal tempo.

Come nel modello di Classe I, le oscillazioni della concentrazione di Ca^{2+} per il modello Ibrido sorgono e scompaiono attraverso due biforcazioni supercritiche di Hopf quando ν aumenta.

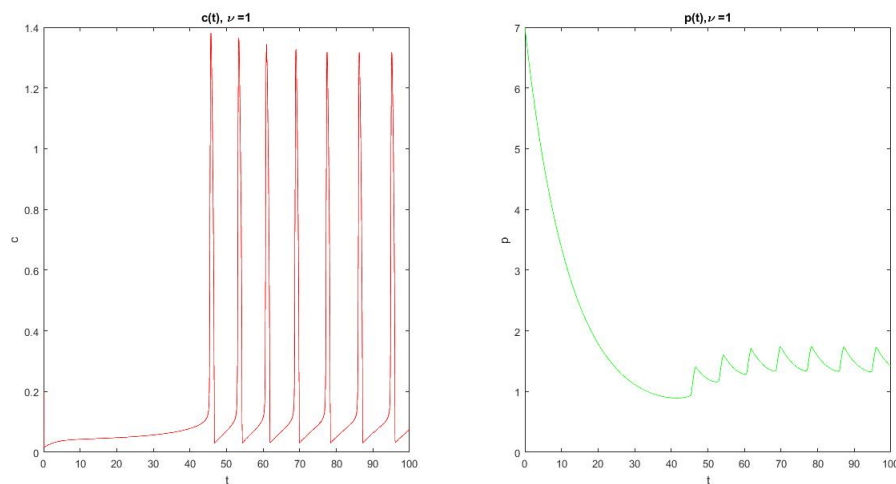


Figura 2.5. Modello Ibrido in cui $\nu = 1$, $\alpha = 1$, $\tau = 2$

Il periodo di queste oscillazioni diminuisce per una maggiore intensità dello stimolo, e quindi, come per il modello di Classe I, all'aumentare di ν , valore preso in un piccolo range di valori (si veda in figura 2.2), si ha un aumento della frequenza delle oscillazioni. Si vedano le due figure 2.5 e 2.6. I valori iniziali attribuiti al problema sono stati $c = 0.2$, $c_e = 10$, $n = 0.6$ e $p = 7$. A differenza del modello di Classe I abbiamo oscillazioni di p che accompagnano le oscillazioni di c .

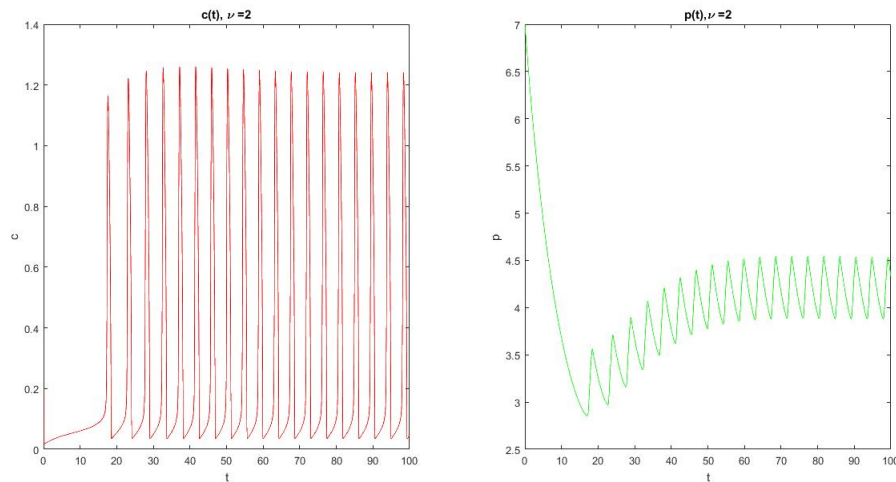


Figura 2.6. Modello Ibrido in cui $\nu = 2$, $\alpha = 1$, $\tau = 2$

2.4 Modello di Classe II

In questo modello si ha $n(c) = k_2^2/(k_2^2 + c^2)$, per cui la probabilità di apertura del recettore dell'IP3 non è dipendente dal tempo.

Il modello di Classe II tiene conto del feedback del Ca^{2+} sulla formazione di IP3 e quindi $\alpha = 1$. Le oscillazioni di Ca^{2+} sono presenti solo in un limitato range di ν , limitate da due biforcazioni supercritiche di Hopf, come si può vedere in 2.2. Per indurre oscillazioni della concentrazione di Ca^{2+} nel modello di Classe II è necessario un valore di ν che prendiamo in un più piccolo range di valori rispetto ai modelli di Classe I e del modello Ibrido. Questi ultimi si basano sul fatto che a guidare le oscillazioni è la cinetica del recettore, mentre il modello di Classe II si basa solo sulla dinamica dell'IP3. Questo dominio limitato, per cui si hanno oscillazioni di calcio, suggerisce che, in questo modello, l'apertura del recettore tempo-dipendente gioca un ruolo fondamentale nella regolazione della dinamica del Ca^{2+} .

Si osservano differenti oscillazioni di c , oltre che oscillazioni della concentrazione p di IP3, rispetto al modello di Classe I.

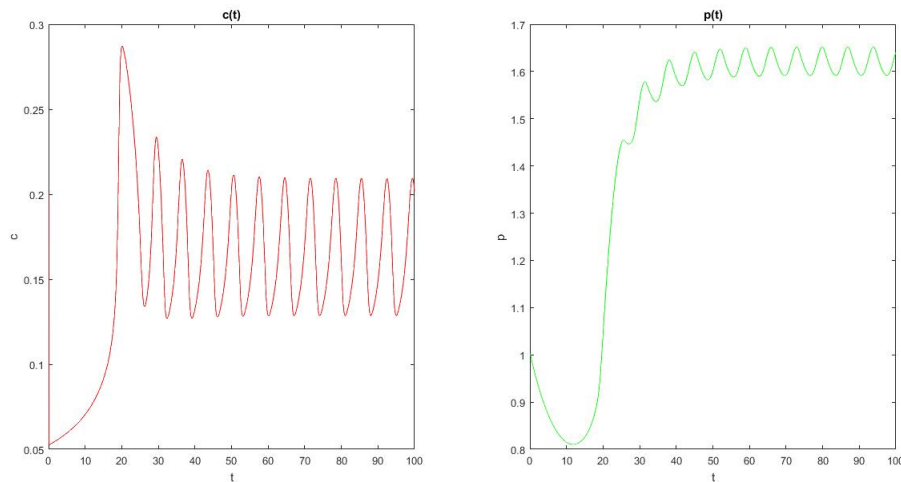


Figura 2.7. Modello di Classe II in cui $\nu = 1$, $\alpha = 1$, $\tau = 0$

2.5 Modello Non Oscillatorio

Il nostro quarto modello omette il feedback del Ca^{2+} sulla formazione di IP3 e assume che l'inattivazione da parte del Ca^{2+} dei recettori dell'IP3 è istantaneo. Quindi, $\alpha = 0$ ed $n(c) = k_2^2 / (k_2^2 + c^2)$. Questo modello non possiede un meccanismo per guidare le oscillazioni del Ca^{2+} , e dunque le oscillazioni non sono presenti.

2.6 Prova dinamica sotto l'azione dell'impulso di IP3

Si sono studiati i modelli di Classe I, Classe II ed il modello Ibrido, sotto l'azione di un impulso istantaneo di IP3. Le risposte date dai modelli di Classe I e quelli di Classe II sono alquanto diverse. Gli impulsi di IP3 sono stati applicati una volta che ogni sistema si è stabilito lungo oscillazioni stabili, ovvero ad un livello di stimolo agonistico, ν , in cui sono supportate le oscillazioni di Ca^{2+} . Abbiamo ancora una volta fatto riferimento ai diagrammi di biforcazione di ciascun modello per determinare il range di valori di ν per

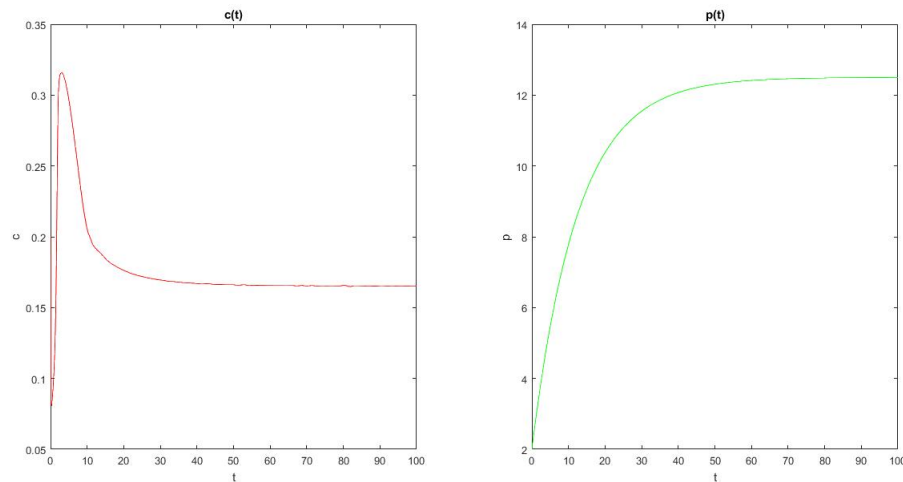


Figura 2.8. Modello non oscillatorio in cui $\nu = 1$, $\alpha = 0$, $\tau = 0$

cui il modello supporta stabili oscillazioni di Ca^{2+} .

Gli impulsi di IP3 sono stati applicati aggiungendo nel modello, al secondo membro di 2.4, una funzione dipendente dal tempo. M indica la forza dell'impulso, T_p è il tempo di applicazione, ΔT_p è la durata dell'impulso, mentre H è la funzione di Heaviside standard:

$$H(x) = \begin{cases} 0 & \text{if } x < 0, \\ 1 & \text{if } x \geq 0 \end{cases} \quad (2.11)$$

L'impulso di IP3 è temporaneo, tenendo conto del degrado naturale di IP3. La durata dell'impulso, ΔT_p , è stata impostata ad 1 secondo.

Esistono due diverse risposte all'impulso per il modello di Classe I. Per bassi livelli dello stimolo agonista ν , l'impulso conduce ad alcune oscillazioni veloci seguite da un lungo ritardo prima che il sistema riprenda le oscillazioni spike nella sua consueta forma 2.9. È stato testato che maggiore è l'impulso, maggiore è il ritardo. Se l'impulso è mantenuto fisso e aumentiamo i livelli di ν , il ritardo si accorcia, come possiamo vedere in figura 2.10. Per $\nu \geq 1,04$ si è anche visto che non c'è più ritardo a seguito delle oscillazioni veloci. Queste

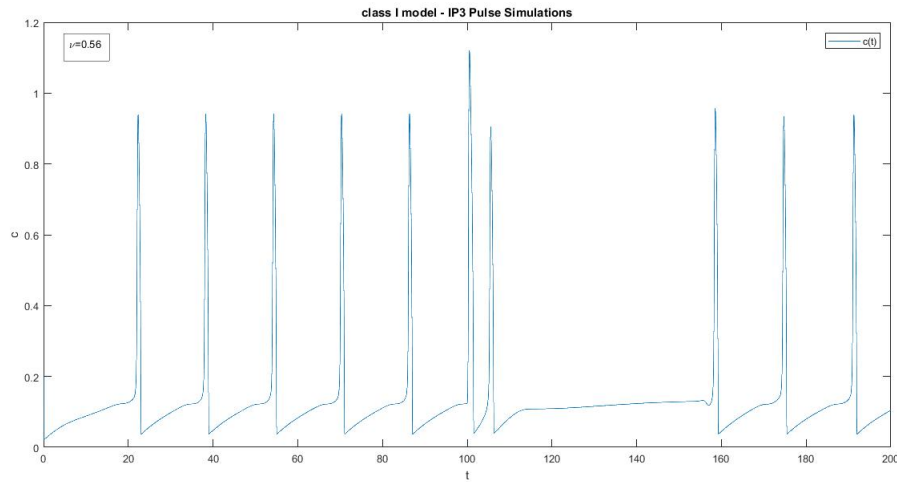


Figura 2.9. Risposta del modello di Classe I ad un impulso di IP3; $\nu = 0.56$, $\alpha = 0$, $\tau = 2$

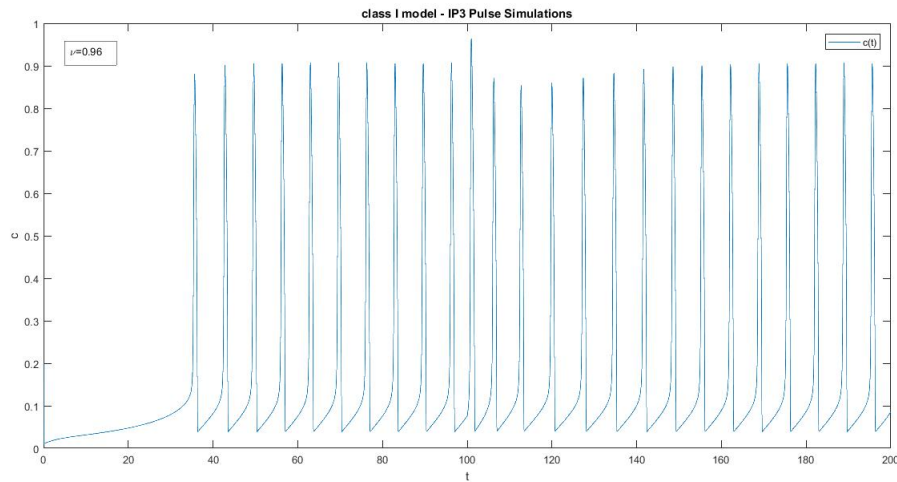


Figura 2.10. Risposta del modello di Classe I ad un impulso di IP3; $\nu = 0.96$, $\alpha = 0$, $\tau = 2$

tornano alla loro forma originale una volta che l'IP3, a seguito dell'impulso, è stato degradato. Le risposte del modello Ibrido sono simili a quelle del modello di Classe I, come possiamo vedere in figura 2.11 e 2.12. Mentre, nel modello di Classe II, qualunque sia l'impulso di IP3, le oscillazioni di Ca^{2+}

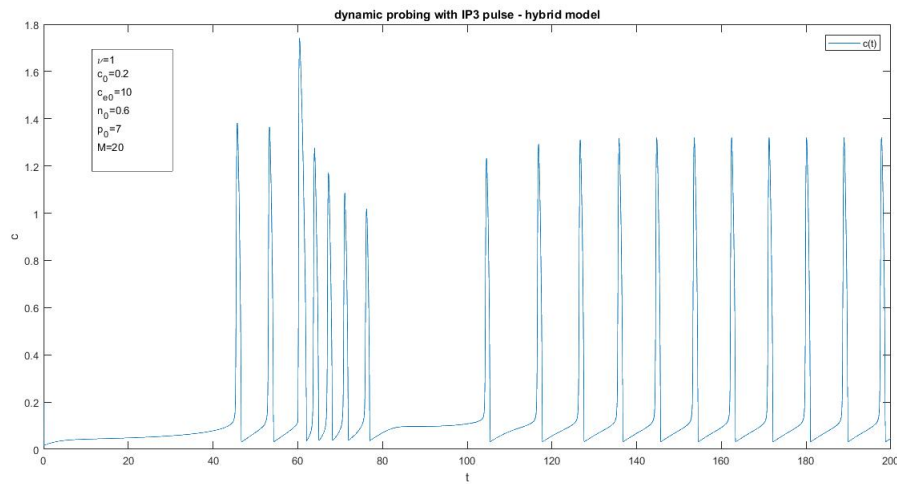


Figura 2.11. Risposta del modello Ibrido ad un impulso di IP3; $\nu = 1$, $\alpha = 1$, $\tau = 2$

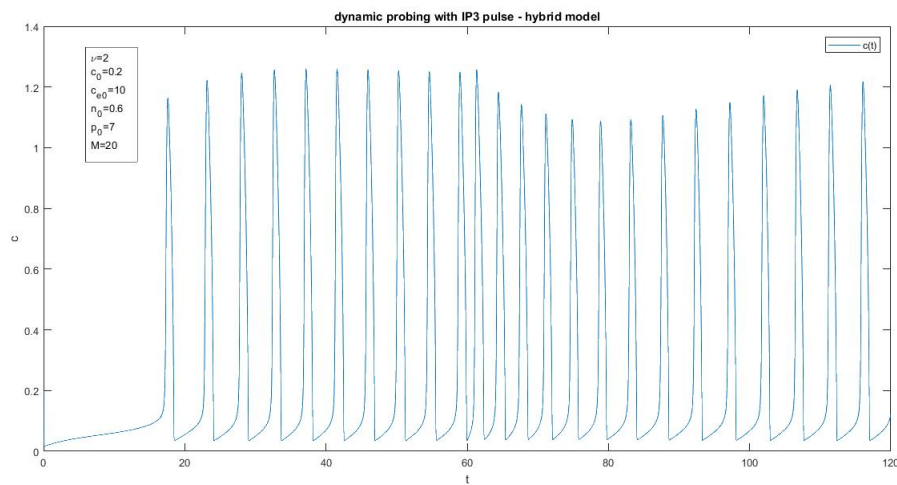


Figura 2.12. Risposta del modello Ibrido ad un impulso di IP3; $\nu = 2$, $\alpha = 1$, $\tau = 0$

mostrano un ritardo di fase dopo l'impulso. Si veda in figura [2.13](#).

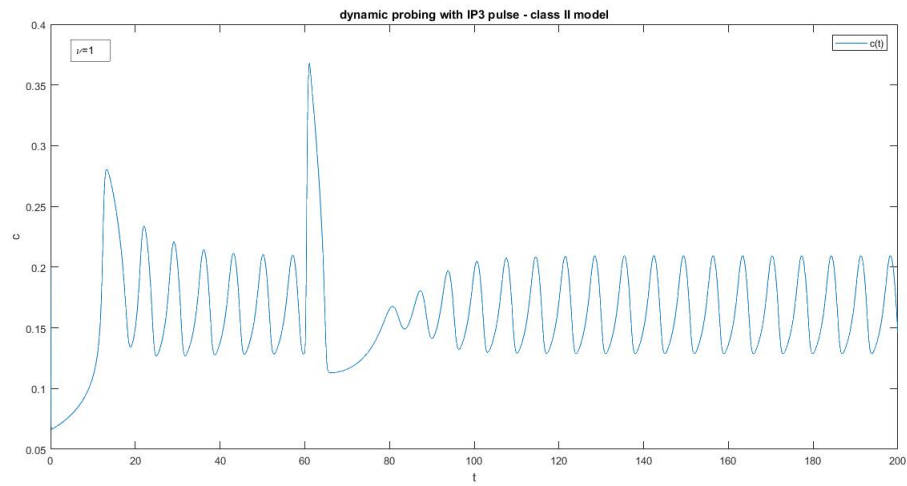


Figura 2.13. Risposta del modello di Classe II ad un impulso di IP3; $\nu = 2$, $\alpha = 1$, $\tau = 0$

Capitolo 3

Solutori di equazioni differenziali ordinarie in Matlab

Per l'integrazione di sistemi di equazioni differenziali ordinarie del primo ordine con condizioni iniziali è possibile fare ricorso al pacchetto MATLAB ODE. Le *functions* ode23 ed ode45, incluse in esso, sono state progettate per la risoluzione di problemi non stiff, mentre ode15s ed ode23s per la risoluzione di problemi stiff.

Vedremo alcuni aspetti matematici che caratterizzano i metodi su cui sono stati costruiti tali solutori.

3.1 Problema ai valori iniziali

Si consideri il problema al valore iniziale per un sistema di n equazioni differenziali ordinarie del primo ordine

$$y' = f(t, y), \quad y(t_0) = y_0 \quad (3.1)$$

sull'intervallo $[t_0, t_f]$ dove la funzione $f(t, y)$

$$f : \mathbb{R} \times \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}^n$$

risulta essere continua in t e lipschitziana in y , ovvero $\exists L > 0$ per cui

$$|f(t, y_1) - f(t, y_2)| \leq L|y_1 - y_2| \quad \forall t \in [t_0, t_f], \forall y_1, y_2 \in \mathbb{R}^n$$

Sotto queste condizioni il problema di Cauchy 3.1 ammette una ed una sola soluzione $y(t)$, per $t \in [t_0, t_f]$.

I metodi numerici di risoluzione del problema 3.1, detti anche metodi di integrazione ad un passo, determinano in maniera approssimata i valori della y in corrispondenza di un insieme discreto di valori di t :

$$t_{iniziale} = t_0, t_1, \dots, t_i, t_{i+1}, \dots, t_f$$

dove $h_i = t_{i+1} - t_i$ indica il generico passo di integrazione. Per semplicità si suppone in genere che il passo di integrazione sia costante e pari ad $h = (t_f - t_0)/N$, con N il numero totale di passi di integrazione. Qualsiasi procedura numerica di integrazione ad un passo segue la stessa semplice idea di base: i differenziali dy e dt vengono riscritti in 3.1 come incrementi finiti Δy e Δt . Moltiplicando le equazioni per Δt si ottengono delle formule algebriche che danno la variazione della variabile dipendente y , al variare, passo dopo passo, della variabile indipendente Δt . Nel limite per $\Delta t \rightarrow 0$ la soluzione numerica, campionata in un numero sempre maggiore di punti, tenderà alla soluzione esatta del problema differenziale di partenza. L'implementazione di una simile procedura corrisponde al ben noto metodo di integrazione di Eulero.

La formula di integrazione corrispondente al metodo di Eulero, che fa 'avanzare' una soluzione, nota al generico passo i , dal punto t_i a quello successivo $t_{i+1} = t_i + h$ è la seguente:

$$\eta_{i+1} = \eta_i + hf(t_i, \eta_i) \tag{3.2}$$

La 3.2 è una tipica formula 'non simmetrica', nel senso che sfrutta informazioni, le derivate $f(t_i, \eta_i)$, valutate solo al primo estremo dell'intervallo $[t_i, t_{i+1}]$. Ciò rende la 'predizione' del valore η_{i+1} accurata a meno di un termine di correzione di $O(h^2)$, per cui la formula di Eulero 3.2 corrisponde ad un metodo del primo ordine.

Il metodo di Eulero non è raccomandabile per un uso pratico per due motivi principali:

- esso non è accurato, a parità di passo di integrazione, quanto altri metodi di altrettanto semplice implementazione, come il metodo di Runge Kutta;
- può risultare spesso instabile quando la funzione f è sensibilmente variabile.

3.2 Convergenza numerica dei metodi

I metodi numerici che considereremo possono essere scritti nella forma generale

$$\sum_{j=0}^k \alpha_j \eta_{i+j} = h \varphi_f(\eta_{i+k}, \eta_{i+k-1}, \dots, \eta_i, t_i; h), \quad (3.3)$$

dove φ_f indica la dipendenza di φ dalla funzione $f(t, y)$ di 3.1. Si impone

$$\varphi_{f \equiv 0}(\eta_{i+k}, \eta_{i+k-1}, \dots, \eta_i, t_i; h) \equiv 0,$$

e la lipschitzianità di φ rispetto a η_{i+j} , $j = 0, 1, \dots, k$, segue dalla lipschitzianità di f .

Definizione 3.1. Il metodo 3.3 con opportuni valori iniziali si dice *convergente* se, per tutti i problemi a valori iniziali 3.1, si ha che

$$\eta_i - \eta(t_i) \rightarrow 0, \quad \text{per } h \downarrow 0,$$

dove $ih = t$ per ogni $t \in [a, b]$.

L'errore di troncamento locale di 3.3 è il residuo:

$$R_{i+k} := \sum_{j=0}^k \alpha_j \eta(t_{i+j}) - h \varphi_f(\eta(t_{i+k}), \eta(t_{i+k-1}), \dots, \eta(t_i), t_i; h)$$

Definizione 3.2. Il metodo 3.3 con opportuni valori iniziali si dice *consistente* se, per tutti i problemi ai valori iniziali 3.1, si ha che

$$\frac{1}{h}R_{i+k} \rightarrow 0, \text{ per } h \downarrow 0,$$

dove $ih = t$ per ogni $t \in [a, b]$.

Definizione 3.3. Il metodo 3.3 è *zero-stabile* se le radici del polinomio caratteristico

$$\sum_{f=0}^k \alpha_f r^{i+k}$$

si trovano all'interno o sul bordo del disco unitario e quelle sul bordo sono semplici.

Infine possiamo affermare il seguente teorema fondamentale:

Teorema 3.2.1. *Un metodo si dice convergente per $h \downarrow 0$ se e solo se è zero-stabile e consistente.*

Tutti i metodi che considereremo sono convergenti.

3.3 Assoluta stabilità dei metodi numerici

Poniamo ora l'attenzione sull'applicazione di un solutore numerico consistente e zero-stabile con dimensioni del passo piccole ma non troppo.

Per $i = 0, 1, 2, \dots$, posto che η_i denoti la soluzione numerica di 3.1 al tempo $t = t_i$, e $\eta^{[i]}(t_{i+1})$ sia la soluzione locale esatta del problema:

$$y' = f(t, y), \quad y(t_i) = y_i$$

Un metodo numerico si dice che abbia *errore locale*:

$$\varepsilon_{i+1} = \eta_{i+1} - \eta^{[i]}(t_{i+1}).$$

Se assumiamo che $y(t) \in C^{p+1}[t_0, t_f]$, abbiamo:

$$\varepsilon_{i+1} \approx C_{p+1} h_{i+1}^{p+1} \eta^{(p+1)}(t_i) + O(h_{i+1}^{p+2})$$

e diciamo che C_{p+1} è l'errore costante del metodo. Per metodi consistenti e zero-stabili l'errore globale è di ordine p ogni qualvolta l'errore locale è di ordine $p + 1$. Un metodo di ordine $p \geq 1$ è consistente in accordo con la definizione 3.2.

3.4 Metodi di Runge Kutta

Esistono metodi più accurati del metodo di Eulero, come ad esempio i metodi Runge Kutta che sono sicuramente più precisi pur mantenendo la forma ad un passo. Tali metodi fanno a meno della linearità.

Il metodo di Eulero corrisponde ad approssimare in ogni punto t_i la soluzione mediante la tangente, cioè mediante lo sviluppo in serie della funzione arrestato al termine di primo grado. Quando la funzione $f(t, y)$ è sufficientemente regolare, si possono ottenere metodi di ordine superiore al primo utilizzando uno sviluppo in serie di grado superiore. L'utilità pratica dei metodi di sviluppo in serie, che si ottengono, per ogni intero p fissato, troncando la serie ai primi p termini, ovvero:

$$\eta_{i+1} = \eta_i + h\phi(t_i, \eta_i; h, f) \quad i = 0, 1, 2, \dots$$

dove

$$\phi(t, \eta; h, f) = f(t, \eta) + \frac{h}{2}f'(t, \eta) + \dots + \frac{h^{p-1}}{p!}f^{p-1}(t, \eta)$$

è limitata dalla necessità di calcolare le derivate della funzione $f(t, y)$. I metodi di Runge Kutta evitano tale inconveniente approssimando le derivate mediante opportuni valori della funzione $f(t, y)$ nell'intervallo (t_i, t_{i+1}) . Così come i metodi ricavati dallo sviluppo in serie, i metodi di Runge Kutta sono chiamati metodi a un passo che, diversamente dai metodi a più passi, richiedono la conoscenza del solo valore iniziale η_0 . Introduciamo l'idea dei metodi Runge Kutta. Riprendendo le notazioni di prima, poniamo

$$\phi(t, y; h) = c_1f(t, y) + c_2f(t + ha_2, y + hb_{21}f(t, y))$$

ove c_1, c_2, a_2, b_{21} sono costanti da determinare in maniera che tra i seguenti sviluppi in serie

$$\phi(t, y; h) = (c_1 + c_2)f(t, y) + hc_2[a_2f_t(t, y) + b_{21}f_y(t, y)f(t, y)] + O(h^2)$$

$$\Delta(t, y; h) = f(t, y) + \frac{1}{2}h[f_t(t, y) + f_y(t, y)f(t, y)] + O(h^2)$$

si abbia la coincidenza del massimo numero di coefficienti di potenze di h . Si ottiene facilmente il sistema di equazioni

$$c_1 + c_2 = 1 \quad c_2a_2 = \frac{1}{2} \quad c_2b_{21} = \frac{1}{2}$$

per il quale, indicato con α un parametro $\neq 0$, si ha il seguente *insieme* di soluzioni

$$c_1 = 1 - \alpha \quad c_2 = \alpha \quad a_2 = b_{21} = \frac{1}{2\alpha}$$

e la corrispondente famiglia di metodi

$$\phi(t, y; h) = (1 - \alpha)f(t, y) + \alpha f\left(t + \frac{h}{2\alpha}, y + \frac{h}{2\alpha}f(t, y)\right)$$

Il procedimento sviluppato in precedenza può essere esteso in modo da utilizzare un qualsiasi numero m di valutazioni della funzione f . In questo modo si ottiene il seguente metodo generale di Runge Kutta esplicito a m - *stadi*:

$$\eta_{i+1} = \eta_i + h\phi(t_i, \eta_i; h)$$

$$\phi(t, \eta; h) := \sum_{r=1}^m c_r k_r, \quad k_1 = f(t, y)$$

$$k_r = f\left(t + ha_r, y + h \sum_{s=1}^{r-1} b_{rs}k_s\right), \quad r = 2, \dots, m$$

Un modo usuale di rappresentare tale metodo è sotto forma di *tableau*, noto anche come *Butcher array* e illustrato qui sotto

0					
a_2	b_{21}				
a_3	b_{31}	b_{32}			
⋮	⋮	⋮	⋮		
a_m	b_{m1}	b_{m2}	⋯	$b_{m,m-1}$	
	c_1	c_2	⋯	c_{m-1}	c_m

Tra i metodi più noti per approssimare la soluzione dei problemi a valori iniziali vi è quello del quarto ordine a 4 stadi, definito dalle seguenti formule:

$$\begin{aligned}\eta_{i+1} &= \eta_i + \frac{h}{6}(k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4) \\ k_1 &= f(t_i, \eta_i), \quad k_2 = f\left(t_i + \frac{h}{2}, \eta_i + \frac{hk_1}{2}\right) \\ k_3 &= f\left(t_i + \frac{h}{2}, \eta_i + \frac{hk_2}{2}\right), \quad k_4 = f(t_i + h, \eta_i + hk_3)\end{aligned}$$

3.4.1 Metodi di Runge Kutta impliciti

I metodi considerati nel paragrafo precedente sono di tipo esplicito, in quanto il calcolo di η_{i+1} richiede la valutazione della funzione ϕ , che dipende solo dai valori già calcolati della soluzione approssimata. Per risolvere problemi particolari, hanno interesse metodi, analoghi nella sostanza ai precedenti, ma nei quali la funzione ϕ dipende anche dal valore η_{i+1} . Essi sono detti metodi impliciti, in quanto richiedono per il calcolo di η_{i+1} la risoluzione di equazioni, che sono non lineari quando la funzione $f(t, y)$ è non lineare in y . Un metodo Runge Kutta a m - stadi implicito è definito, in maniera generale, nel seguente modo,

$$\begin{aligned}\eta_{i+1} &= \eta_i + h\phi(t_i, \eta_i; h) \\ \phi(t, \eta; h) &:= \sum_{r=1}^m c_r k_r \\ k_r &= f\left(t + ha_r, y + h \sum_{s=1}^m b_{rs} k_s\right), \quad r = 1, \dots, m\end{aligned}$$

a cui corrisponde il tableau seguente:

a_1	b_{11}	b_{12}	$b_{1,m-1}$	b_{1m}	
a_2	b_{21}	b_{22}	$b_{2,m-1}$	b_{2m}	
\vdots	\vdots	\vdots	\vdots		
a_m	b_{m1}	b_{m2}	\dots	$b_{m,m-1}$	b_{mm}
	c_1	c_2	\dots	c_{m-1}	c_m

r	a_r	b_{rs}				
		s = 1	s = 2	s = 3	s = 4	s = 5
2	1/4	1/4				
3	3/8	3/32	9/32			
4	12/13	1932/2197	-7200/2197	7296/2197		
5	1	439/216	-8	3680/513	-845/4104	
6	1/2	-8/27	2	-3544/2565	1859/4104	-11/40

Figura 3.1. Coefficienti a_r e b_{rs} per il metodo di *RKF45*

3.4.2 Metodi di Runge Kutta Fehlberg

Nell'applicazione pratica dei metodi numerici è importante dare una stima dell'errore locale per permettere una scelta adattiva del passo. Tale stima, quando si applicano i metodi di Runge Kutta, può essere ottenuta utilizzando differenti procedimenti, che hanno in comune l'idea di calcolare la soluzione in t_{i+1} con una differente precisione. Un procedimento classico consiste nel calcolare la soluzione in t_{i+1} , a partire da t_i , una volta con passo $h = t_{i+1} - t_i$ e successivamente con passo $h/2$. Dal confronto dei due valori e sfruttando opportunamente la conoscenza dell'ordine del metodo, è possibile ricavare una stima dell'errore locale. Un modo alternativo per ottenere due valori della soluzione discreta con precisione differente consiste nell'applicazione di due metodi di ordine differente, ad esempio un metodo di terzo e quarto ordine, oppure di quarto e quinto ordine. A tale scopo i metodi di Runge Kutta, nella forma tradizionale che abbiamo visto in precedenza, non sono convenienti, in quanto richiedono un numero eccessivo di valutazioni della funzione f . Ad esempio, un metodo del quarto ordine accoppiato ad un metodo del quinto ordine richiederebbe dieci valutazioni della f . Risultano, invece, di particolare utilità i cosiddetti metodi di Runge Kutta Fehlberg, che ora illustreremo brevemente. Per semplicità di presentazione considereremo una particolare coppia di formule, ad esempio le formule di Runge Kutta Fehlberg (RKF) di ordine 4 e 5. Con le usuali notazioni poniamo

$$k_1 = f(t_i, \eta_i), \quad k_r = f(t_i + ha_r, y + h \sum_{s=1}^{r-1} b_{rs} k_s), \quad r = 2, \dots, 6$$

r	1	2	3	4	5	6
c_r	25/216	0	1408/2565	2197/4104	-1/5	
\hat{c}_r	16/135	0	6656/12825	28561/56430	-9/50	2/55

Figura 3.2. Coefficienti c_r e \hat{c}_r per il metodo di *RKF45*

Le formule RKF del quarto e quinto ordine sono, rispettivamente

$$\eta_{i+1} = \eta_i + h \sum_{r=1}^5 c_r k_r$$

$$\eta_{i+1}^{\hat{}} = \eta_i + h \sum_{r=1}^6 \hat{c}_r k_r$$

L'applicazione delle due formule richiede ad ogni passo 6 valutazioni della funzione f . I valori dei parametri delle formule sono riportati nelle Tabelle [3.1](#) e [3.2](#).

3.5 Formule di differenziazione all'indietro

Una formula di differenziazione all'indietro (*BDF*) di k -passi in forma standard è definita nel modo seguente:

$$\sum_{j=0}^k \alpha_j \eta_{i+j-k+1} = h \beta_k f(t_{i+1}, \eta_{i+1}) \quad (3.4)$$

dove nel caso di $\alpha_k = 1$ i metodi *BDF* si dicono impliciti. La tabella in figura [3.3](#) elenca i metodi *BDF* con numero di passi da 1 a 6 rispettivamente. k denota il numero di passi, p l'ordine del metodo, C_{p+1} è l'errore costante, ed α è metà dell'angolo sottostante la regione di assoluta stabilità R .

3.5.1 Formule di differenziazione numerica (NDF)

Le formule di differenziazione numerica (*NDF*) sono una modifica dei metodi *BDF*. Lasciando che

$$\nabla \eta_i = \eta_i - \eta_{i-1}$$

k	α_6	α_5	α_4	α_3	α_2	α_1	α_0	β_k	p	C_{p+1}	α
1						1	-1	1	1	1	90°
2					1	$-\frac{4}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{2}{3}$	2	$-\frac{2}{9}$	90°
3				1	$-\frac{18}{11}$	$\frac{9}{11}$	$-\frac{2}{11}$	$\frac{6}{11}$	3	$-\frac{3}{22}$	86°
4			1	$-\frac{48}{25}$	$\frac{36}{25}$	$-\frac{16}{25}$	$\frac{3}{25}$	$\frac{12}{25}$	4	$-\frac{12}{125}$	73°
5		1	$-\frac{300}{137}$	$\frac{300}{137}$	$-\frac{200}{137}$	$\frac{75}{137}$	$-\frac{12}{137}$	$\frac{60}{137}$	5	$-\frac{110}{137}$	51°
6	1	$-\frac{360}{147}$	$\frac{450}{147}$	$-\frac{400}{147}$	$\frac{225}{147}$	$-\frac{72}{147}$	$\frac{10}{147}$	$\frac{60}{147}$	6	$-\frac{20}{343}$	18°

Figura 3.3. Coefficienti dei metodi *BDF*

denoti la differenza all'indietro di η_i , si riscrive il metodo *BDF* di k -passi, di ordine $p = k$ nella forma:

$$\sum_{m=1}^k \frac{1}{m} \nabla^m \eta_{i+1} = hf(t_{i+1}, \eta_{i+1}) \quad (3.5)$$

L'equazione algebrica per η_{i+1} è risolta con il metodo iterativo di Newton semplificato. L'iterazione inizia con il valore di previsione

$$\eta_{i+1}^{(0)} = \sum_{m=1}^k \frac{1}{m} \nabla^m \eta_i$$

Il metodo *NDF* di k -passi e ordine $p = k$ è

$$\sum_{m=1}^k \frac{1}{m} \nabla^m \eta_{i+1} = f(t_{i+1}, \eta_{i+1}) + k\gamma_k (\eta_{i+1} - \eta_{i+1}^{(0)}) \quad (3.6)$$

dove k è un parametro scalare e $\gamma_k = \sum_{j=1}^k 1/j$.

In figura 3.4 troviamo la lista dei metodi *NDF* di ordine da 1 a 5. Per ogni $k \geq 1$ la formula fornisce un metodo implicito a k passi e di ordine k . Per motivi di stabilità, solo i metodi per $k \leq 6$ sono convergenti: già nel caso $k = 6$ l'angolo α diventa troppo piccolo.

3.6 Il concetto di Stiffness

La *stiffness* è un concetto sottile, difficile e importante nella soluzione numerica delle equazioni differenziali. Esso dipende dall'equazione differen-

k	κ	α_5	α_4	α_3	α_2	α_1	α_0	β_k	p	C_{p+1}	α
1	$-\frac{37}{200}$					1	-1	1	1	1	90°
2	$-\frac{1}{9}$				1	$-\frac{4}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{2}{3}$	2	$-\frac{2}{9}$	90°
3	-0.0823			1	$-\frac{18}{11}$	$\frac{9}{11}$	$-\frac{2}{11}$	$\frac{6}{11}$	3	$-\frac{3}{22}$	80°
4	-0.0415		1	$-\frac{48}{25}$	$\frac{36}{25}$	$-\frac{16}{25}$	$\frac{3}{25}$	$\frac{12}{25}$	4	$-\frac{12}{125}$	66°
5	0	1	$-\frac{300}{137}$	$\frac{300}{137}$	$-\frac{200}{137}$	$\frac{75}{137}$	$-\frac{12}{137}$	$\frac{60}{137}$	5	$-\frac{110}{137}$	51°

Figura 3.4. Coefficienti dei metodi *NDF*

ziale, dalle condizioni iniziali, e dal metodo numerico. In maniera schematica un'equazione differenziale si dice *stiff* se la soluzione cercata varia lentamente, ma vi sono soluzioni 'vicine' che variano rapidamente, in maniera che il metodo numerico, se non scelto opportunamente, deve usare passi 'piccoli' per ottenere risultati soddisfacenti.

La terminologia *stiff* è stata introdotta da Curtis e Hirschfelder nell'ambito dello studio di un sistema meccanico costituito da due molle, una delle quali molto più rigida (ovvero *stiff*) rispetto all'altra. Il termine *stiff* è passato poi ad indicare, più in generale, un sistema di equazioni differenziali che descrive un sistema fisico caratterizzato da costanti di tempo molto differenti tra di loro. Ricordiamo che la costante di tempo è il termine comunemente usato per indicare la velocità di decadimento. Con riferimento all'equazione scalare $y' = \lambda y$, con soluzione $ce^{\lambda t}$, se λ è un numero reale e negativo, allora la y decade di un fattore e^{-1} nel tempo $-1/\lambda$. In questo caso la costante di tempo è data dal valore $-1/\lambda$; più λ è grande e più è piccola la costante di tempo. Più in generale, per un sistema di equazioni differenziali lineari $y' = Ay$ le costanti di tempo sono date dal reciproco delle parti reali degli autovalori di A . Sistemi differenziali di tipo *stiff* hanno origine in numerosi e importanti settori applicativi, tra cui le applicazioni relative all'analisi di circuiti elettronici, alla cinetica chimica e biochimica, al calcolo dei reattori nucleari e in, generale, ai problemi di controllo.

Le difficoltà relative alla soluzione di sistemi *stiff* sono di natura prettamente numerica. In maniera schematica, si ha, infatti che tali sistemi sono dal punto di vista analitico stabili, nel senso che la loro soluzione tende asintoticamente (per $t \rightarrow \infty$) a una situazione stazionaria. Tuttavia i metodi numerici classici, come i metodi di Runge Kutta (espliciti) che abbiamo analizzato nei paragrafi precedenti, non sono sufficientemente stabili, nel senso del passo fissato, per integrare convenientemente tali sistemi. In altre parole, utilizzando tali metodi per un sistema *stiff*, si può essere costretti ad utilizzare un passo di integrazione eccessivamente piccolo (con conseguente alto costo di risoluzione) in relazione alla regolarità della soluzione continua. In definitiva, il problema per quanto riguarda la risoluzione numerica dei sistemi *stiff* è la ricerca di metodi numerici per i quali l'ampiezza del passo di integrazione dipenda soltanto dalla precisione richiesta.

3.7 Il pacchetto ODE di Matlab

Il pacchetto ODE di Matlab contiene due metodi espliciti per la risoluzione di problemi *nonstiff*:

- la coppia di metodi di Runge Kutta espliciti di ordini 3 e 2, *ode23*;
- la coppia di metodi di Runge Kutta espliciti di ordini 5 e 4, *ode45*;

e due metodi impliciti per sistemi *stiff*:

- la coppia di metodi Runge Kutta impliciti di ordini 2 e 3, *ode23s*;
- le formule di differenziazione numerica implicita di ordine variabile da 1 a 5, *ode15s*.

Tutti questi metodi hanno una stima di errore locale incorporata per controllare la dimensione del passo. Inoltre, *ode15s* è un metodo di ordine variabile che utilizza metodi di ordine superiore e dimensioni di passaggio più piccole

quando la soluzione varia rapidamente. Il comando *'odeset'* consente di creare o modificare la struttura delle *ode functions*. I metodi per la risoluzione di problemi *stiff* possono essere usati senza problemi per la risoluzione di problemi *nonstiff*, mentre i metodi per problemi *nonstiff* non sono efficienti per risolvere problemi *stiff*. Per scopi grafici, tutti quanti i metodi utilizzano interpolanti per ottenere, di default, quattro o, se specificati dall'utente, più valori intermedi di η tra η_i ed η_{i+1} per disegnare la soluzione.

3.7.1 ode23

Il codice di *ode23* consiste di una coppia di metodi di Runge Kutta espliciti, a quattro stati, di ordini 2 e 3. Si avanza da η_i a η_{i+1} con il metodo del terzo ordine e il controllo dell'errore locale si basa sulla differenza tra la soluzione numerica del terzo ordine e quella del secondo ordine. I quattro stati sono:

$$\begin{aligned} k_1 &= hf(t_i, \eta_i), \\ k_2 &= hf\left(t_i + \left(\frac{1}{2}\right)h, \eta_i + \left(\frac{1}{2}\right)k_1\right), \\ k_3 &= hf\left(t_i + \left(\frac{3}{4}\right)h, \eta_i + \left(\frac{3}{4}\right)k_2\right), \\ k_4 &= hf\left(t_i + h, \eta_i + \left(\frac{2}{9}\right)k_1 + \left(\frac{1}{3}\right)k_2 + \left(\frac{4}{9}\right)k_3\right). \end{aligned}$$

I primi tre stati producono la soluzione al passo di tempo successivo:

$$\eta_{i+1} = \eta_i + \frac{2}{9}k_1 + \frac{1}{3}k_2 + \frac{4}{9}k_3$$

e tutti i quattro stati danno una stima dell'errore locale pari a:

$$E = -\frac{5}{72}k_1 + \frac{1}{12}k_2 + \frac{1}{9}k_3 - \frac{1}{8}k_4$$

	c	A						
k_1	0	0						
k_2	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{5}$	0					
k_3	$\frac{3}{10}$	$\frac{3}{40}$	$\frac{9}{40}$	0				
k_4	$\frac{4}{5}$	$\frac{44}{45}$	$-\frac{56}{15}$	$\frac{32}{9}$	0			
k_5	$\frac{3}{9}$	$\frac{19372}{6561}$	$-\frac{25360}{2187}$	$\frac{64448}{6561}$	$-\frac{212}{729}$	0		
k_6	1	$\frac{9017}{3168}$	$-\frac{355}{33}$	$\frac{46732}{5247}$	$\frac{49}{176}$	$-\frac{5103}{18656}$	0	
k_7	1	$\frac{35}{384}$	0	$\frac{500}{1113}$	$\frac{125}{192}$	$\frac{2187}{6784}$	$\frac{11}{84}$	
\hat{y}_{n+1}	\hat{b}^T	$\frac{5179}{57600}$	0	$\frac{7571}{16698}$	$\frac{383}{640}$	$-\frac{92097}{339200}$	$\frac{187}{2100}$	$\frac{1}{40}$
y_{n+1}	b^T	$\frac{35}{384}$	0	$\frac{500}{1113}$	$\frac{125}{192}$	$-\frac{2187}{6784}$	$\frac{11}{84}$	0
$y_{n+0.5}$		$\frac{5783653}{57600000}$	0	$\frac{465123}{112250}$	$-\frac{41347}{1920000}$	$\frac{16122321}{339200000}$	$-\frac{7117}{2000}$	$\frac{183}{10000}$

Figura 3.5. Tableau della coppia Dormand Prince $DP5(4)7M$ con interpolante

3.7.2 ode45

Il codice di *ode45* è quello della coppia di metodi Runge Kutta di Dormand Prince $DP5(4)7M$ con interpolante 'libero' di alto livello, di ordine 4, tramandato da Dormand e Prince a Shampine e Reichelt.

ode45 può utilizzare una dimensione del passo lunga; l'impostazione predefinita è quella che prevede l'uso dell'interpolante per calcolare i valori delle soluzioni in quattro punti ugualmente distanziati secondo il passo naturale. Lo schema di *ode45* è riportato nella figura 3.5.

Il numero 5 denota il fatto che la soluzione y_i è avanzata ad y_{i+1} con un metodo di ordine 5; il numero (4) in parentesi indica che la soluzione \hat{y}_{i+1} viene usata per ottenere la stima dell'errore locale; M indica il fatto che il termine di errore assoluto è stato minimizzato. Il numero 7 denota il fatto che il metodo ha 7 stati. Per un metodo di ordine 5 sono necessari sei stati. Il settimo stato è necessario per l'interpolante. Ad ogni modo, si tratta di un metodo a sei stati in cui il primo passo a t_{i+1} è lo stesso dell'ultimo passo a t_i , $k_1^{[i+1]} = k_7^{[i]}$. Nella figura tratta da [12] troviamo n al posto di i .

3.7.3 ode23s

Il codice di *ode23s* è una terna di metodi impliciti di Rosenbrock di ordine 3 e 2 con controllo dell'errore per sistemi stiff. Si avanza da η_i a η_{i+1} con un metodo del secondo ordine e l'errore locale viene controllato dalla differenza tra la soluzione numerica del terzo e quarto ordine. L'algoritmo è il seguente:

$$f_0 = hf(t_i, \eta_i)$$

$$k_1 = W^{-1}(f_0 + hdT)$$

$$f_1 = f(t_i + 0.5h), \eta_i + 0.5hk_1$$

$$k_2 = W^{-1}(f_1 - k_1) + k_1$$

$$\eta_{i+1} = \eta_i + hk_2$$

$$f_2 = f(t_{i+1}, \eta_{i+1})$$

$$k_3 = W^{-1}[f_2 - c_{32}(k_2 - f_1) - 2(k_1 - f_0) + hdt]$$

$$error \approx \frac{h}{6}(k_1 - 2k_2 + k_3)$$

dove $W = I - hdJ, \quad d = \frac{1}{2 + \sqrt{2}}, \quad c_{32} = 6 + \sqrt{2},$

e $J \approx \frac{\partial f}{\partial y}(t_i, \eta_i), \quad T \approx \frac{\partial f}{\partial t}(t_i, \eta_i).$

L'interpolante usata in *ode23s* è la polinomiale quadratica in s

$$\eta_{i+s} = \eta_i + h \left[\frac{s(1-s)}{1-2d} k_1 + \frac{s(s-2d)}{1-2d} k_2 \right]$$

3.7.4 ode15s

Il codice di *ode15s* per sistemi *stiff* è l'implementazione dei metodi *NDF* con dimensione del passo quasi-costante, di ordine variabile da 1 a 5 in termini di differenze all'indietro.

Modifica della dimensione del passo

Ciascuna delle rappresentazioni delle formule che caratterizzano i metodi BDF ha i suoi vantaggi e svantaggi. Le differenze all'indietro risultano parecchio convenienti per l'implementazione di entrambi i metodi BDF e NDF. Di base gli algoritmi sono semplici e possono essere codificati in modo compatto, ma hanno lo svantaggio legato alla scelta della dimensione del passo. Ci sono diversi modi di dimezzare e raddoppiare tale dimensione, ma riporteremo solo il caso generale. Supponiamo che sia stata utilizzata una dimensione del passo costante h , e che l'integrazione abbia raggiunto t_i . Abbiamo a disposizione i valori $\eta(t_{i-j})$ a $t_{i-j} = t_i - jh$, per $j = 0, 1, \dots, k$.

Il polinomio di interpolazione $P(t)$ è

$$P(t) = \eta(t_i) + \sum_{j=1}^k \nabla^j \eta(t_i) \frac{1}{j! h^j} \prod_{m=0}^{j-1} (t - t_{i-m})$$

Per definizione $\nabla^j P(t_i) = \nabla^j \eta(t_i)$. In questa rappresentazione la soluzione è mantenuta nella forma del valore corrente $\eta(t_i)$ e le differenze all'indietro sono

$$D = [\nabla P(t_i), \nabla^2 P(t_i), \dots, \nabla^k P(t_i)]$$

Cambiare dimensione al nuovo passo $h^* \neq h$ vuol dire valutare $P(t)$ a $t^* = t_i - jh^*$ per $j = 0, 1, \dots, k$ e poi determinare

$$D^* = [\nabla^* P(t_i), \nabla^{*2} P(t_i), \dots, \nabla^{*k} P(t_i)]$$

L'asterisco per le differenze all'indietro indica che ci si sta riferendo al passo h^* .

Mettendo insieme le rappresentazioni di $P(t)$ con le dimensioni del passo h ed h^* si ottiene l'identità:

$$\sum_{j=1}^k \nabla^{*j} P(t_i) \frac{1}{j! h^{*j}} \prod_{m=0}^{j-1} (t - t_{i-m}^*) = \sum_{j=1}^k \nabla^j P(t_i) \frac{1}{j! h^j} \prod_{m=0}^{j-1} (t - t_{i-m})$$

Valutando questa identità a $t = t_{i-r}^*$ per $r = 1, \dots, k$ si ottiene il sistema di equazioni

$$\sum_{j=1}^k \nabla^{*j} P(t_i) U_{jr} = \sum_{j=1}^k \nabla^j P(t_i) R_{jr}$$

In termini di matrici questo è

$$D^*U = DR$$

e si cerca una espressione di D^* in termini di D .

Gli elementi della matrice U di dimensione $k \times k$ sono

$$U_{jr} = \frac{1}{j!h^{*j}} \prod_{m=0}^{j-1} (t^* - t_{i-m}^*) = \frac{1}{j!} \prod_{m=0}^{j-1} (m - r)$$

È evidente che $U_{jr} = 0$ per $r < j$ così che U risulta una matrice triangolare superiore. Per $r > j$

$$U_{jr} = (-1)^j \binom{r}{j}$$

Inoltre $U^2 = I$.

Invece, la matrice R di dimensione $k \times k$ è piena. In termini di $\rho = h^*/h \neq 1$, i suoi elementi sono

$$R_{jr} = \frac{1}{j!} \prod_{m=0}^{j-1} (m - r\rho)$$

Poichè queste matrici dipendono dalla nuova dimensione del passo, devono essere ricostruite ogni volta che la dimensione del passo cambia. Questo può essere fatto in maniera efficace per colonne secondo lo schema

$$R_{1,r} = -r\rho$$

$$R_{j+1,r} = R_{j,r} \left(\frac{j - r\rho}{j + 1} \right)$$

Si arriva in questo modo ad una fattorizzazione che mostra come le differenti tabelle dipendano dalla dimensione del passo

$$D^* = D(RU)$$

Gli elementi di U non dipendono dal passo h e neppure da k per cui possono essere determinate nel codice per un massimo valore k e valere sempre, mentre la matrice R dipende da h ed h^* , per cui deve essere calcolata ogni volta che la dimensione del passo cambia. Si tratta di un calcolo semplice e poco costoso, per cui questa procedura del cambio della dimensione del passo risulta compatta ed efficace in Matlab.

Il Programma ode15s

Il codice ode15s riprende il codice dei metodi NDF e risulta avere una dimensione del passo quasi costante in termini di differenze all'indietro. L'interfaccia utente è comune a tutti i codici del pacchetto ODE, ma presenta alcune opzioni che si applicano a problemi stiff. L'utente può scegliere di utilizzare il programma con il BDF classico piuttosto che con le opzioni predefinite dei metodi NDF. Può inoltre ridurre il valore massimo dell'ordine predefinito 5 se questo risultasse necessario per ragioni di stabilità. Per implementare la formula dei metodi NDF, riscriviamo la forma di Klopfenstein. L'identità

$$\sum_{m=1}^k \frac{1}{m} \nabla^m \eta_{i+1} = \gamma_k \left(\eta - i + 1 - \eta_{i+1}^{(0)} \right) + \sum_{m=1}^k \gamma_m \nabla^m \eta_i$$

mostra che l'equazione 3.6 è equivalente a

$$(1 - k)\gamma_k \left(\eta_{i+1} - \eta_{i+1}^{(0)} \right) + \sum_{m=1}^k \gamma_m \nabla^m \eta_i - hf(t_{i+1}, \eta_{i+1}) = 0$$

Si tratta di una generalizzazione della forma dei metodi BDF ad opera di F.T. Krogh.

Quando la formula implicita viene valutata da una semplificazione del metodo (della corda) di Newton, l'iterato corrente

$$\eta_{i+1}^{(n+1)} = \eta_{i+1}^{(n)} + \Delta^{(n)}$$

si ottiene risolvendo

$$\left(I - \frac{h}{(1-k)\gamma_k} J \right) \Delta^{(n)} = \frac{h}{(1-k)\gamma_k} f(t_{i+1}, \eta_{i+1}^{(n)}) - \Psi - \left(\eta_{i+1}^{(n)} - \eta_{i+1}^{(0)} \right)$$

Qui J è l'approssimazione dello Jacobiano di $f(t, \eta)$ e

$$\Psi = \frac{1}{(1-k)\gamma_k} \sum_{m=1}^k \gamma_m \nabla^m \eta_i$$

è una quantità che viene fissata durante il calcolo di η_{i+1} . Questo viene fatto definendo

$$d^{(n)} = \eta_{i+1}^{(n)} - \eta_{i+1}^{(0)}$$

e calcolando

$$d^{(n+1)} = d^{(n)} + \Delta^{(n)}$$
$$\eta_{i+1}^{(n+1)} = \eta_{i+1}^{(0)} + d^{(n+1)}$$

Procedendo in questo modo la quantità fondamentale $\nabla^{k+1}\eta_{i+1}$ si ottiene più accuratamente come il limite di $d^{(n)}$.

Si inizializza $\nabla\eta_0 = hf(t_0, \eta_0)$. La scelta della dimensione del passo iniziale si basa sull'idea che dalla determinazione delle derivate parziali $f(t, \eta)$ al tempo t_0 è possibile stimare una dimensione del passo iniziale ottimale partendo dall'ordine 1. Si calcola la matrice di iterazione per il metodo semplificato di Newton ogni volta che viene modificata la dimensione o l'ordine del passo. L'approccio fondamentale è quello di formare un nuovo Jacobiano solo quando l'iterazione semplificata di Newton sta convergendo troppo lentamente, per cui lo Jacobiano non viene approssimato mai più di una volta in uno stesso punto. Il processo viene terminato se si prevede che la convergenza non sarà raggiunta in quattro iterazioni e in questo caso si forma un nuovo Jacobiano. Se lo Jacobiano è corrente la dimensione del passo viene ridotta di un fattore di 0,3 e il passo viene riprovato. È interessante ricordare che ode15s forma pochissimi Jacobiani quando viene applicato ad un problema che non è stiff; di conseguenza fa abbastanza bene il suo lavoro in quanto l'algebra lineare aggiuntiva viene eseguita in Matlab efficacemente.

Capitolo 4

Risoluzione numerica dei modelli

Vedremo adesso quali sono stati i metodi numerici usati per la risoluzione dei nostri sistemi di equazioni differenziali, al fine di mostrare le differenti forme di oscillazione che caratterizzano i principali modelli di dinamica del calcio, che sono stati da noi presi in esame.

Per fare ciò è stata necessaria un'analisi numerica di metodi differenti al fine di ottenere la *soluzione migliore*, caso per caso. Si è deciso di confrontare le soluzioni $c(t)$, che descrivono la concentrazione citoplasmatica di calcio nella cellula, al variare del tempo t , nei modelli di Classe I, di Classe II ed Ibridi, tenendo conto dell'impulso istantaneo della concentrazione p di IP3 e poi, anche senza tenere conto di tale impulso. Abbiamo fatto ricorso alle funzioni di libreria che Matlab mette a disposizione per la risoluzione di equazioni differenziali, presentate nel capitolo precedente:

- **ode15s** per problemi *stiff*, con ordine di accuratezza variabile (basso-medio);
- **ode23s** per problemi *stiff*, con ordine di accuratezza basso;
- **ode23** per problemi *non-stiff*, con ordine di accuratezza basso;
- **ode45** per problemi *non-stiff*, con ordine di accuratezza medio;

Nella risoluzione dei problemi relativi ai modelli, nel tentativo di riprodurre le oscillazioni caratteristiche di ciascuno, è stato indispensabile fare delle scelte appropriate dei dati iniziali, conformi alla realtà, ovvero in accordo con il modello biologico. A tal proposito, nel primo capitolo della tesi è stata descritta la fisiologia del modello, ed è stato puntualizzato il fatto che lo ione calcio risulta essere un ottimo messaggero intracellulare per via dell'enorme differenza di concentrazione di Ca^{2+} libero tra il liquido extracellulare ed il citosol, e tra i depositi cellulari ed il citosol. In particolar modo, la concentrazione di calcio citosolico (c) è di circa $0.1\mu M$, mentre quella nel reticolo endoplasmatico (c_e) ha valori che vanno tra $0.1 - 1mM = 10 - 100\mu M$. Grazie a questa differenza di concentrazioni si attivano dei meccanismi che riguardano l'apertura del recettore IPR, il cui funzionamento è regolato dalla concentrazione p di IP3.

L'analisi di un modello studiato nella tesi triennale [10], denominato *modello complesso*, ci aveva permesso di mostrare come le oscillazioni della concentrazione citoplasmatica di calcio (c) sono accompagnate da oscillazioni della concentrazione di IP3 (p), e viceversa. Si tratta di un modello in cui oscillazioni di c si hanno però solo per un determinato range di valori attribuiti a p . Abbiamo potuto provare che, in questi nuovi modelli, qualunque sia il valore iniziale attribuito a p , si hanno oscillazioni della concentrazione c . Nella nostra analisi dei metodi abbiamo attribuito a p valori che vanno da 0.1 a 20; si tratta di un valore che incide in particolare sull'ampiezza delle oscillazioni; una sua variazione non stravolge la forma caratteristica di tali oscillazioni per ciascun modello.

Per quanto riguarda la scelta di n iniziale, che descrive una probabilità, quella di inattivazione del recettore, abbiamo in genere attribuito a questo il valore $n_0 = 0.6$, ad eccezione del modello di Classe II in cui n è costante nel tempo. Infine, per i valori iniziali attribuiti a c e c_e abbiamo scelto valori che tengano conto del differente ordine di grandezza delle due concentrazioni, e abbiamo preso in genere $c = 0.2$ e $c_e \in [7, 20]$. Nella fase in cui abbiamo testato i metodi abbiamo anche attribuito a c_e valori più piccoli per avere

chiaro a cosa andrebbe incontro il modello nel caso di una perturbazione del dato di questo tipo.

4.1 Analisi dei metodi per la risoluzione del modello Ibrido

Una prima analisi ha riguardato il modello Ibrido con impulso di p all'istante $T_p = 60$. Ricordiamo che le equazioni del modello sono le seguenti:

$$\frac{dc}{dt} = J_{release} - J_{serca} + \delta(J_{in} - J_{pm})$$

$$\frac{dc_e}{dt} = \gamma(J_{serca} - J_{release})$$

$$\frac{dn}{dt} = \frac{1}{\tau} \left(\frac{k_2^2}{k_2^2 + c^2} - n \right)$$

$$\frac{dp}{dt} = \nu \left(\frac{c + (1-\alpha)k_4}{c + k_4} \right) - \beta p + MH(t - T_p)H(T_p + 1 - t)$$

e in questo caso $\alpha = 1$, $\tau = 2$. Abbiamo, inoltre, fissato $\nu = 1$, valore significativo per avere oscillazioni della concentrazione citoplasmatica c nel tempo t .

Abbiamo testato i vari metodi nella risoluzione di problemi relativi al modello Ibrido, al variare del dato iniziale, ed abbiamo riscontrato che il comportamento della soluzione ottenuta con ciascuno di essi, mantenendo le tolleranze di *default*, rimane sempre la stessa: le soluzioni risultano coincidenti.

La figura 4.1 mette a confronto tali soluzioni, una volta fissati i parametri fondamentali del modello raccolti nella tabella 2.1, e prendendo come dato iniziale $[c_0 = 0.2, c_{e_0} = 10, n_0 = 0.6, p_0 = 7]$.

In figura 4.3, in cui sono mostrate le soluzioni $c(t)$ sovrapposte, è evidente che la risposta fornita da tutti quanti i metodi è la stessa. Pertanto abbiamo

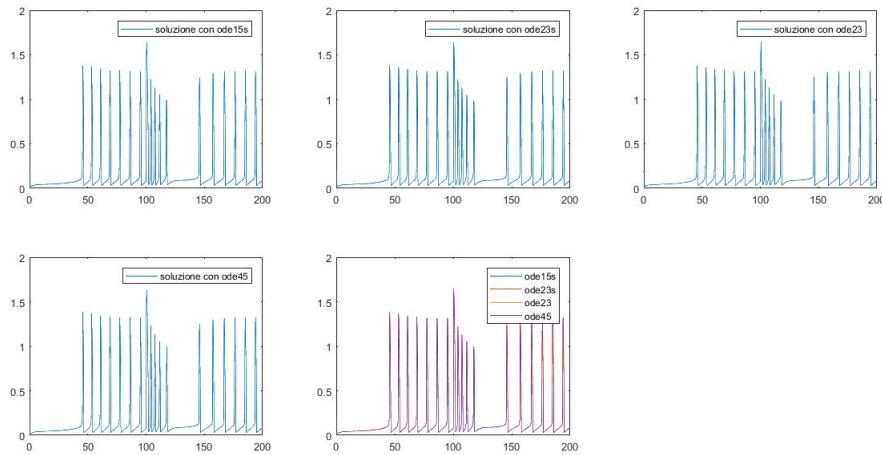


Figura 4.1. Grafici delle soluzioni $c(t)$ di un problema ai valori iniziali in cui $c_0 = 0.2$; $c_{e0} = 10$; $n_0 = 0.6$; $p_0 = 7$, relativo al modello Ibrido con $\nu = 1$, ottenute usando differenti metodi implementati in Matlab per la risoluzione di equazioni differenziali.

ritenuto interessante, in una situazione del genere, stabilire il costo computazionale di tali metodi. Tenuto conto del fatto che modelli del genere in una prospettiva di stima dei parametri andrebbero risolti migliaia di volte, è evidente che il metodo prescelto debba essere quello che ha un costo computazionale minore. Abbiamo pertanto deciso di determinare il costo relativo al numero di valutazioni di funzione *'nfevals'* di ciascun metodo, ricorrendo all'istruzione della forma `SOL=odesolver(ODEFUN, [T0 TFINAL], Y0, ...)` e richiamando di volta in volta la variabile `"SOL.stats.nfevals"`.

È stato testato il comportamento dei quattro metodi per differenti valori iniziali; in tutti i casi test, *ode15s* con le tolleranze di *default* è risultato essere il metodo con il costo computazionale più basso e quindi preferibile agli altri per la risoluzione di un problema di questo tipo. Sono stati registrati nelle tabelle 4.1, 4.2, 4.3 i valori relativi al costo computazionale di ciascun metodo in termini di valutazioni di funzioni.

Aumentando e diminuendo, rispetto al primo caso test, i valori di n o i valori

	[0.2, 10, 0.6 , 7]	[0.2, 10, 0.1 , 7]	[0.2, 10, 0.9 , 7]
ode15s	<i>4821</i>	<i>4848</i>	<i>4963</i>
ode23s	12234	12398	12071
ode23	11224	11296	10969
ode45	16081	16411	15913

Tabella 4.1. Numero di valutazioni di funzioni per problemi ai valori iniziali, relativi al modello di Classe I, al variare di n_0 .

	[0.2, 10, 0.6, 1]	[0.2, 10, 0.6, 15]
ode15s	<i>4836</i>	<i>4845</i>
ode23s	12288	12182
ode23	12628	10114
ode45	18529	14287

Tabella 4.2. Numero di valutazioni di funzioni per problemi ai valori iniziali, relativi al modello di Classe I, al variare di p_0 .

di p iniziali, la situazione rimane pressochè la stessa; mentre si può osservare che, nei casi in cui è molto piccola la differenza tra c e c_e iniziali, il problema diventa molto *stiff* ed *ode23* ed *ode45*, in termini di valutazioni di funzioni diventano molto più costose.

	[0.2, 20 , 0.6, 7]	[0.2, 0.8 , 0.6, 7]
ode15s	<i>6450</i>	<i>3381</i>
ode23s	15818	8619
ode23	10309	22960
ode45	13645	36157

Tabella 4.3. Numero di valutazioni di funzioni per problemi ai valori iniziali, relativi al modello di Classe I, al variare di c_{e0} .

4.2 Analisi dei metodi per la risoluzione del modello di Classe I

Lo stesso lavoro è stato realizzato prendendo in considerazione il modello di Classe I con impulso istantaneo di p all'istante $T_p = 100$. Si osservi che la scelta di T_p è casuale.

Il modello è il medesimo; cambiano i valori dei parametri $\alpha = 0$, $\tau = 2$. A questo punto abbiamo fissato $\nu = 0.56$ e abbiamo cercato di studiare nei dettagli il problema, prendendo come valori iniziali $c_0 = 0.2$, $c_{e_0} = 10$, $n_0 = 0.6$, $p_0 = 7$.

Come per il modello Ibrido è stato risolto il sistema con i diversi metodi. La figura 4.2 mette a confronto le soluzioni ottenute con ciascuno di questi, mentre in figura 4.3 si possono apprezzare meglio le differenze tra le diverse soluzioni sovrapposte.

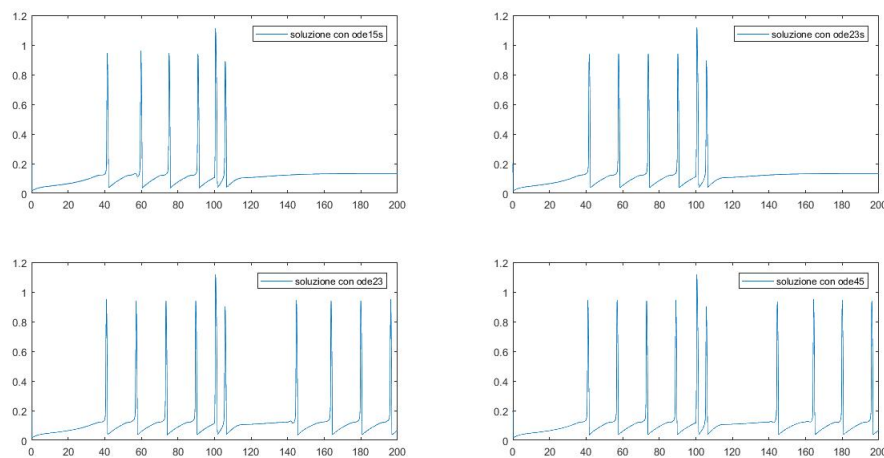


Figura 4.2. Grafici delle soluzioni $c(t)$ di un problema relativo al modello di Classe I, ottenute usando i differenti metodi. Come valori iniziali sono stati presi: $c_0 = 0.2$; $c_{e_0} = 10$; $n_0 = 0.6$; $p_0 = 7$. Inoltre, $\nu = 0.56$.

È stato osservato che le soluzioni hanno un comportamento differente a seconda del metodo con cui sono state ottenute, ed in modo particolare

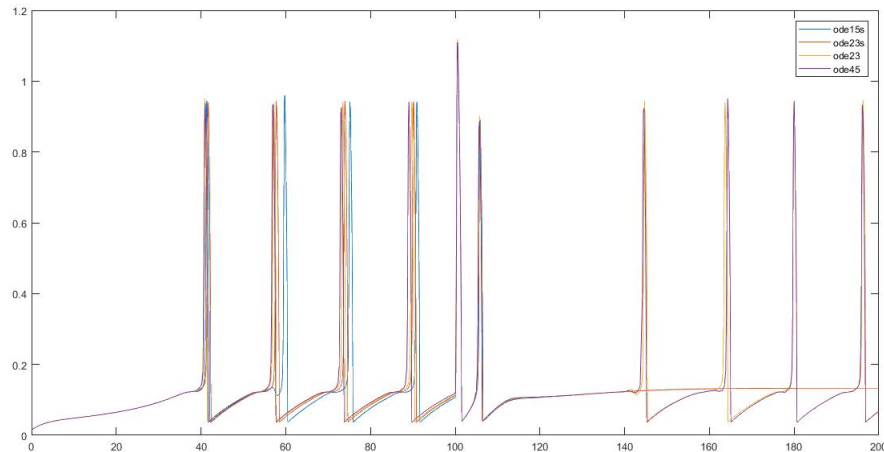


Figura 4.3. Sovrapposizione dei grafici delle soluzioni ottenute con tolleranze di default, per il problema ai valori iniziali $c_0 = 0.2$; $c_{e_0} = 10$; $n_0 = 0.6$; $p_0 = 7$ relativo al modello di Classe I.

ode15s ed *ode23s* con le tolleranze di *default* non sono in grado di tracciare le oscillazioni di c a seguito del picco. Teniamo conto che il modello biologico, che tali modelli vogliono riprodurre, prevede un relativo tempo di 'ripresa', a seguito del picco di c dato dall'impulso istantaneo di p , dopo il quale, una volta che p è stato degradato, le oscillazioni della concentrazione c riprendono nella loro consueta forma.

Abbiamo deciso di tracciare la soluzione al problema risolvendo con *ode15s* ed *ode23s* impostando implicitamente mediante *odeset* le opzioni di tolleranza (relativa ed assoluta).

Ricordiamo che i valori di *default* sono: $RelTol = 1e - 3$ e $AbsTol = 1e - 6$. Abbiamo pertanto deciso di diminuire le tolleranze impostando per questi parametri i valori: $RelTol = 1e - 5$ e $AbsTol = 1e - 8$.

Guardando la figura 4.4 possiamo osservare come le soluzioni, dopo il picco, risultano shiftate di qualche secondo le une rispetto alle altre. Quelle che coincidono sono le soluzioni ottenute con *ode23* ed *ode45* ma questo non

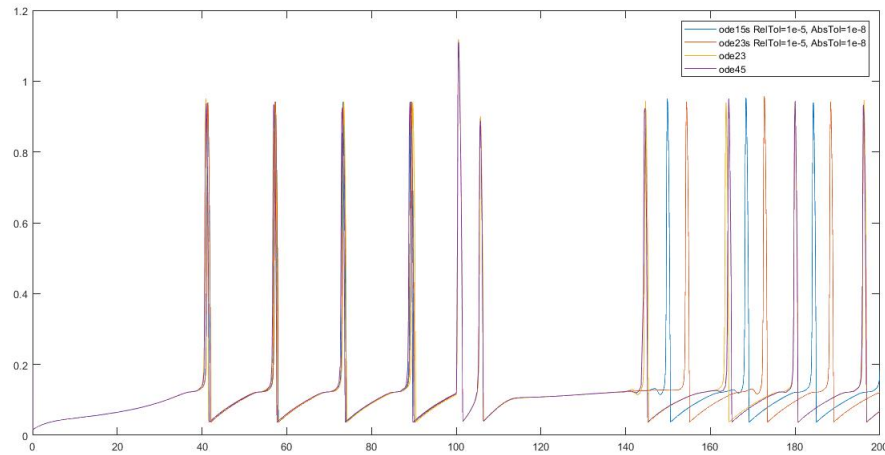


Figura 4.4. Grafici delle soluzioni $c(t)$ ottenute con *ode23* e *ode45* in cui manteniamo le opzioni di tolleranza di default, e con *ode15s* ed *ode23* in cui impostiamo nuovi valori di tolleranza $RelTol = 1e - 5$ e $AbsTol = 1e - 8$

ci autorizza a concludere che siano i metodi che meglio approssimano la soluzione esatta, di cui non disponiamo.

E dunque ci siamo chiesti: *quale delle soluzioni numeriche ottenute è quella corretta?*

Per rispondere a questa domanda abbiamo deciso di ridurre progressivamente la tolleranza dei metodi, richiedendo dunque, ad ogni iterazione del procedimento, una maggiore accuratezza, e consapevoli che questa operazione avrebbe richiesto a ciascun metodo un costo computazionale maggiore. Abbiamo confrontato di volta in volta le soluzioni ottenute, e ci siamo fermati al punto in cui tutte le soluzioni confluiscono in un'unica soluzione, quella che riteniamo essere la *migliore*. Inoltre, di volta in volta abbiamo registrato i valori di *'nfevals'* per tenere traccia del costo computazionale di ciascun metodo. Risolvendo con le tolleranze di *default* si ottengono le soluzioni in figura 4.3.

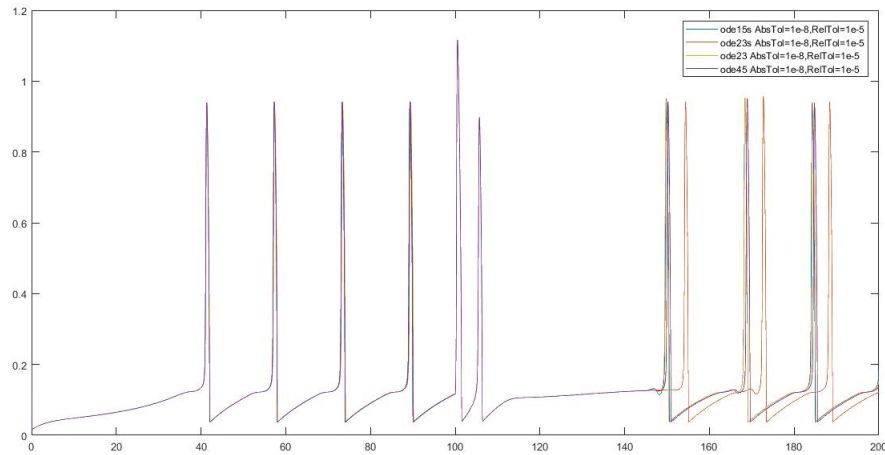


Figura 4.5. Soluzioni con tolleranze $RelTol = 1e - 5$ ed $AbsTol = 1e - 8$

Impostando nuove opzioni di tolleranza, prendendo in particolare $RelTol = 1e - 5$ ed $AbsTol = 1e - 8$, si ottengono le soluzioni in figura 4.5. Non avendo soddisfatto il nostro criterio abbiamo deciso di ridurre ulteriormente i valori di tolleranza.

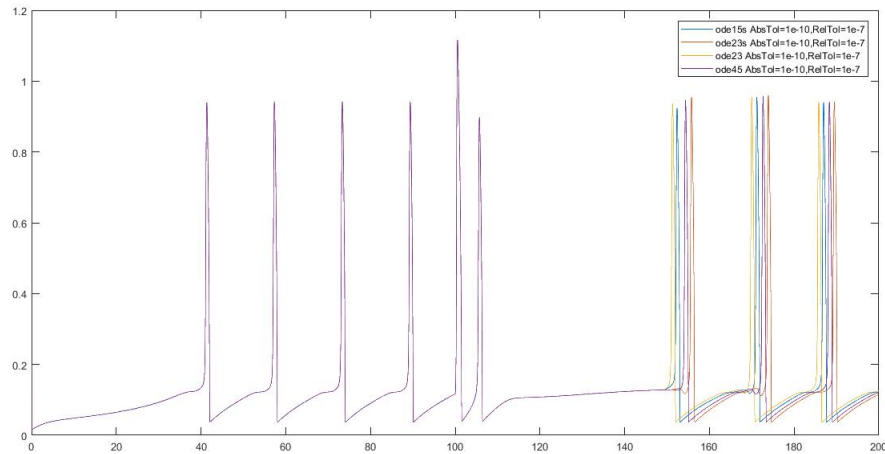


Figura 4.6. Soluzioni con tolleranze $RelTol = 1e - 7$ ed $AbsTol = 1e - 10$

Fissando i valori $RelTol = 1e - 7$ ed $AbsTol = 1e - 10$, le soluzioni ot-

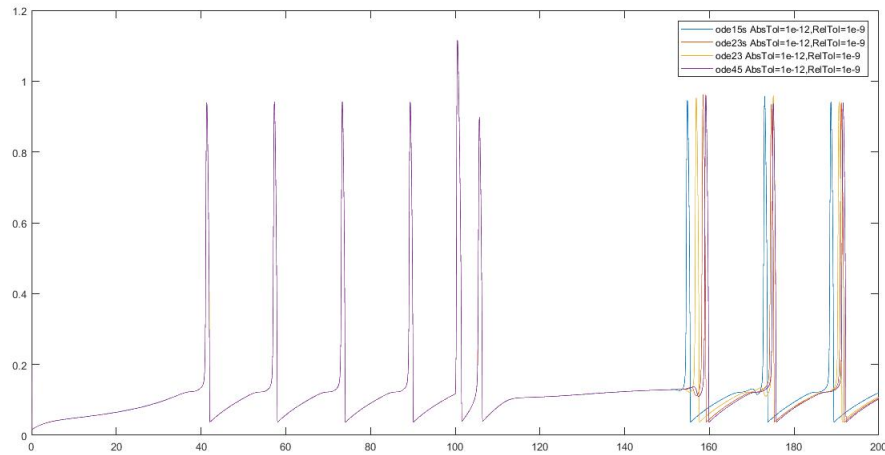


Figura 4.7. Soluzioni con tolleranze $RelTol = 1e - 9$ ed $AbsTol = 1e - 12$

tenute, mostrate in figura 4.6, non sono state ancora soddisfacenti. Pertanto abbiamo continuato ad abbassare la tolleranza, fissando $RelTol = 1e - 9$ ed $AbsTol = 1e - 12$. Le soluzioni ottenute in questo caso, ancora una volta insoddisfacenti, sono quelle mostrate in figura 4.7.

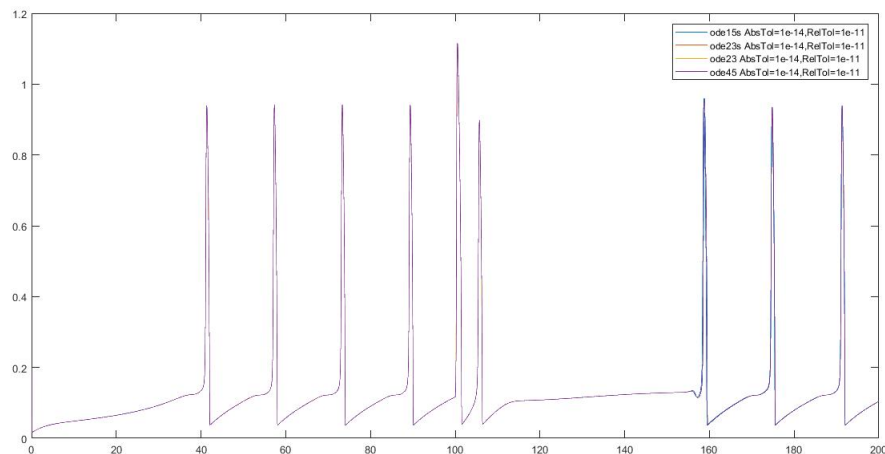


Figura 4.8. Soluzioni con tolleranze $RelTol = 1e - 11$ ed $AbsTol = 1e - 14$

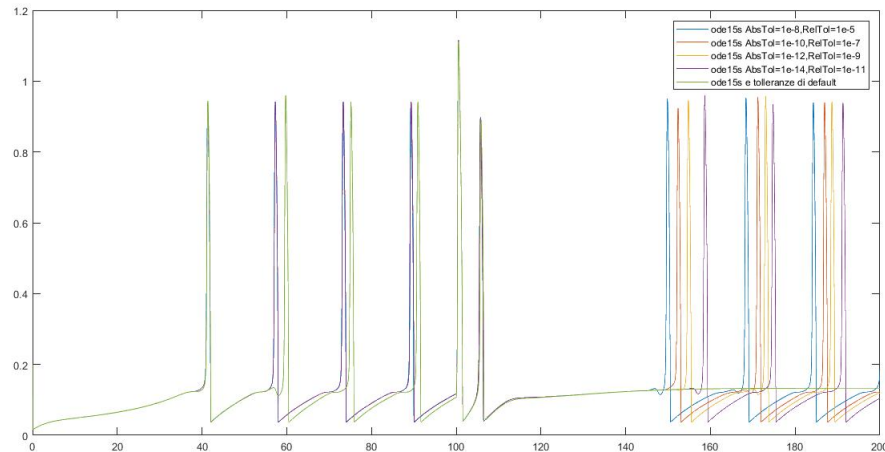


Figura 4.9. Soluzioni con *ode15s* e le differenti opzioni di di tolleranza

Infine, siamo riusciti a soddisfare il criterio di *sovrapposizione delle soluzioni*, come si può evincere dalla figura 4.8, fissando i valori di tolleranza $RelTol = 1e - 11$ ed $AbsTol = 1e - 14$. Possiamo stabilire che questa è la soluzione numerica migliore.

Di volta in volta ci siamo resi conto di quanto i metodi siano diventati sempre più costosi e che, a parità di accuratezza, *ode15s* rimane in assoluto il metodo migliore, contando, nel caso della massima accuratezza richiesta, un numero di *'nfevals'* pari a 26762, contro i 3604531 di *ode23s*, 683644 di *ode23*, e 161533 di *ode45*. A tal proposito si veda la tabella 4.4.

Nel tentativo di capire se sia necessario richiedere ai metodi una accuratezza maggiore, e quindi un costo computazionale maggiore, abbiamo deciso di confrontare le soluzioni a costo computazionale più basso che sono state ottenute ad ogni passo, abbassando di volta in volta la tolleranza, e quindi a parità di accuratezza. In questo caso sono state confrontate tutte quante le soluzioni ottenute con *ode15s* con le diverse tolleranze in esame. Si veda in figura 4.9. Nessuna delle soluzioni con accuratezza minore rispetto alla massima accuratezza richiesta per avere la *'soluzione migliore'*, è risultata

soddisfacente. Pertanto è necessario richiedere ad *ode15s* una accuratezza elevata per risolvere 'bene' il modello di Classe I.

	<i>ode15s</i>	<i>ode23s</i>	<i>ode23</i>	<i>ode45</i>
$RelTol = 1e - 3$ e $AbsTol = 1e - 6$	1816	4825	6793	9613
$RelTol = 1e - 5$ e $AbsTol = 1e - 8$	4960	34503	12538	13525
$RelTol = 1e - 7$ e $AbsTol = 1e - 10$	8368	166884	41494	28117
$RelTol = 1e - 9$ e $AbsTol = 1e - 12$	14925	777072	165223	66013
$RelTol = 1e - 11$ e $AbsTol = 1e - 14$	26762	3604531	683644	161533

Tabella 4.4. Costo computazionale dei metodi, in termini di valutazione di funzione, per la risoluzione di un problema relativo a modelli di Classe I

4.2.1 Distribuzione dei tempi in cui è stata calcolata la soluzione

Per questo problema ai valori iniziali, relativo al modello di Classe I, abbiamo pensato di mostrare come si distribuiscono i tempi rispetto alla soluzione numerica calcolata, richiedendo a ciascun metodo l'accuratezza massima, quella per cui tutte quante le soluzioni coincidono. Nella tabella 4.5 abbiamo riportato i tempi di risoluzione, il numero di valutazioni per ciascun metodo (già visti nella tabella precedente) e la dimensione del vettore dei tempi, per renderci conto del numero dei passi realizzati da ciascun metodo, nel risolvere il problema ai valori iniziali $[0.2, 10, 0.6, 7]$ ed intervallo di integrazione $[0, 200]$. In figura 4.10 viene mostrato il grafico della distribuzione dei tempi di risoluzione t_i in funzione del passo h , dove sia h che t sono in scala logaritmica. Si osserva la crescita più rapida di t_i per le funzioni *ode15s* e *ode23s* rispetto ad *ode23* e *ode45*.

<i>solutori</i>	<i>dimensione del vettore dei tempi</i>	<i>nfevals</i>	<i>tempo di risoluzione</i>
ode15s	16162	26762	13.22
ode23s	514918	3604531	709.80
ode23	227752	683644	76.16
ode45	26813	161533	17.22

Tabella 4.5. Costo computazionale dei metodi in termini di valutazioni di funzione e tempi di risoluzione.

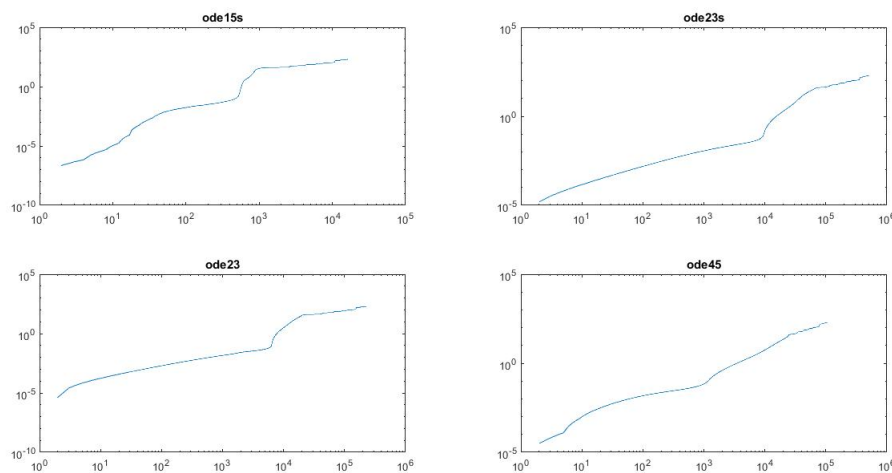


Figura 4.10. Distribuzione dei tempi dei diversi solutori, in scala logaritmica.

4.3 Analisi dei metodi per la risoluzione dei modelli di Classe II

Anche per il modello di Classe II è stato effettuato un confronto dei diversi metodi alla ricerca di quello che meglio approssima la soluzione esatta, ad un costo computazionale più basso. Abbiamo studiato il problema per tre differenti dati iniziali, tenuto conto che nella maggior parte dei casi il comportamento del problema è sempre lo stesso, mentre cambia se è maggiore la differenza tra i valori iniziali di c e c_e . Una differenza maggiore o minore rende il problema più o meno *stiff*.

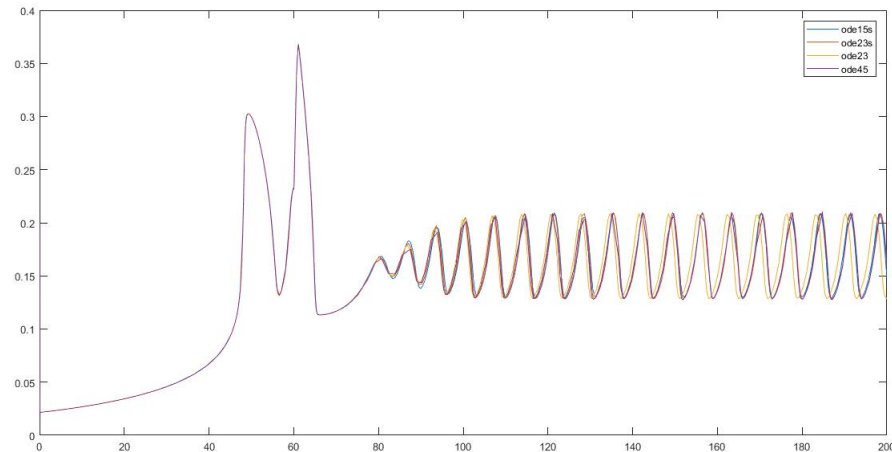


Figura 4.11. Soluzioni del problema relativo al modello di Classe II, a valori iniziali $[0.2, 10, 0.6]$, ottenute con le tolleranze di default

Il primo caso in esame è quello in cui il dato iniziale è $[0.2, 10, 0.6]$. Abbiamo risolto il problema con i diversi metodi e mantenendo le opzioni di tolleranza di *default*. Si veda in figura 4.11. Abbiamo poi abbassato la tolleranza dei metodi a $RelTol = 1e - 5$ ed $AbsTol = 1e - 8$, soddisfacendo così il criterio di 'sovrapposizione delle soluzioni', come si evince dalla figura 4.12. Rispetto al modello di Classe I, per risolvere bene questo modello, non dobbiamo richiedere un'elevata accuratezza. Come vedremo nella tabella in figura 4.6, sia con le tolleranze di *default* che con le tolleranze ridotte, *ode15s* rimane il metodo a costo computazionale più basso in termini di valutazioni di funzione.

Anche in questo caso abbiamo confrontato la soluzione 'migliore', quella ottenuta con maggiore accuratezza e dal metodo a costo computazionale ridotto, ovvero con *ode15s* e tolleranze pari a $RelTol = 1e - 5$ ed $AbsTol = 1e - 8$, con quella ottenuta con *ode15s* e minore accuratezza che, anche in questo caso, a parità di accuratezza con tutti gli altri metodi, è risultata essere la migliore in termini di costo computazionale. Si veda in figura 4.16.

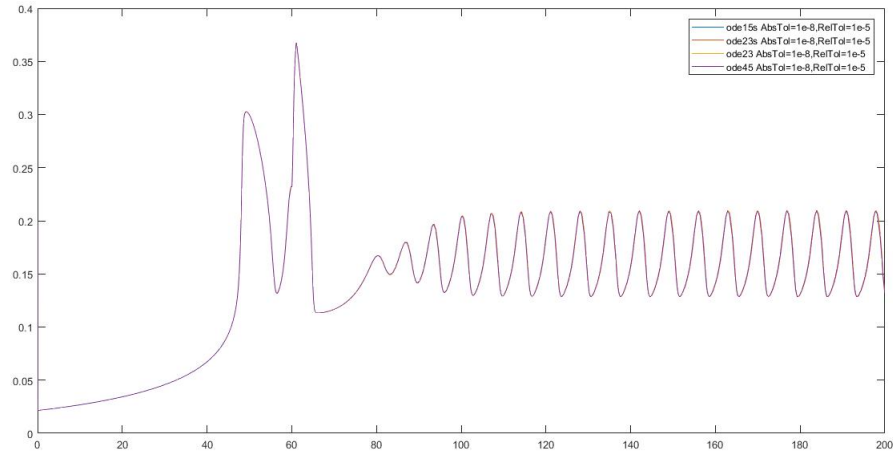


Figura 4.12. Soluzioni del problema relativo al modello di Classe II, a valori iniziali $[0.2, 10, 0.6]$, ottenute con opzioni di tolleranza $RelTol = 1e-5$ ed $AbsTol = 1e-8$

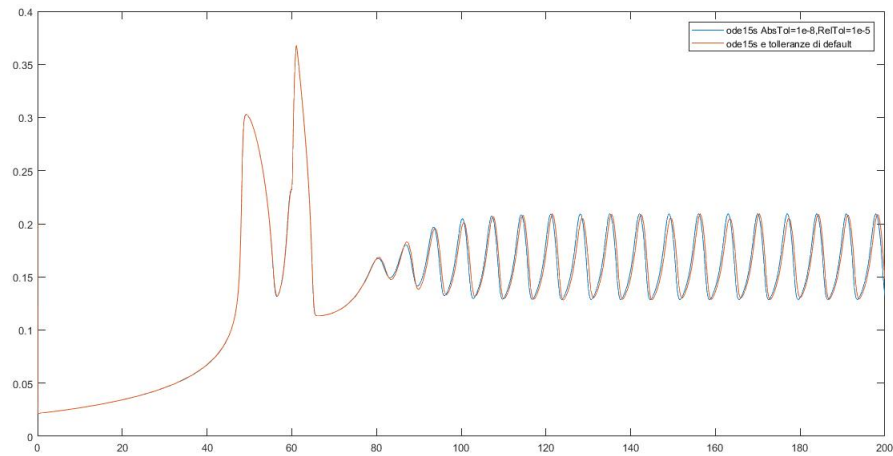


Figura 4.13. Confronto delle soluzioni del problema a valori iniziali $[0.2, 10, 0.6]$ e a costo computazionale minore per due diversi parametri di accuratezza

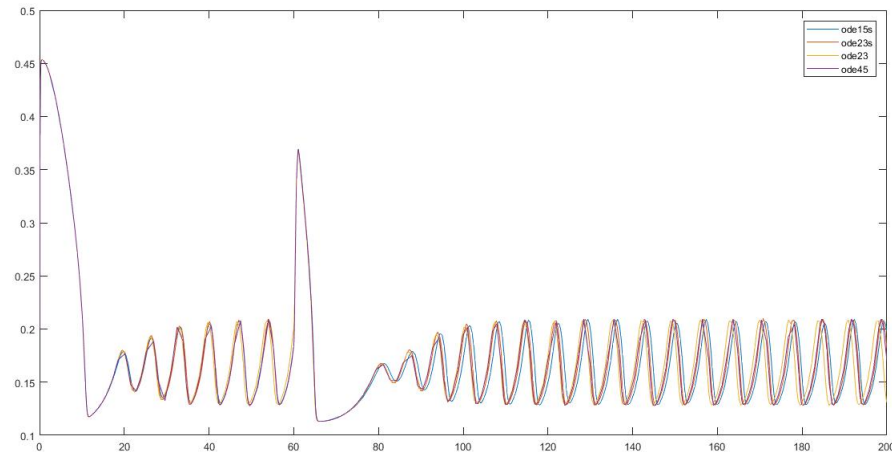


Figura 4.14. Soluzioni del problema relativo al modello di Classe II, a valori iniziali $[0.2, 20, 0.6]$, ottenute con le tolleranze di default

Abbiamo osservato che è conveniente richiedere maggiore accuratezza ad *ode15s*, anche se ad un costo computazionale che è il doppio rispetto alla risoluzione con le tolleranze di *default*; ad ogni modo, il costo starà comunque al di sotto di quello richiesto per risolvere il problema in modo meno accurato con *ode23s*, *ode23*, *ode45*.

Abbiamo eseguito lo stesso test per un secondo dato iniziale, in cui maggiore è la differenza tra c e c_e iniziali, ovvero abbiamo preso $[0.2, 20, 0.6]$.

La figura 4.14 mostra le soluzioni ottenute con i diversi metodi a parità di accuratezza, data dai parametri di tolleranza di *default*. La figura 4.15 mostra come una maggiore accuratezza dei metodi, data dai valori $RelTol = 1e - 5$ ed $AbsTol = 1e - 8$ attribuiti ai parametri di tolleranza, faccia convergere le soluzioni di ciascun metodo ad un'unica soluzione, la migliore soluzione numerica. Nel primo caso il metodo che ha un costo computazionale minore è dato da *ode23*. Mentre nel secondo caso, chiedendo ai metodi maggiore accuratezza, il metodo a costo computazionale minore risulta essere *ode15s*.

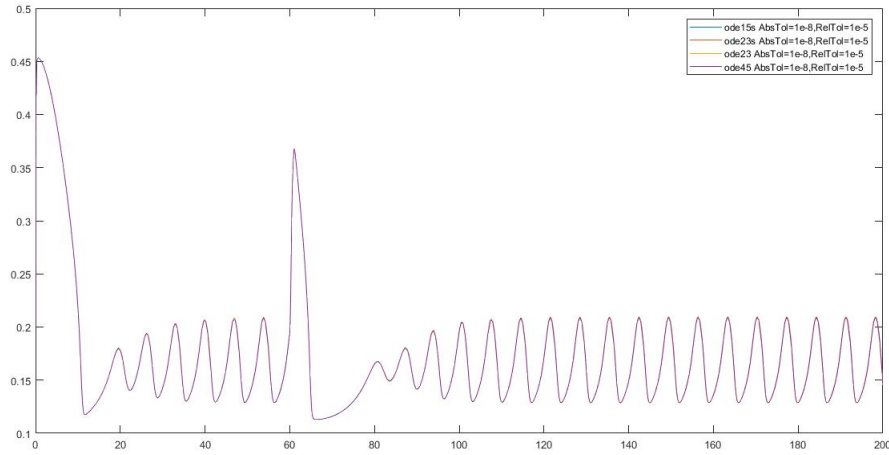


Figura 4.15. Soluzioni del problema relativo al modello di Classe II, a valori iniziali $[0.2, 20, 0.6]$, ottenute con opzioni di tolleranza $RelTol = 1e-5$ ed $AbsTol = 1e-8$

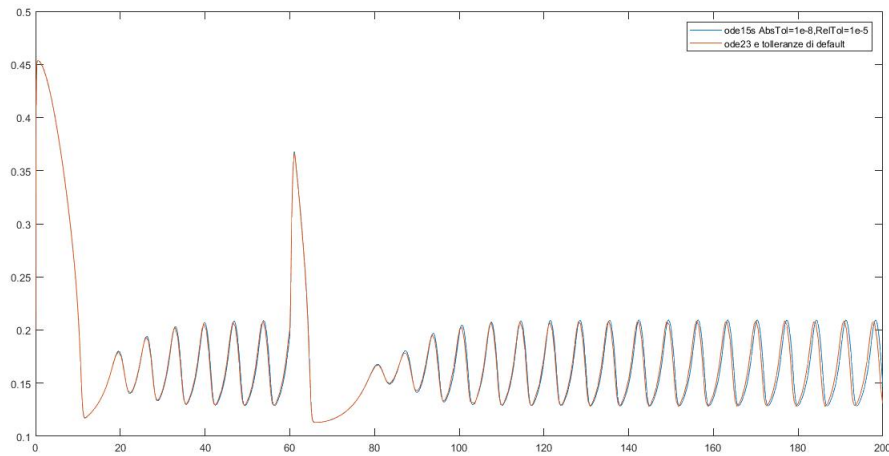


Figura 4.16. Confronto delle soluzioni del problema a valori iniziali $[0.2, 20, 0.6]$, al costo computazionale più basso, per due diversi parametri di accuratezza

	[0.2, 10, 0.6]		[0.2, 20, 0.6]		[0.2, 0.8, 0.6]	
	default	$Tol = 1e - 5; 1e - 8$	default	$Tol = 1e - 5; 1e - 8$	default	$Tol = 1e - 5; 1e - 8$
ode15s	1767	3300	2030	3774	1368	2652
ode23s	3146	14880	3516	15524	2726	13272
ode23	6202	9475	1777	5575	19192	21862
ode45	9721	10711	2215	4021	31189	31375

Tabella 4.6. Costo computazionale in termini di valutazione di funzione per problemi ai valori iniziali relativi al modello di Classe II

Abbiamo confrontato le soluzioni 'migliori' in termini di costo computazionale, per i due diversi parametri di accuratezza. Si veda in figura 4.16. In un caso come questo, in cui il problema è evidentemente meno stiff, potremmo anche decidere di risolvere con *ode23* e le tolleranze di *default*, tenuto conto che questo metodo ha un costo computazionale pari alla metà del costo computazionale di *ode15s* se richiediamo a quest'ultimo una maggiore accuratezza rispetto a quella di *default*.

Abbiamo poi ritenuto interessante vedere cosa accade nel caso opposto a questo, ovvero nel caso in cui è sufficientemente piccola la differenza tra i valori iniziali di c e c_e . A questo proposito si vedano le figure 4.17 e 4.18. Nella figura 4.19 sono state mostrate le soluzioni 'migliori', ottenute a costo computazionale minore nel confronto tra i metodi a parità di accuratezza.

Vogliamo aprire una piccola parentesi relativa al modello. In questo caso, come mostrano le soluzioni, manca il 'tempo di ripresa' delle oscillazioni, in accordo coi risultati sperimentali, perchè è un comportamento che si può riscontrare se l'impulso avviene in un istante in cui il sistema sta già oscillando.

In questo ultimo caso in esame appare evidente la natura altamente stiff del problema per cui è consigliabile risolvere con *ode15s* ed una accuratezza leggermente maggiore rispetto a quella di *default*. La tabella 4.6 mostra i valori di '*nfevals*' relativi a metodi diversi per due diversi valori di tolleranza, per i tre differenti problemi ai valori iniziali.

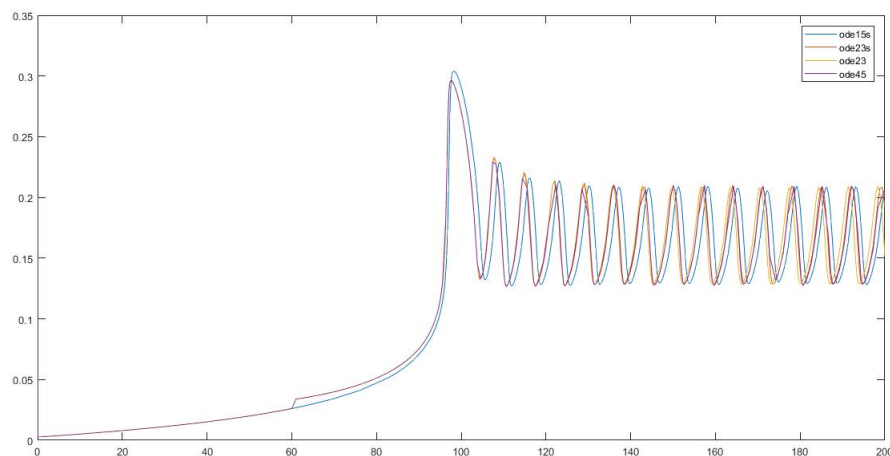


Figura 4.17. Soluzioni del problema relativo al modello II, a valori iniziali $[0.2, 0.8, 0.6]$, ottenute con le tolleranze di default

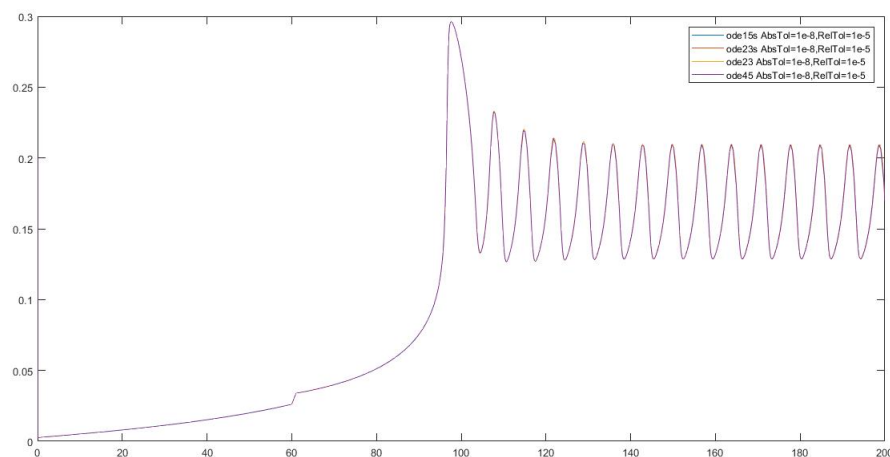


Figura 4.18. Soluzioni del problema relativo al modello II, a valori iniziali $[0.2, 0.8, 0.6]$, ottenute con opzioni di tolleranza $RelTol = 1e-5$ ed $AbsTol = 1e-8$

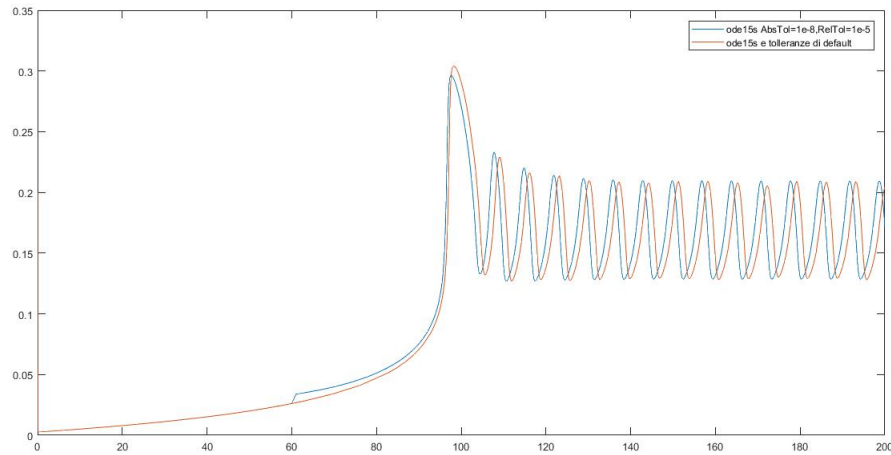


Figura 4.19. Confronto delle soluzioni del problema relativo al modello di Classe II, a valori iniziali $[0.2, 0.8, 0.6]$, ottenute con i metodi a costo computazionale minore per due diversi parametri di accuratezza

4.3.1 Distribuzione dei tempi in cui è stata calcolata la soluzione in un problema relativo al modello di Classe II

Anche per un problema ai valori iniziali, relativo al modello di Classe II, abbiamo pensato di mostrare come si distribuiscono i tempi rispetto alla soluzione numerica calcolata.

Nella tabella 4.7 abbiamo riportato la dimensione del vettore dei tempi, per renderci conto del numero dei passi realizzati da ciascun metodo, nel risolvere il problema con dato iniziale $[0.2, 10, 0.6]$ ed intervallo di integrazione $[0, 200]$. In figura 4.20 vediamo come si distribuiscono i tempi rispetto al passo.

<i>solutori</i>	<i>dimensione del vettore dei tempi</i>
ode15s	1505
ode23s	2460
ode23	3016
ode45	1694

Tabella 4.7. Dimensioni del vettore dei tempi per ciascun metodo

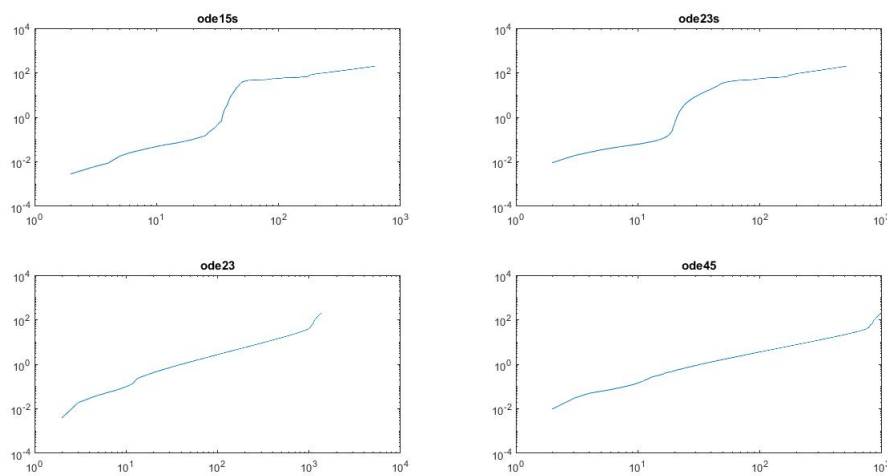


Figura 4.20. Distribuzione dei tempi di ciascun solutore, in scala logaritmica

4.4 Analisi dei metodi per la risoluzione dei modelli senza impulso di p

Abbiamo fatto la stessa analisi per quanto riguarda i modelli senza impulso di p . Si è tralasciato di riportare i grafici delle soluzioni, mentre invece sono stati riportati i dati inerenti il costo computazionale dei metodi in termini di valutazioni di funzioni e di tempi di risoluzione, raccolti nelle tabelle a seguire.

Abbiamo risolto tre problemi, uno relativo al modello di Classe I con $\nu = 0.56$, uno relativo al modello Ibrido con $\nu = 1$, prendendo per entrambi

	<i>modello di Classe I</i>	<i>modello di Classe II</i>	<i>modello Ibrido</i>
<i>ode15s</i>	5238	3386	4798
<i>ode23s</i>	38153	15216	12550
<i>ode23</i>	13603	9481	11623
<i>ode45</i>	14671	10519	16783

Tabella 4.8. Costo computazionale dei metodi in termini di numero di valutazioni di funzioni per la risoluzione di problemi ai valori iniziali relativi a ciascuno dei tre modelli. Per il modello di Classe I e di Classe II sono stati presi i parametri di tolleranza $RelTol = 1e - 5$ ed $AbsTol = 1e - 8$. Mentre per il modello Ibrido sono state mantenute quelle di *default*.

lo stesso dato iniziale $[0.2, 10, 0.6, 7]$, e uno relativo al modello di Classe II con $\nu = 1$ e dato iniziale $[0.2, 10, 1]$, senza il valore di n iniziale, dal momento che questo non dipende dal tempo t ma risulta essere costante.

Abbiamo visto che per risolvere 'bene' i modelli di Classe I e di Classe II è necessario richiedere ai metodi una tolleranza leggermente inferiore a quella di *default*. In particolar modo, è sufficiente prendere $RelTol = 1e - 5$ ed $AbsTol = 1e - 8$. Mentre, per quanto riguarda il modello Ibrido non è stato necessario richiedere ai metodi una maggiore accuratezza, per cui abbiamo risolto i problemi ad esso relativi usando semplicemente le tolleranze di *default*.

In generale, per risolvere questi modelli, il metodo al più basso costo in termini di valutazione di funzioni resta sempre *ode15s*.

4.5 Analisi dei risultati numerici

Abbiamo potuto osservare la differente natura *stiff* che assume il modello, nelle tre differenti conformazioni, al variare del dato iniziale. Il modello Ibrido, per essere risolto efficacemente, non richiede ai metodi una accuratezza maggiore rispetto a quella standard. Ad ogni modo, abbiamo potuto constatare che il metodo migliore, da un punto di vista computazionale, risulta

essere *ode15s*, mantenendo le tolleranze di *default*. Gli altri due modelli hanno mostrato di avere un comportamento particolarmente *stiff* nella maggior parte dei casi, anche se nei casi in cui maggiore è la differenza tra i valori iniziali delle concentrazioni c e c_e il modello diventa meno *stiff*. Ad ogni modo, in termini di costo computazionale, è sempre conveniente risolvere con *ode15s* ed una accuratezza più o meno alta a seconda che il problema appartenga alla Classe I o alla Classe II dei modelli.

Dunque, per mostrare classiche oscillazioni della concentrazione $c(t)$, descritte nel capitolo precedente, nel caso in cui è presente l'impulso di p , abbiamo risolto usando *ode15s* e l'accuratezza necessaria per avere la 'soluzione migliore': per risolvere i problemi relativi al modello Ibrido abbiamo usato tolleranze di *default*, per risolvere quelli relativi al modello di Classe I abbiamo usato $RelTol = 1e-11$ e $AbsTol = 1e-14$, e per risolvere quelli relativi al modello di Classe II abbiamo usato $RelTol = 1e-5$ e $AbsTol = 1e-8$.

Mentre per risolvere i problemi relativi al modello di Classe I, di Classe II ed Ibrido senza impulso di p , abbiamo fatto ricorso al solutore *ode45* tenendo conto della necessaria-sufficiente accuratezza per avere una 'buona' soluzione numerica: abbiamo preso le tolleranze di *default* per risolvere il modello Ibrido e $RelTol = 1e-5$ ed $AbsTol = 1e-8$ per risolvere gli altri due modelli.

CONCLUSIONI

In questo elaborato abbiamo descritto le tre principali classi di modelli di dinamica del Ca^{2+} presenti in letteratura, noti come: Modello di Classe I, Modello di Classe II e Modello Ibrido. Abbiamo risolto numericamente tali classi di modelli confrontando le soluzioni ottenute con ciascuno dei metodi del pacchetto ODE di Matlab, cambiando i parametri di tolleranza ove necessario, nel tentativo di determinare il metodo migliore in termini di efficacia ed efficienza. Abbiamo constatato che risolvere i tre modelli base, senza impulso di *IP3*, non ha un costo molto elevato e non è necessario richiedere una accuratezza che si discosti molto da quella standard. Per quanto riguarda i modelli con l'applicazione dell'impulso istantaneo di *IP3*, il modello ibrido viene risolto correttamente da ciascun metodo mantenendo le opzioni di tolleranza di default; per risolvere il modello di Classe II è necessaria una accuratezza leggermente maggiore di quella standard. Risulta invece molto elevato il costo per la risoluzione di modelli di classe I, in quanto è necessario richiedere ai metodi una accuratezza elevata, e ciò comporta un notevole aumento del costo computazionale. Abbiamo potuto concludere che il metodo implicito per problemi stiff, *ode15s*, in tutti i casi, è sicuramente il più efficace ed efficiente a parità di accuratezza con gli altri.

Lista dei simboli e acronimi

Ca^{2+} : Calcio

$IP3$: Inositolo Trifosfato

$[Ca^{2+}] = c$: concentrazione di calcio nel citoplasma

$[Ca^{2+}] = c_e$: concentrazione di calcio nel reticolo endoplasmatico

$[IP3] = p$: concentrazione di inositolo trifosfato

ER Reticolo Endoplasmatico

SR Reticolo Sarcoplasmatico

ATP Adenosina Trifosfato

ADP Adenosina Difosfato

IPR Recettore dell'Inositolo Trifosfato

RyR Recettore della Rianodina

SERCA Pompe della Ca^{2+} -ATPasi del reticolo endoplasmatico e sarcoplasmatico

PLC Fosfolipasi C

SOC Canali di apertura del calcio sulla membrana plasmatica

Bibliografia

- [1] J.Keener and J.Sneyd, *Mathematical Physiology*, Systems Physiology, cap.7 Calcium Dynamics, Springer, 2009.
- [2] Berridge et al., *The versatility and universality of calcium signalling*, Nature Reviews, Molecular Cell Biology, vol.1, 2000.
- [3] Shuttleworth TJ and Thompson JL, *Discriminating between capacitative and arachidonate-activated Ca_{2+} entry pathways in HEK293cells*, J.Biol.Chem., 1999.
- [4] Pozzan et al., *Molecular and cellular physiology of Ca_{2+} stores*, Physiol. Rev., 1994.
- [5] De Young and Keizer, *A single-pool inositol 1,4,5-triphosphate-receptor-based model for agonist-stimulated oscillations in Ca_{2+} concentrations*, 1999.
- [6] Sneyd and Dufour, *A dynamic model of the type-2-inositol thriphosphate receptor*, 2002.
- [7] Sneyd et al., *A model of Calcium Waves in Pancreatic and Parotid Acinar Cells*, Biophysical Journal, 2003.
- [8] James Sneyd, *Models of calcium dynamics*, Scholarpedia.
- [9] Dupont et al., *Calcium Oscillations*, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2010.

-
- [10] D'Orio Maria Rita, *Modelli di dinamica del Ca^{2+} nella cellula*, Università degli Studi di Palermo, Tesi di Laurea Triennale, 2014
- [11] M. Domijan, R. Murray, and J. Sneyd, *Dynamical Probing of the Mechanisms Underlying Calcium Oscillations*, Journal of Nonlinear Science, 2006
- [12] R. Ashino, M. Nagase, R. Vaillancourt, *Behind and Beyond the Matlab ODE Suite*, An International Journal Computers and Mathematics with Applications, 2000
- [13] Lawrence F. Shampine and Mark W. Reichelt *The Matlab ODE suite*, SIAM Journal on Scientific Computing, 1997