

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

Corso di Laurea Magistrale in
INGEGNERIA BIOMEDICA

Studio in silico dei meccanismi delle alternans cardiache nei modelli ORd e TNNP

Tesi di Laurea Magistrale in
BIOINGEGNERIA MOLECOLARE E CELLULARE

RELATORE:
Prof. Stefano Severi

PRESENTATA DA:
Giuseppe D'Adamo

CORRELATORE:
Dott.ssa Chiara Bartolucci

SESSIONE III
ANNO ACCADEMICO 2017/2018

Indice

<u>Introduzione</u>	3
<u>Capitolo 1: Elettrofisiologia cardiaca</u>	4
<u>1.1 Potenziale di membrana e potenziale d'azione</u>	6
1.1.1 <i>Periodo refrattario assoluto e periodo refrattario relativo</i>	10
1.1.2 <i>Post-depolarizzazioni</i>	10
1.1.3 <i>Circuiti di rientro e rotori</i>	11
<u>1.2 Il ciclo intracellulare del calcio</u>	12
<u>Capitolo 2: Le alternans cardiache</u>	14
<u>2.1 Meccanismi delle alternans cardiache: "negative coupling" e "positive coupling" tra Ca^{2+} e potenziale di membrana V_m</u>	16
2.1.1 <i>Coupling $V_m \rightarrow [Ca^{2+}]_i$</i>	16
2.1.2 <i>Coupling $[Ca^{2+}]_i \rightarrow V_m$</i>	18
<u>2.2 Interazioni tra "V_m-driven instabilities" e "$[Ca^{2+}]_i$-driven instabilities"</u>	20
<u>Capitolo 3: Le alternans nel cuore umano</u>	22
<u>Capitolo 4: Modelli di AP ventricolare</u>	27
4.1 <u>Cenni storici</u>	27
4.2 <u>Modelli Markoviani</u>	31

<u>4.3 Il modello di Ten Tusscher-Panfilov</u>	33
4.3.1 <i>Le alternans nel modello TNNP</i>	36
<u>4.4 Il Modello di O’Hara-Rudy</u>	38
4.4.1 <i>Le alternans in ORd</i>	40

Capitolo 5: Analisi della suscettibilità alle alternans dei modelli ORd e

<u>TNNP</u>	44
5.1 <u>Metodi</u>	44
5.2 <u>La diffusione del Ca^{2+} all’interno del SR nel modello ORd</u>	44
5.3 <u>Le simulazioni con il modello TNNP</u>	46
5.4 <u>La I_{Ks} nel modello TNNP e nel modello ORd</u>	51
5.5 <u>Il trapianto della I_{Ks} da ORd a TNNP</u>	53
5.6 <u>Il trapianto della I_{Ks} da TNPP a ORd</u>	54
5.7 <u>Il trapianto della I_{Kr} da ORd a TNNP</u>	56
5.8 <u>Il trapianto della I_{Kr} da TNNP a ORd</u>	57

<u>Conclusioni</u>	58
---------------------------------	----

<u>Bibliografia</u>	59
----------------------------------	----

<u>Appendice: Dati sperimentali sulle alternans nel cuore umano</u>	63
--	----

Introduzione

Dato l'enorme impatto delle malattie cardiache sulla società moderna risulta di fondamentale importanza cercare di capire quali siano i meccanismi alla base dell'accoppiamento eccitazione-contrazione nel cuore umano e l'origine dei suoi disordini che possono portare a complicazioni molto serie e spesso mortali. Le alternans cardiache sono state riconosciute come un fattore aritmogeno chiave, predisponendo il cuore a fenomeni di rientro e aritmie molto gravi. Negli ultimi 60 anni la ricerca nel campo dell'elettrofisiologia cardiaca ha potuto beneficiare dell'uso di modelli matematici computazionali per cercare di fare luce sulle complesse dinamiche coinvolte nelle normali funzioni di una cellula cardiaca. Oggi questo tipo di indagine "*in silico*" è largamente adottata per coadiuvare e guidare il classico lavoro sperimentale. In questa tesi verrà innanzitutto descritto il fenomeno delle alternans cardiache, per poi passare ad una review della letteratura presente attualmente sull'argomento per cercare di capire quali siano i meccanismi a livello di singola cellula che scatenano o sopprimono tale instabilità. Successivamente verranno presi in esame due tra i modelli di cardiomiocita umano più famosi, ovvero il modello di O'Hara-Rudy (ORd) e il modello di Ten Tusscher-Noble-Noble-Panfilov (TNNP), per condurre delle simulazioni atte a verificare se gli effettivi meccanismi complici delle alternans siano quelli descritti in letteratura ed eventualmente svelarne di nuovi. Nell'elaborato verranno descritti i protocolli utilizzate e le strategie adottate per cercare di ottenere un comportamento del singolo cardiomiocita coerente con quelli osservati in letteratura.

Capitolo 1

Elettrofisiologia cardiaca

L'elettrofisiologia è quella branca della fisiologia che studia le proprietà elettriche dei tessuti eccitabili (come neuroni e muscoli). Il meccanismo elettrofisiologico che lega la stimolazione elettrica alla contrazione meccanica di un tessuto costituito da cellule eccitabili è detto accoppiamento eccitazione-contrazione (excitation-contraction coupling o ECC). Dal punto di vista funzionale, il meccanismo di contrazione del miocardio umano è simile a quello dei muscoli scheletrici. Esso si divide in miocardio comune e miocardio specifico. La maggior parte è costituita da miocardio comune, ovvero l'insieme di cellule deputate alla contrazione, dette cardiomiociti. Essi si presentano di forma allungata e affusolata, circondati da una membrana detta sarcolemma, dove si trovano i canali permeabili alle varie specie ioniche presenti. L'unità contrattile è il sarcomero, che si organizza in fasce chiamate miofibrille avvolte da una membrana, il reticolo sarcoplasmatico (fig. 1.1).

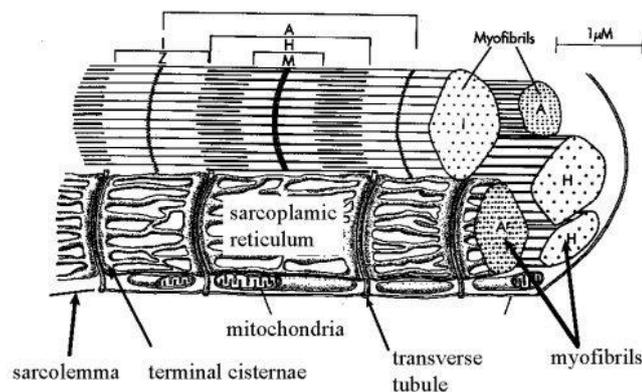


Figura 1.1: Sezione di muscolo di mammifero. Si possono notare le strutture coinvolte nel ciclo del calcio intracellulare [4].

All'interno dei sarcomeri si trovano i filamenti proteici di actina e miosina. L'attivazione dei miofilamenti è causata dal calcio rilasciato all'interno del citoplasma ad ogni battito tramite l'attivazione voltaggio-dipendente di canali ionici permeabili allo ione Ca^{2+} . Lo stimolo elettrico necessario ad innescare questo meccanismo è detto potenziale d'azione (action potential o AP). Il miocardio specifico è costituito da un sistema di cellule capaci di generare (cellule pacemaker del nodo seno-atriale, situato in atrio destro, con capacità di autodepolarizzarsi) e condurre efficacemente l'AP (nodo atrio-ventricolare, fascio di His, fibre del Purkinje) fino a trasmetterlo a tutto il muscolo cardiaco contrattile (fig. 1.2).

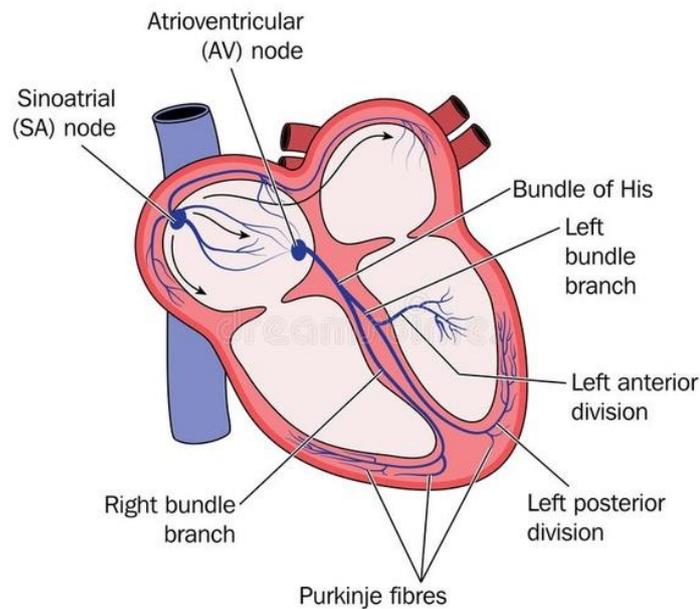


Figura 1.2: Sistema di conduzione del cuore [5].

1.1 Potenziale di membrana e potenziale d'azione

La quantità netta di ioni che diffonde attraverso una membrana dipende, oltre che dalla permeabilità della stessa a quello ione, anche dalla differenza di concentrazione di quest'ultimo e dalla differenza del potenziale elettrico ai capi della membrana. Come nelle altre cellule dell'organismo, la concentrazione di ioni potassio (K^+) all'interno del cardiomiocita è notevolmente superiore a quella extracellulare (145 mM contro 5 mM) come per lo ione calcio (Ca^{2+}), mentre lo ione sodio (Na^+) è più concentrato all'esterno (10 mM contro 140 mM). La membrana cellulare a riposo è molto più permeabile al potassio piuttosto che al sodio e al calcio: esso quindi tenderà a diffondere dall'interno all'esterno della cellula, seguendo la direzione del suo gradiente di concentrazione. La membrana delle cellule cardiache contiene diversi tipi di canali del K^+ . Alcuni sono regolati dal potenziale di membrana, altri da segnali chimici. Gli ioni K^+ carichi positivamente sono attratti all'interno della cellula dal potenziale negativo che si stabilisce, mentre la differenza di concentrazione tenderebbe a muovere gli ioni in senso opposto. Si hanno così due gradienti opposti che agiscono sugli ioni K^+ , facendoli muovere attraverso la membrana cellulare: uno chimico ed uno elettrostatico.

All'equilibrio le due forze sono uguali ed opposte e il potenziale di equilibrio E_x (o potenziale di Nernst per uno ione x) può essere ricavato tramite l'equazione di Nernst:

$$E_x = \frac{RT}{ZF} \ln \left(\frac{[X]_o}{[X]_i} \right)$$

dove R è la costante universale dei gas espressa in J/mol·K, Z è la valenza dell'elemento considerato, F è la costante di Faraday espressa in C/mol, T è la temperatura assoluta in gradi Kelvin, $[X]_i$ è la concentrazione ionica intracellulare e $[X]_o$ è la concentrazione ionica extracellulare. Il potenziale di membrana dipende però anche da altri ioni, non solo dal potassio. L'equazione di Goldman-Hodgkin-Katz, conosciuta comunemente come equazione di Goldman, è utilizzata per calcolare il potenziale di membrana di una cellula prendendo in considerazione tutti gli ioni che permeano attraverso la membrana. Il potenziale di membrana V_m può essere quindi calcolato come

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{\sum_i^n P_{M_i^+} [M_i^+]_o + \sum_j^m P_{A_j^-} [A_j^-]_o}{\sum_i^n P_{M_i^+} [M_i^+]_i + \sum_j^m P_{A_j^-} [A_j^-]_i} \right)$$

dove P_{ion} è la permeabilità per un dato ione espressa in m·s. In condizioni fisiologiche il potenziale di membrana a riposo di un cardiomiocita ventricolare si assesta sui -85 mV. Quando uno stimolo eccitatorio innalza questo valore oltre una certa soglia (circa -70 mV) ciò che si verifica è un potenziale d'azione. La morfologia dell'AP varia in base alla distribuzione e al comportamento dinamico dei canali ionici presenti sulla membrana delle cellule che costituiscono una determinata regione del cuore. Si parla quindi di eterogeneità spaziale dell'AP all'interno del muscolo cardiaco (fig. 1.3).

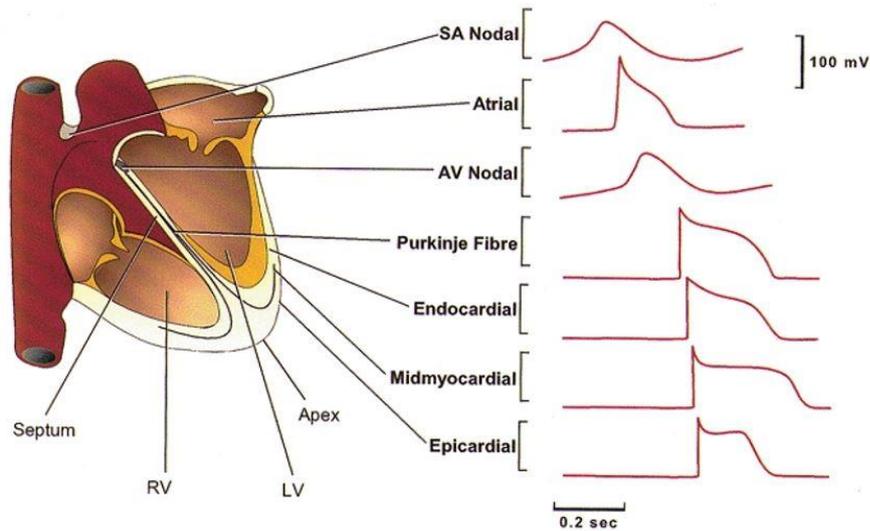


Figura 1.3: Andamento del AP nelle varie regioni del cuore [7].

L'AP ventricolare umano (fig. 1.4) mostra inizialmente una rapida ascesa verso potenziali positivi (fase 0) seguita da una piccola e veloce ripolarizzazione (fase 1) e una fase di plateau a potenziale costante (fase 2). Segue una forte ripolarizzazione (fase 3) che infine riporta il potenziale al valore di riposo (fase 4).

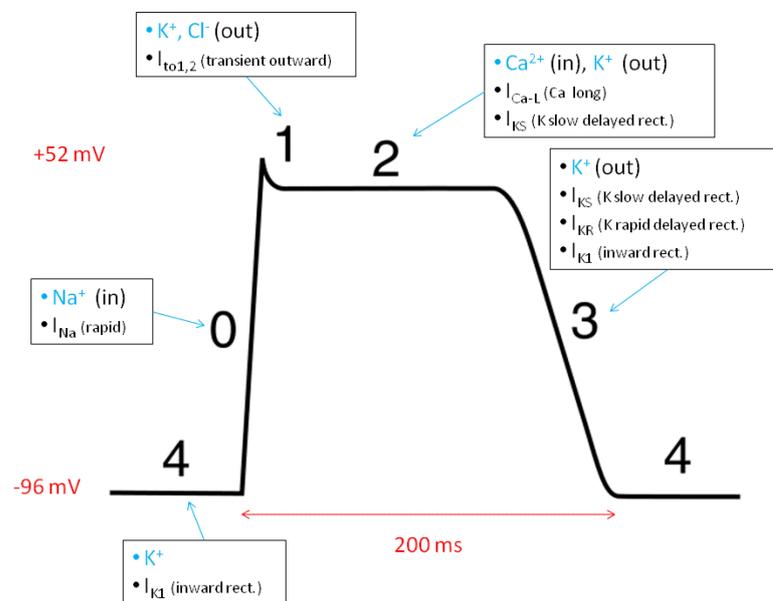


Figura 1.4: Potenziale d'azione ventricolare umano e le principali correnti coinvolte nelle varie fasi [6].

Nella fase 0 lo stimolo sopra soglia attiva i canali Na^+ e il conseguente ingresso di ioni Na^+ all'interno della cellula provoca la veloce depolarizzazione iniziale. Il notch della fase

1 è principalmente causato dall'attivazione di canali del K^+ che genera una corrente "transient outward" (I_{to}) (fig. 1.5C) e ripolarizza brevemente l'AP. Durante la fase di depolarizzazione iniziale si attivano anche i canali L-type di calcio. Essi però hanno un'inattivazione lenta e incompleta, in modo che la I_{CaL} bilanci l'uscita di ioni K^+ e sostenga la fase di plateau (fase 2).

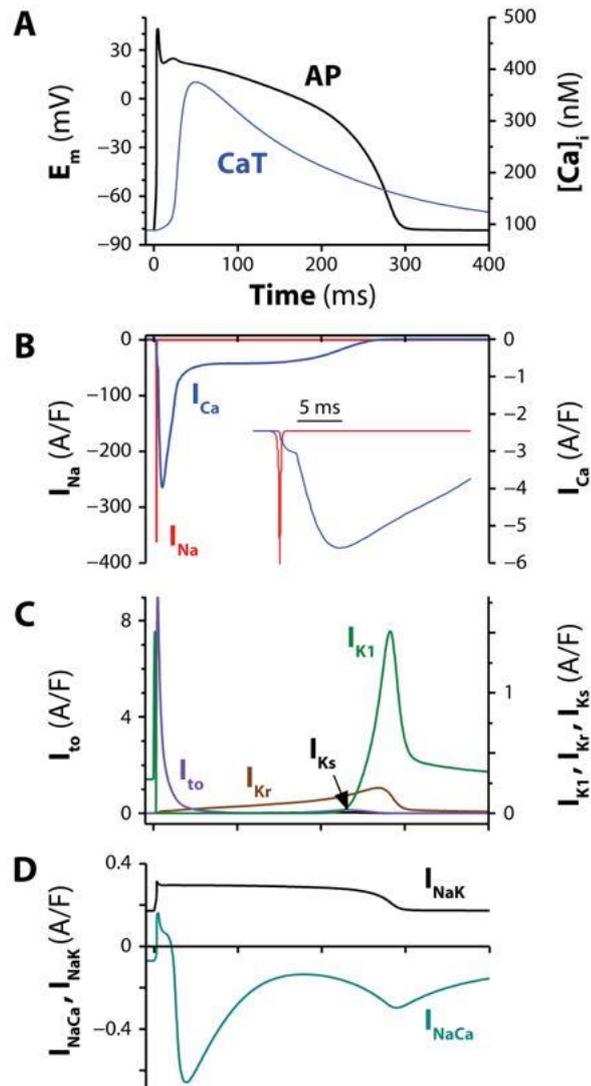


Figura 1.5: Correnti ioniche (figure B,C,D) e transiente di calcio CaT (figura A, linea blu) che generano il potenziale d'azione AP (figura A, linea nera) [7].

Quando la fuoriuscita di ioni K^+ dalla cellula tende a superare il flusso entrante di ioni Ca^{2+} la fase di plateau giunge al termine e ha inizio il processo di ripolarizzazione della membrana (fase 3). Questi flussi inversi sono dovuti all'incremento della conduttanza di K^+ (G_K) e specularmente alla riduzione della conduttanza di Ca^{2+} (G_{Ca}). Lo sbilanciamento

di queste due conduttanze causa un'uscita di K^+ dalla cellula, non più compensato dalle correnti entranti di Na^+ e Ca^{2+} , per cui l'interno della membrana diventa sempre più elettronegativo. L'aumento di G_K è voltaggio-dipendente, per cui la progressiva diminuzione di V_m incrementa la conduttanza e conseguentemente il flusso uscente di ioni K^+ , seguendo un processo autosostenuto a feedback positivo. Nella fase finale del ciclo sono presenti principalmente due meccanismi che favoriscono il ripristino delle condizioni iniziali di V_m . Il primo è la pompa Na^+/K^+ , che espelle l'eccesso di Na^+ entrato nella cellula e contemporaneamente trasporta all'interno il K^+ uscito durante le fasi 2 e 3; nel dettaglio, la pompa Na^+/K^+ trasporta fuori tre ioni Na^+ in cambio di due ioni K^+ . Questo meccanismo genera una corrente netta uscente che contribuisce al mantenimento del potenziale di riposo: anche se in condizioni fisiologiche piccola, questa corrente ripolarizzante aumenta quando la cellula è sovraccarica di Na^+ , ad esempio nel caso di frequenza cardiaca accelerata. L'altra pompa ionica di ripristino è lo scambiatore Na^+/Ca^{2+} , che sposta uno ione Ca^{2+} all'esterno della cellula e tre ioni Na^+ all'interno, sostenendo una piccola corrente uscente durante la sistole ed entrante durante la diastole I_{NaCa} (fig. 1.5D).

1.1.1 Periodo refrattario assoluto e periodo refrattario relativo

L'AP può essere registrato sperimentalmente eccitando la membrana con un impulso di corrente e misurando le conseguenti variazioni di potenziale; se lo stimolo applicato causa una depolarizzazione che supera il valore di soglia si ha la generazione dell'AP. Una volta che questo si è espresso si ha un intervallo di tempo durante il quale non è possibile scatenare un nuovo AP qualunque sia lo stimolo applicato, il periodo refrattario assoluto; questo intervallo parte dalla fase 0 e dura fino alla fase 3 in cui i canali rapidi del Na^+ si riattivano. A questo intervallo segue il periodo refrattario relativo, in cui è possibile generare un nuovo AP ma solo applicando uno stimolo più intenso, perché il valore di soglia risulta maggiore rispetto a quello a riposo; le risposte che si hanno durante questo periodo sono comunque lente e di ampiezza non elevata, perché la conduzione è più lenta. Progressivamente se lo stimolo viene applicato successivamente al periodo refrattario relativo la depolarizzazione acquista ampiezza e velocità, in modo proporzionale al recupero di un sempre maggior numero di canali per il Na^+ .

1.1.2 Post-depolarizzazioni

Le post-depolarizzazioni (After-Depolarizations o ADs) sono depolarizzazioni anomale dei cardiomiociti che possono presentarsi durante la fase 2, la fase 3 o la fase 4 del AP cardiaco; la loro insorgenza non dipende da stimoli esterni ma da cause patologiche. Le ADs possono generare due comportamenti distinti: quando la depolarizzazione non raggiunge un'ampiezza tale da superare il valore di soglia, si hanno piccole oscillazioni del potenziale di membrana; quando invece la depolarizzazione è sufficientemente ampia, si genera un nuovo AP che necessita di un innesco (trigger) ovvero una depolarizzazione prematura a monte. Questi APs propagati sono di particolare interesse clinico poiché possono causare pericolose aritmie cardiache. Le ADs si differenziano in:

- Post-depolarizzazioni precoci (Early After-Depolarizations o **EADs**), che insorgono durante le fasi 2 e 3 dell'AP (plateau e ripolarizzazione). Dal punto di vista elettrofisiologico possono essere causate da una riattivazione della corrente di $Ca^{2+} I_{CaL}$ e/o dal rilascio spontaneo di Ca^{2+} da parte del reticolo sarcoplasmatico (nella fase 2 di plateau) o indotte dalla diminuzione della conduttanza del K^+ , con conseguente riduzione dell'intensità della corrente I_{K1} (nella fase 3 di ripolarizzazione). L'ipokaliemia, ovvero la carenza di K^+ nel sangue, e la bradicardia favoriscono l'insorgenza delle EADs, le quali possono causare una seria patologia, la sindrome del QT lungo: in questa sindrome la durata dell'AP è superiore a quella fisiologica e l'aumento della stimolazione adrenergica (durante l'attività sportiva o in risposta ad un forte stimolo emotivo) può portare al manifestarsi delle EADs, a causa dell'amplificarsi della corrente entrante I_{CaL} . Tale aritmia può innescare una fibrillazione ventricolare (VF).
- Post-depolarizzazioni tardive (Delayed After-Depolarizations o **DADs**) si generano in prossimità del potenziale di riposo (fase 4 dell'AP), quando la ripolarizzazione è completa ma prima che un battito avvenga secondo lo specifico sistema di conduzione del paziente. Sono espressione del sovraccarico di Ca^{2+} nel cardiomiocita, che genera un rilascio di Ca^{2+} dal SR. Questo rilascio viene captato dalla pompa Na^+/Ca^{2+} che genera una corrente netta entrante, che

depolarizza la cellula e il risultato è un'extrasistole. Tipicamente causate da intossicazione di digitalici, queste aritmie sono causa di tachicardia ventricolare bidirezionale.

1.1.3 Circuiti di rientro e rotori

In condizioni normali lo stimolo depolarizzante viaggia in maniera unidirezionale all'interno del muscolo cardiaco. Esistono però delle condizioni, patologiche e non, in cui l'impulso può tornare indietro lungo una via di conduzione in cui trova tessuto eccitabile pronto ad essere depolarizzato. Si ponga ad esempio che lo stimolo incontri sul suo percorso un ostacolo, che può essere una cicatrice post-infarto o più semplicemente una fibra del Purkinje che si sdoppia e poi si ricongiunge a valle nello stesso percorso. L'onda di depolarizzazione si biforca, viaggiando in entrambe le direzioni, fino ad arrivare al punto in cui il circuito si chiude, le due onde si incontrano, si cancellano a vicenda e la stimolazione prosegue lungo la via comune. Il circuito di rientro può formarsi se lungo una delle due vie è presente un blocco di conduzione unidirezionale in cui l'impulso possa viaggiare in maniera retrograda (ma non ortograde) e se, una volta uscito dalla zona di blocco, trova il tessuto circostante pronto per essere depolarizzato, "rientrando" nella prima via di conduzione e generando un percorso circolare di impulsi ad alta frequenza (tachiaritmia) che inizia a viaggiare attraverso il cuore a mo' di vortice (rotore).

1.2 Il ciclo intracellulare del calcio

La concentrazione intracellulare di Ca^{2+} ha un ruolo predominante per le cellule cardiache poiché è proprio questo ione a garantire la funzione contrattile del cardiomiocita attraverso l'accoppiamento eccitazione-contrazione. Quando un AP proveniente da una cellula adiacente si propaga nella membrana di una cellula a riposo, questo causa l'apertura di canali voltaggio-dipendenti per il Ca^{2+} presenti nel sistema T dei tubuli trasversali, ovvero i canali L-type; l'apertura di questi canali determina il rilascio di Ca^{2+} in un ambiente ristretto del citoplasma in cui sarcolemma e reticolo sarcoplasmatico (SR) sono estremamente vicini, chiamato spazio diadico: qui il Ca^{2+} si

lega ai recettori della Rianodina (RyRs), particolari molecole presenti nella membrana del SR, innescando un ulteriore rilascio di Ca^{2+} dalle cisterne terminali del SR nel citoplasma: questo meccanismo è denominato rilascio di calcio indotto dal calcio (Calcium-Induced Calcium Release o CICR) (fig. 1.6).

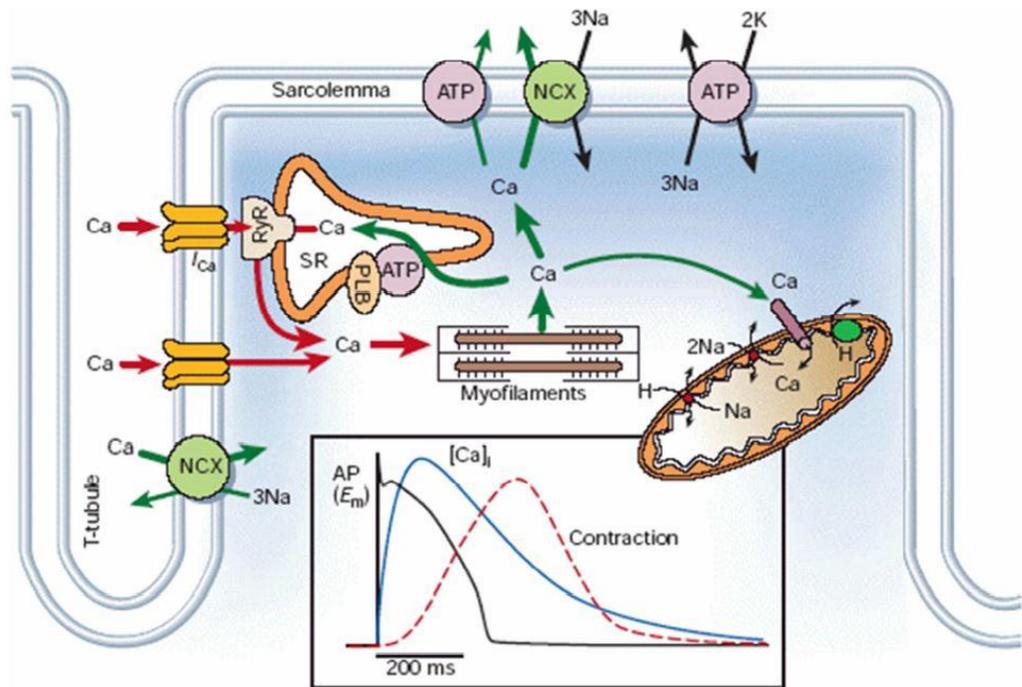


Figura 1.6: Schema del ciclo del calcio in un miocita. In basso si possono notare gli andamenti dell'AP, del transiente di calcio e della contrazione muscolare (Bers et al., 2002) [8].

Il sistema possiede un alto guadagno, poiché il Ca^{2+} rilasciato dal SR è in concentrazione notevolmente maggiore rispetto a quello fluito nello spazio diadico tramite i canali L-type. Il Ca^{2+} agisce attivamente nell'interazione dei filamenti di actina-miosina. Queste due proteine delle cellule muscolari scorrendo l'una sull'altra causano la contrazione in seguito al loro legame con la troponina, una proteina anch'essa coinvolta nell'accoppiamento eccitazione-contrazione. Successivamente allo scorrimento dei filamenti sottili di actina sui filamenti spessi di miosina, con conseguente accorciamento del sarcomero, si ha il riaccumulo di Ca^{2+} all'interno del SR mediante trasporto attivo ad opera della pompa SERCA (Sarco/Endoplasmatic Reticulum Calcium ATPase); il Ca^{2+} quindi diffonde nelle cisterne del SR, dove viene immagazzinato fino all'arrivo di un nuovo AP. Non appena la concentrazione di Ca^{2+} all'esterno del reticolo si è sufficientemente abbassata, l'interazione chimica fra actina e miosina cessa e il muscolo

si rilassa (fase di diastole). Il Ca^{2+} ancora presente in eccesso nel citoplasma viene estruso dalla cellula mediante particolari trasportatori, tra cui la pompa $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, che scambia uno ione Ca^{2+} con tre di Na^+ . La concentrazione di Na^+ verrà ripristinata tramite la pompa Na^+/K^+ , che espelle dalla cellula tre molecole di Na^+ e pompa all'interno due molecole di K^+ : si ha così il ripristino delle concentrazioni ioniche iniziali, fino all'arrivo di un nuovo AP che riavvia il ciclo.

Capitolo 2

Le alternans cardiache

Il termine "*cardiac alternans*" si riferisce ad una condizione in cui, a frequenza cardiaca costante, si osservano oscillazioni periodiche tra un battito e l'altro nell'attività elettrica e nella contrazione del muscolo cardiaco. Il primo caso di alternans cardiaca come segnale clinico di una condizione patologica, registrato in forma di oscillazioni della pressione sanguigna (pulsus alternans), è datato 1872 [9] in un paziente con cardiomiopatia derivante da eccessivo consumo di bevande alcoliche che morì due mesi dopo la prima visita. A livello elettrocardiografico, la sua condizione venne successivamente descritta come anomalia dell'onda T (T-wave alternans). Soltanto negli anni 90 alcuni studi clinici [10,11] hanno dimostrato che esiste un legame tra alternans cardiache, nella forma di T-wave alternans, e l'insorgere di ulteriori fenomeni aritmici come la fibrillazione ventricolare o episodi di morte cardiaca improvvisa (sudden cardiac death o SCD).

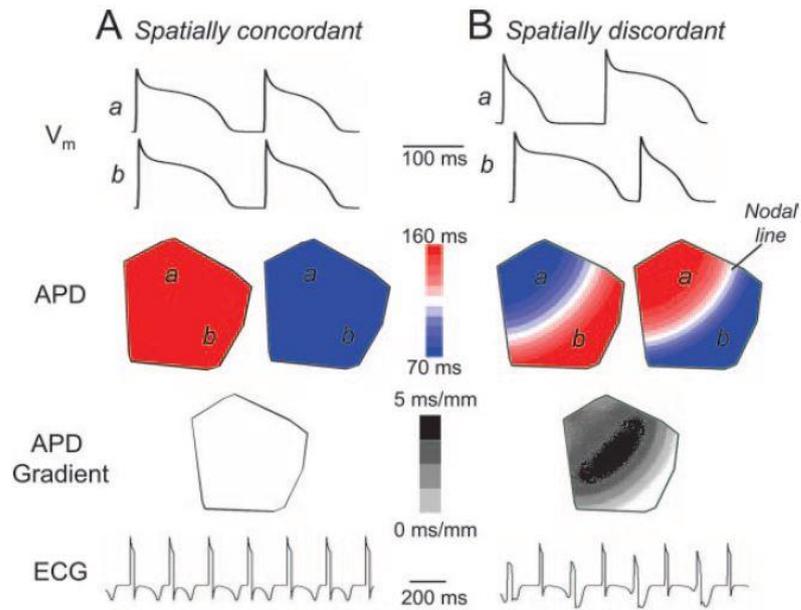


Figura 2.1: Alternans concordanti (A) e discordanti (B). In alto vengono mostrati gli APs simulati in due siti *a* e *b* di un modello 2D di tessuto cardiaco semplificato (CL=220 ms). Si nota come la linea nodale appaia solo in caso di alternans discordanti e come il gradiente di APD, misurato in scala di grigi, sia più elevato rispetto al caso in cui si hanno alternans concordanti. In basso vengono mostrati i tracciati elettrocardiografici simulati, in cui si vedono le alternans dell'onda T [12].

A livello di singola cellula, le alternans cardiache consistono in un'alternanza tra un battito e l'altro della contrazione muscolare (***mechanical alternans***), in oscillazioni nella durata del potenziale d'azione (***APD alternans***) e nell'ampiezza del transiente di Ca^{2+} (***Ca}^{2+} \text{ alternans}***) ad una frequenza di stimolazione costante. Tipicamente le alternans si manifestano a frequenze elevate, ma la soglia di onset varia a seconda di determinate condizioni fisiopatologiche e della specie animale in esame. Questa condizione si riflette a livello tissutale dando origine a due possibili scenari: alternans concordanti (*spatially concordant*, fig. 2.1A) o discordanti (*spatially discordant*, fig. 2.1B). Nel primo caso tutte le regioni del tessuto hanno lo stesso pattern di alternans lungo-corto-lungo o corto-lungo-corto a livello di APD o di transiente di Ca^{2+} , mentre nel secondo alcune regioni seguono un pattern sfasato rispetto ad altre creando una linea di demarcazione (*nodal line*) che le divide ed in cui non è presente alcun tipo di alternans. Lungo questa linea i gradienti di APD e transiente di Ca^{2+} raggiungono il loro massimo favorendo un blocco di conduzione dello stimolo. In caso di alternans discordanti la dispersione della refrattarietà all'interno del tessuto raggiunge un grado molto più alto rispetto alle

alternans concordanti, creando il substrato necessario all'instaurarsi di un circuito di rientro dello stimolo che in seguito può degenerare in VF.

2.1 Meccanismi delle alternans cardiache: “negative coupling” e “positive coupling” tra Ca^{2+} e potenziale di membrana V_m

La letteratura presente attualmente sulle alternans evidenzia chiaramente come il fenomeno sia multifattoriale. Uno tra i fattori più importanti è sicuramente la stretta correlazione fra instabilità nel ciclo del Ca^{2+} intracellulare e instabilità nel potenziale di membrana (V_m). Un esempio di questo accoppiamento potrebbe essere la depolarizzazione, in forma di AP, richiesta per l'attivazione del CICR e l'aumento della concentrazione interna di calcio ($[Ca^{2+}]_i$) che a sua volta influenza V_m tramite l'attività di canali ionici sensibili al Ca^{2+} . A questo punto la domanda più spontanea sarebbe: le alternans cardiache insorgono a causa delle instabilità in V_m o nel ciclo del calcio? Un enigma del tipo “uovo o gallina” che necessita ancora di essere risolto.

2.1.1 Coupling $V_m \rightarrow [Ca^{2+}]_i$

Le alternans indotte da V_m sono determinate da un singolo meccanismo: l'APD restitution, ovvero la relazione tra APD al battito n -esimo e intervallo diastolico (diastolic interval o DI) al battito $(n-1)$ -esimo. La frequenza cardiaca è inversamente proporzionale alla lunghezza di ciclo (cycle length o CL) calcolato come:

$$CL = APD_n + DI_n$$

Quando la frequenza cardiaca cresce, l'APD e ancor di più il DI si accorciano. Nel lavoro di Nolasco e Dahlen del 1968 [14], si dimostra che le APD alternans insorgono per valori di pendenza della curva di APD restitution maggiori di 1 ad un dato CL. In Figura 2.1 viene mostrata una tipica curva di APD restitution, per cui si ha:

$$APD_{n+1} = f(DI_n)$$

dove f è la funzione che lega il nuovo APD al DI precedente. La relazione $CL = APD_n + DI_n$ è rappresentata da una retta con pendenza -1 che interseca la curva in un punto di equilibrio. Se esso è stabile, le APD alternans non insorgono. Viceversa, se questo punto è instabile si generano APD alternans. La stabilità locale può essere valutata perturbando il DI con una quantità infinitesima δ ottenendo:

$$DI_{n+1} = DI_n + \delta$$

Graficamente, per un valore negativo di δ (accorciamento DI), DI_{n+1} si sposta in un punto (indicato dalla stella) a sinistra rispetto al punto di equilibrio.

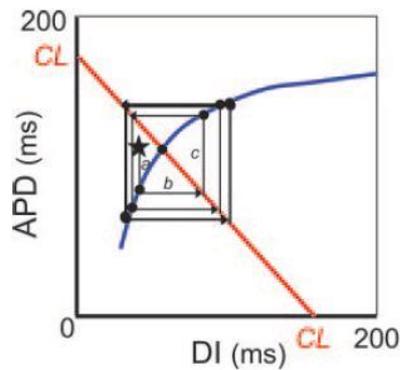


Figura 2.2: Grafico di restitution che mostra l'insorgere di APD alternans indotto da una pendenza della curva >1 . La linea blu è la curva di restitution, la linea rossa è la retta data da $CL = APD + DI$ [12].

Il DI più corto sarà quindi seguito da un APD più corto il cui valore è determinato tracciando una linea verticale fino all'intersezione con il grafico di restitution (a). Questo APD più corto a sua volta genererà un DI più lungo, che può essere determinato tracciando una linea orizzontale fino all'intersezione con la retta del CL (b). Questo DI più lungo a sua volta produrrà un APD più lungo (c), e così via. In questa situazione, la conduttanza della corrente I_{CaL} gioca un ruolo fondamentale nella determinazione delle APD e delle Ca^{2+} alternans. Quando si verificano delle instabilità nell'AP (pendenza >1) si verificheranno ugualmente delle instabilità nel transiente di Ca^{2+} che alternerà esattamente come alterna la conduttanza della corrente I_{CaL} in risposta alle alternans del potenziale di membrana. Questo tipo di analisi delle APD alternans presenta però dei limiti importanti quando viene applicata allo studio del tessuto cardiaco, principalmente

perché i meccanismi cellulari e molecolari di APD restitution e APD alternans sono multifattoriali. L'assunto che l'APD sia sola funzione del DI precedente è una semplificazione estrema, dal momento che anche la storia di stimolazione è importante ai fini dell'analisi. La storia di stimolazione e la memoria cardiaca a breve termine (detta anche *APD accommodation*) influenzano fortemente ed in maniera dinamica tutti i meccanismi ionici all'interno della cellula, andando a creare una situazione totalmente diversa da quella che si avrebbe in una cellula a riposo, e devono quindi essere presi in considerazione.

2.1.2 Coupling $[Ca^{2+}]_i \rightarrow V_m$

Questo accoppiamento è dovuto al fatto che squilibri nella $[Ca^{2+}]_i$ influenzano V_m tramite la dipendenza dal Ca^{2+} di canali ionici e pompe presenti sulla membrana cellulare. Due tra i principali protagonisti sono i canali L-type Ca^{2+} e la pompa Na^+/Ca^{2+} . Il coupling può essere fuori fase (negativo) o in fase (positivo) a seconda di quale meccanismo Ca^{2+} -dipendente domina sull'altro. Ad esempio, un accoppiamento positivo si verifica quando un transiente di Ca^{2+} più ampio provoca un allungamento dell'APD tramite il potenziamento della corrente entrante data dallo scambiatore Na^+/Ca^{2+} in misura maggiore rispetto all'inattivazione Ca^{2+} -dipendente dei canali L-type, che provoca un accorciamento dell'APD tramite una riduzione della corrente I_{CaL} . Dal momento che recenti esperimenti in voltage clamp hanno dimostrato che le alternans del $[Ca^{2+}]_i$ avvengono anche in regime di stimolazione a forma d'onda costante, sorge il dubbio se le alternans siano legate a dinamiche del potenziale di membrana V_m o del ciclo intracellulare del Ca^{2+} . La letteratura suggerisce che l'insorgere delle alternans sia legata più al secondo aspetto che al primo [2,12,18,27], dato che molti esperimenti in single cell e tessuto hanno mostrato che le alternans insorgono per valori della pendenza della curva di restitution < 1 . Due parametri fondamentali nella generazione delle " $[Ca^{2+}]_i$ -driven" alternans sono:

- La frazione di Ca^{2+} rilasciata dal SR
- L'efficienza dell'assorbimento del Ca^{2+} citosolico

La frazione di Ca^{2+} rilasciata si riferisce ad una relazione non lineare (fig. 2.3A) fra il contenuto in Ca^{2+} del SR a fine diastole e l'ammontare di Ca^{2+} (espresso come percentuale del contenuto di Ca^{2+} del SR) rilasciato tramite il meccanismo di CICR ad ogni battito (più Ca^{2+} rilasciato quando la quantità di Ca^{2+} all'interno del SR è maggiore). Il riassorbimento di Ca^{2+} all'interno del SR dipende a sua volta da:

- L'attività della pompa SERCA che riporta il Ca^{2+} all'interno del SR
- Lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e la pompa Ca^{2+} -ATPase
- Buffer del Ca^{2+} all'interno del cytosol
- La corrente di perdita Ca^{2+} dal SR durante la diastole

In generale, i fattori che incrementano la frazione di rilascio di Ca^{2+} dal SR favoriscono le alternans, mentre quelli che aumentano l'efficienza del riassorbimento di Ca^{2+} dal citoplasma al SR sopprimono le alternans. In presenza di infarto o di ischemia, ad esempio, si assiste a squilibri nel ciclo intracellulare del Ca^{2+} tramite un rilascio incontrollato da parte del SR ed un'efficienza ridotta nell'attività della pompa SERCA che spingono la cellula cardiaca verso l'instabilità.

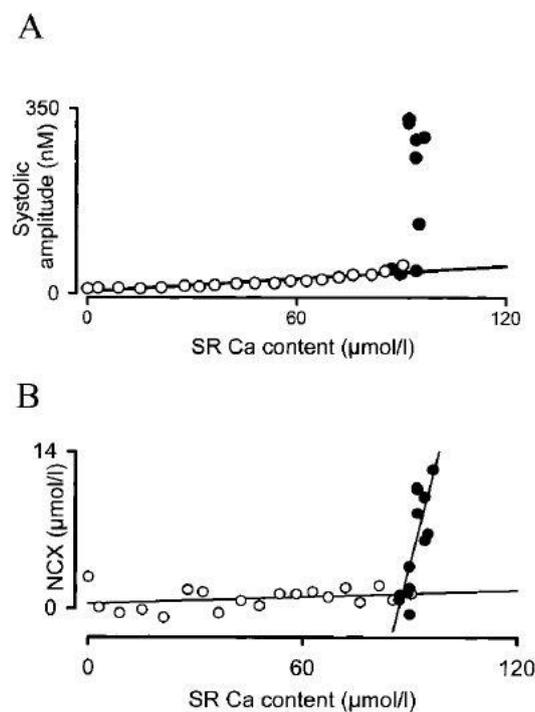


Figura 2.3: (A) Dipendenza tra il contenuto di Ca^{2+} del SR e l'ampiezza del transiente. (B) Dipendenza tra il contenuto di Ca^{2+} del SR e corrente uscente dello scambiatore NCX. Da Diaz et al. [29]

La fig. 2.3A mostra la funzione non lineare che lega l'ampiezza del transiente di Ca^{2+} al contenuto di Ca^{2+} del SR. Durante un episodio di alternans (cerchi pieni) si vede che la funzione ha una pendenza molto maggiore rispetto a quando non si verificano le alternans (cerchi vuoti) per cui si ha una funzione più "liscia". Un aumento nel contenuto di Ca^{2+} del SR favorisce un transiente più ampio che a sua volta favorirebbe una corrente uscente dallo scambiatore NCX maggiore. Questo meccanismo a feedback positivo serve a tenere sempre sotto controllo il contenuto di Ca^{2+} del SR. Come spesso accade però in un simile processo un eccessivo aumento del guadagno (pendenza della funzione) porta all'insorgere di instabilità. In questo caso, piccole variazioni nel contenuto di Ca^{2+} del SR provocano transienti di Ca^{2+} più elevati attraverso la membrana cellulare portando a forti fluttuazioni nel Ca^{2+} contenuto nel SR che portano all'instabilità.

2.2 Interazioni tra “ V_m -driven instabilities” e “[Ca^{2+}]_i-driven instabilities”

Dal momento che il potenziale di membrana e il transiente di calcio si influenzano a vicenda è interessante studiare le dinamiche di interazione fra le instabilità introdotte nella cellula dalle fluttuazioni di questi due elementi. Si supponga ad esempio che entrambi gli accoppiamenti ($V_m \rightarrow [\text{Ca}^{2+}]_i$ e $[\text{Ca}^{2+}]_i \rightarrow V_m$) siano positivi, ovvero che un APD più lungo produca un transiente di Ca^{2+} più alto e che a sua volta un transiente di Ca^{2+} alto produca un APD più lungo. In questo caso, come mostrato da Shiferaw [18], quello che si scatena è un'alternans elettromeccanica positiva in cui un APD lungo corrisponde ad un transiente alto ed un APD corto ad un transiente basso, a prescindere da quale sia il parametro di instabilità dominante (V_m o $[\text{Ca}^{2+}]_i$). In caso di coupling negativo, cioè quando ad esempio un APD lungo produce un transiente alto ma un transiente alto produce un APD corto, esistono invece tre scenari di instabilità: (1) alternans elettromeccanica positiva, ma solo se comandata dal voltaggio, (2) alternans elettromeccanica negativa con un APD lungo corrispondente ad un transiente di Ca^{2+} basso e viceversa quando l'instabilità è dominata dal Ca^{2+} , e (3) oscillazioni quasi-periodiche di APD e transiente di Ca^{2+} che fluttuano in ampiezza e grado fra entrambi i

coupling positivo/negativo quando le due instabilità sono più equamente bilanciate. Questi cosiddetti “*quasiperiodic patterns*” [12,18] sono stati osservati in esperimenti su fibre del Purkinje, ovvero le principali responsabili della corretta trasmissione dell’onda di depolarizzazione all’interno del miocardio ventricolare. Nel 2017 Kennedy et al. [30] conducono uno studio nel quale l’attenzione si focalizza in particolare su una corrente ionica sensibile al Ca^{2+} il cui ruolo nella generazione delle alternans non è ancora del tutto chiaro: la corrente di K^+ a rettificazione lenta (I_{Ks}). Viene inoltre inserita, in accordo con recenti dati sperimentali, la modellazione di una corrente di K^+ a bassa conduttanza sensibile al Ca^{2+} chiamata I_{SK} . Simulando a BCL=300 ms si è visto che senza l’introduzione della I_{SK} si generavano delle alternans accoppiate positivamente, a prescindere da quale fosse il meccanismo scatenante (V_m o $[Ca^{2+}]_i$). Alzando la conduttanza di questa corrente appaiono invece i tre modi di oscillare del sistema descritti poco prima (alternans positive, negative e oscillazioni quasi-periodiche). La stabilità subisce un ulteriore cambiamento regolando l’affinità di tale corrente con il Ca^{2+} per mezzo di un parametro inserito nella formulazione della variabile di gating della I_{SK} : quando questa affinità è alta la corrente I_{SK} tende ad accorciare sia l’APD corto che quello lungo, a prescindere dall’ampiezza del transiente di Ca^{2+} , quando l’affinità viene abbassata I_{SK} tende ad accorciare l’AP soltanto quando l’ampiezza del transiente di Ca^{2+} è sufficientemente alta, promuovendo un coupling negativo. Dei risultati simili sono stati ottenuti per I_{Ks} , altra corrente nella cui formulazione è stata implementata una dipendenza dal Ca^{2+} intracellulare. Quando la conduttanza di questa corrente viene abbassata si generano delle alternans accoppiate positivamente, mentre aumentando la conduttanza del 300% si osservano i tre modi di oscillare. Più precisamente, quando la conduttanza viene dimezzata si osserva un coupling positivo, mentre quando viene triplicata quello che si osserva è uno shift verso un coupling negativo. In conclusione, se le alternans sono indotte da instabilità nel ciclo del Ca^{2+} l’incremento della conduttanza di I_{Ks} o di I_{SK} scatena nel sistema delle alternans accoppiate negativamente. Quando invece le alternans sono indotte da instabilità nel V_m le alternans rimangono accoppiate positivamente a prescindere da qualsiasi incremento nelle conduttanze di I_{Ks} e I_{SK} .

Capitolo 3

Le alternans nel cuore umano

I dati sperimentali presenti attualmente in letteratura sulle alternans nel cuore umano sono ancora molto pochi. Per poter condurre studi mirati e che facciano chiarezza sui fattori scatenanti il fenomeno servirebbero dei dati difficili da reperire, principalmente per questioni pratiche. Quasi tutti gli studi sull'uomo prevedono l'acquisizione dei dati da cuori intatti, mentre sarebbe molto utile avere delle informazioni a livello subcellulare. Uno dei primi studi è stato quello condotto da Koller et al. [1] nel 2005. In esso un totale di 36 pazienti, di cui 12 con cuore sano e 24 con danno cardiaco strutturale (structural heart disease o SHD), è stato sottoposto a studio elettrofisiologico. L'ipotesi iniziale è che le proprietà elettriche di restitution e di APD alternans differiscano tra un cuore sano e un cuore malato e dal momento che al tempo gli unici studi coinvolgevano, sia negli animali che nell'uomo, solo cuori sani e che tipicamente la fibrillazione ventricolare insorge nel cuore malato si è pensato di confrontare queste due macrocategorie per indagarne le differenze. I potenziali d'azione sono stati prelevati dall'endocardio del ventricolo sinistro tramite catetere inserito per via trans-femorale. La relazione di APD restitution è stata ricavata plottando l'APD misurato al 95% della ripolarizzazione (APD_{95}) in funzione del DI precedente. Sono stati utilizzati due protocolli di stimolazione: S1S2 e il protocollo dinamico (detto anche Koller protocol). Nel primo si stimola la cellula con un treno di 10 impulsi (S1) ad un CL di 500 ms per poi stimolare con un secondo impulso (S2) riducendo progressivamente l'intervallo S1-S2 da 500 a 300 ms con passo di 20 ms e da 300 ms fino al periodo refrattario con passo di 10 ms. APD_{95} e il DI precedente sono determinati per ogni singolo stimolo S2.

Per quanto riguarda il protocollo dinamico, si stimola ad un CL per 30 secondi, con una pausa di ulteriori 30 secondi tra una sequenza e l'altra. La frequenza di stimolazione di ogni treno di impulsi è stata incrementata di 10 bpm per volta, partendo da 100 bpm fino ad un massimo di 240 bpm. Per le frequenze oltre i 200 bpm la durata di

stimolazione è stata ridotta da 30 a 15 secondi per minimizzare il malessere provocato nel paziente. Per generare la curva di restitution del protocollo dinamico sono stati misurati APD₉₅ e il DI precedente per l'ultimo AP generato dalla sequenza di stimolazione ad ogni CL.

Dalle curve di restitution ottenute con il protocollo dinamico emerge subito una netta differenza tra i soggetti sani (no SHD) e quelli malati (SHD); la porzione in cui la curva assume pendenza elevata è shiftata verso DIs più lunghi nei malati rispetto ai sani (fig. 3.1). In condizione di tachicardia ventricolare (VT), è stata osservata APD alternans nelle regioni di curva con pendenza \geq 1, ma non nelle regioni a pendenza $<$ 1. Il protocollo di Koller restituisce una funzione che rappresenta bene ciò che accade a livello dinamico/elettrico in una cellula cardiaca durante un evento di VT. Ad elevati CLs questi episodi possono degenerare in VF tramite lo spostamento sul grafico di restitution in una porzione di curva a DIs più corti, quindi a pendenza maggiore, favorendo le alternans e quindi fenomeni di rientro che infine possono sfociare in VF. I risultati suggeriscono quindi che i farmaci che appiattiscono la curva di restitution nell'intervallo di DIs in esame possano diminuire la magnitudo delle alternans fino a farle cessare.

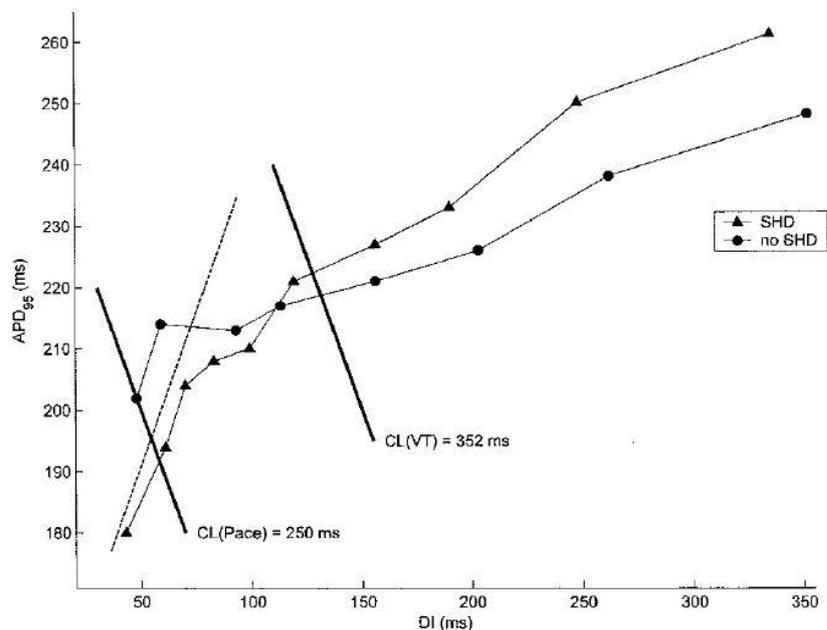


Figura 3.1: Curve di dynamic restitution: no SHD (●), SHD (Δ). La linea tratteggiata rappresenta la retta identità (pendenza=1), le linee piene rappresentano una il CL di stimolazione massimo (250 ms) e l'altra il CL che genera una tachicardia ventricolare (352 ms) [1].

Nel 2016 Zhou et al. [27] conducono uno studio in cui vengono inizialmente ricavati dati sperimentali dall'epicardio di 41 cuori umani. Di questi, 31 avevano subito un intervento di bypass aorto-coronarico, 6 un trapianto di valvola aortica e 4 entrambe le cose (bypass+valvola aortica). I segnali sono stati acquisiti da entrambi i ventricoli con un set di 240 elettrodi posti in altrettanti siti dell'epicardio. Il protocollo di stimolazione ha previsto un range di 6 frequenze di stimolazione, da CL = 600 ms a CL = 350 ms in step da 50 ms. Dagli elettrocardiogrammi sono stati successivamente ricavati gli "activation recovery intervals" (ARIs), un surrogato in vivo dell'APD, come l'intervallo fra il punto a derivata minima durante la fase di depolarizzazione e il punto a derivata massima durante la fase di ripolarizzazione (fig. 3.2).

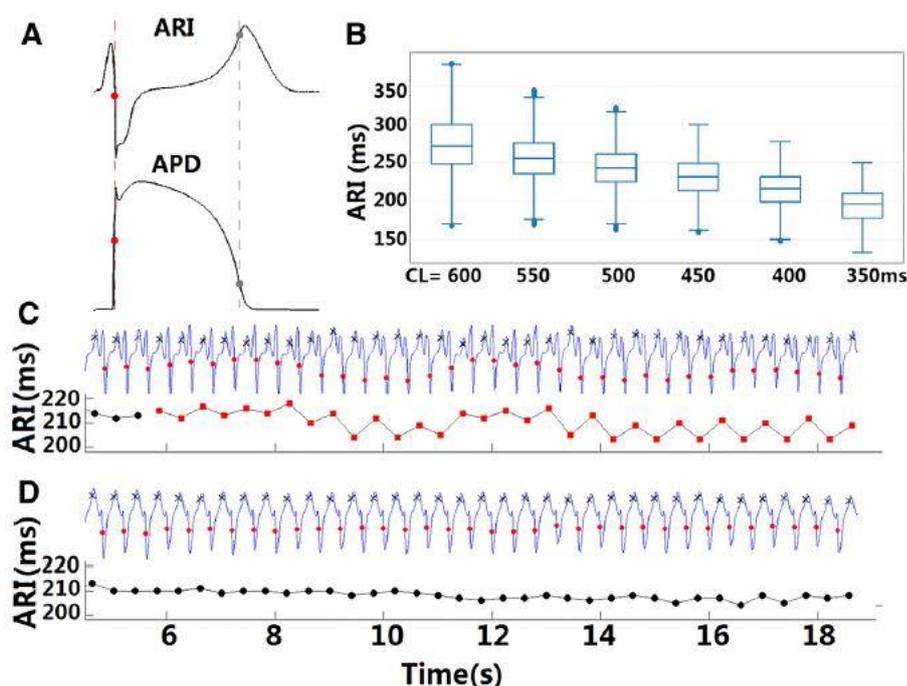


Figura 3.2: (A) Activation recovery interval (ARI) come surrogato in vivo dell'APD. I pallini rossi mostrano l'istante di attivazione/depolarizzazione, i pallini grigi quelli di recovery/ripolarizzazione. (B) Rate dependence degli ARIs per le diverse frequenze di stimolazione utilizzate. (C) Traccia elettrografica prelevata da un sito in cui si verificano alternans. (D) Sito resistente alle alternans. Da Zhou et al. [27].

La fig. 3.2 mostra che, oltre ad esserci evidente rate dependence e variabilità degli ARIs ai diversi CLs di stimolazione, esistono dei siti all'interno dell'epicardio che sono più propensi allo sviluppo delle APD alternans, a differenza di altri che invece appaiono

“resistenti” alle alternans. Successivamente è stata costruita una popolazione di modelli in silico di cardiomiociti umani (*population of models*, PoMs) calibrata sui risultati sperimentali ottenuti precedentemente. Un modello in silico tradizionale basato su dati sperimentali riproduce il comportamento (come ad esempio l’AP) di una cellula cardiaca virtuale. In generale nei data sets disponibili in letteratura i dati sono espressi come *media ± deviazione standard* e il modello in silico dovrebbe simulare un dato che appartenga al range sperimentalmente ottenuto. Un modello siffatto ha il beneficio di essere semplice e si rivela un valido strumento per far luce sui meccanismi elettrofisiologici a livello di singola cellula. D’altro canto, un tale approccio ignora totalmente la variabilità che esiste all’interno di una popolazione di cellule proveniente da pazienti o addirittura specie differenti, risultando in una considerevole perdita di informazione. Utilizzando invece una popolazione di modelli in silico (PoMs) si riesce a riprodurre oltre ai dati sperimentali anche la variabilità intra-soggetto a livello dei biomarkers di interesse. Zhou et al. [27] utilizzano come modello base quello di O’Hara-Rudy (2011, [2]) di cui si approfondiranno in seguito gli aspetti salienti. Il primo passo è quello di generare una popolazione random di modelli a partire dal modello scelto inizialmente. Questa fase consiste in un processo di campionamento (*sampling*) dello spazio dei parametri, previa la scelta dei parametri del modello da randomizzare (conduttanze, variabili di gating, etc.). Zhou et al. generano un totale di 10000 modelli attraverso il software Latin Hypercube Sampling (LHS), il quale assicura che l’insieme dei numeri random generati sia rappresentativo della realtà sperimentale ottenuta dai diversi data sets. Una volta fatto questo si calibra questa popolazione di modelli in silico sulla base dei biomarkers sperimentalmente ottenuti, per cui deve essere definito un range di variabilità. Per ogni modello generato, se il dato simulato cade nel range sperimentale allora il modello verrà accettato, altrimenti sarà scartato. Quest’ultima fase costituisce la costruzione di quella che sarà la popolazione calibrata di modelli in silico. Dei 10000 modelli generati 2326 sono stati accettati dopo la calibrazione, di cui 2239 sono indicati come modelli normali e 87 come modelli che generano alternans.

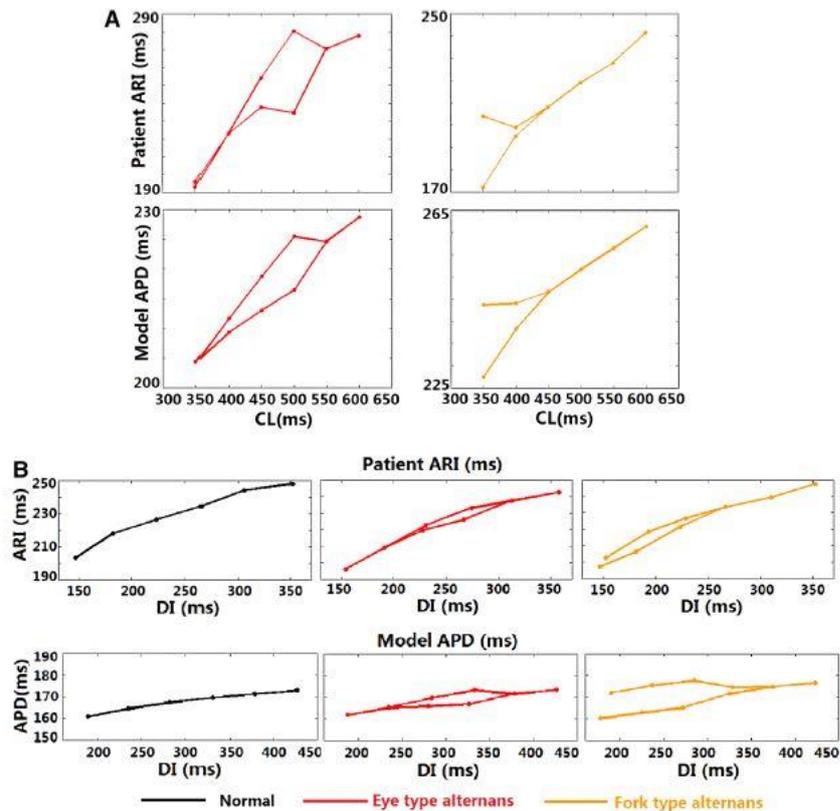


Figura 3.3: (A) Grafici di restitution ottenuti in vivo (in alto) e in silico (in basso) rispetto al CL in cui si notano i due diversi pattern di APD alternans (eye-type e fork-type). (B) Stessi grafici di (A), ma con l'aggiunta della funzione di restitution per un modello normale (no alternans) e graficati rispetto al DI. Da Zhou et al. [27].

In fig. 3.3A sono mostrate in alto le curve di restitution degli ARIs ottenuti sperimentalmente ed in basso quelle ottenute dalle simulazioni. In fig. 3.3B si hanno le stesse curve, stavolta plottate rispetto al DI e con l'aggiunta del grafico di restitution generato da un modello normale, ovvero che non presenta APD alternans. Lo studio rivela due pattern simili di APD alternans in vivo e in silico: "eye-type" APD alternans caratterizzate da una progressiva diminuzione delle alternans a frequenze sempre più elevate e quindi da una curva di restitution avente una biforcazione che piano piano si chiude, e "fork-type" APD alternans che invece sono caratterizzate da un grafico di restitution che mostra un regime di APD alternans stabile con l'aumentare della frequenza. I risultati mostrano che, in vivo e in silico, l'onset delle eye-type APD alternans avviene ad un CL più lungo (frequenza più bassa) rispetto alle fork-type APD alternans (eye-type: CL = 550 ms in vivo e CL = 475 ms in silico, fork-type: CL = 500 ms in vivo e CL = 350 ms in silico). La ragione di CLs così alti rispetto ad esempio al lavoro di

Koller et al. potrebbe risiedere nella scelta da parte di Zhou et al. di prelevare i dati sperimentali esclusivamente da pazienti precedentemente sottoposti a delicati interventi di chirurgia cardiaca. Nel cuore malato infatti si assiste ad una serie di rimodellamenti a livello strutturale che possono esporre il muscolo alle APD alternans per frequenze di stimolazione più basse (CLs più lunghi) che normalmente nel cuore sano non generano APD alternans. Un punto di forza del lavoro di Zhou et al. è invece lo studio del fenomeno tramite la costruzione di una popolazione di modelli in silico, che ha permesso l'individuazione di questo doppio pattern di APD alternans registrato sia in vivo che in silico oltre che gettare luce su quali siano i meccanismi che a livello di singola cellula giocano un ruolo principale nella genesi delle instabilità del potenziale di membrana e del ciclo del Ca^{2+} .

Capitolo 4

Modelli di AP ventricolare

Il cardiomiocita è un sistema biologico complesso in cui interagiscono tra di loro vari meccanismi attraverso il cambiamento dinamico delle concentrazioni ioniche e del potenziale di membrana. Queste interazioni sono inoltre altamente non lineari. Non risulta facile quindi modellare un sistema così ricco e complicato in cui esiste naturalmente un altissimo grado di "sintesi ed integrazione". Un modello non è nient'altro che il frutto di un lavoro di analisi e di sintesi del sistema biologico di interesse, ed una tale operazione non può che beneficiare di un approccio di tipo matematico.

4.1 Cenni storici

Il primo modello computazionale di AP fu quello di Hodgkin e Huxley (H&H) [13], formulato nel 1952. Esso è stato il primo modello a riprodurre la depolarizzazione di una membrana cellulare. Utilizzato come base per moltissimi modelli moderni di neurone e di AP cardiaco, è considerato una pietra miliare nell'ambito della modellazione dei sistemi biologici ed è valso ai due scienziati britannici il Premio Nobel per la Fisiologia nel 1963.

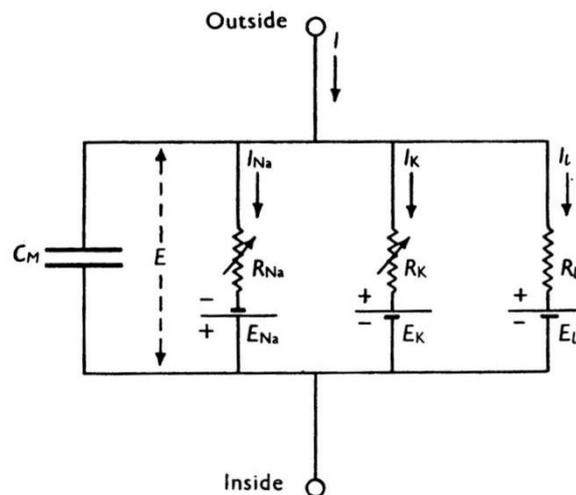


Figura 4.1: Equivalente elettrico del modello di Hodgkin-Huxley [13]. $R_{Na}=1/G_{Na}$, $R_K=1/G_K$, $R_L=1/G_L$, dove G_{Na} , G_K e G_L sono rispettivamente le conduttanze di sodio, potassio e la conduttanza di leakage (perdita). R_{Na} e R_K variano con il tempo e con il potenziale di membrana, le altre componenti rimangono costanti.

In termini di analogo elettrico (fig. 4.1) la membrana cellulare equivale al parallelo tra una capacità C_m e dei rami conduttivi, ove il flusso ionico avviene in funzione del potenziale di membrana V_m ; tali rami sono caratterizzati da conduttanze varianti nel tempo e con valore dipendente dal potenziale ai capi della membrana. La tecnica di modellazione di H&H supponeva che il passaggio degli ioni attraverso la membrana permeabile fosse governato da meccanismi in base ai quali entità distinte (*gates*) regolavano in modo diverso i flussi di Na^+ e K^+ , funzionando da cancelli per l'ingresso degli ioni. Per la corrente di K^+ la condizione del gate definiva due stati funzionali: uno corrispondente allo stato di apertura ed uno corrispondente allo stato di chiusura, mentre per la corrente di Na^+ la condizione di due gates definiva tre diversi stati

funzionali: uno stato chiuso, uno stato aperto e uno stato refrattario (inattivato). Nel modello le conduttanze di K^+ e Na^+ sono espresse dalle seguenti equazioni:

$$G_K = G_{Kmax} \cdot n^4$$

$$G_{Na} = G_{Namax} \cdot m^3 \cdot h$$

dove G_{Kmax} e G_{Namax} sono i due valori (costanti) di conduttanza massima rispettivamente per il K^+ e per il Na^+ , mentre n , m e h sono delle variabili di gating non lineari e tempo-varianti che riproducono le dinamiche dei canali ionici in esame; in particolare, n è la variabile di attivazione del canale del K^+ , mentre m e h sono rispettivamente la variabile di attivazione e la variabile di inattivazione del canale del Na^+ . Tali formulazioni sono state introdotte da H&H dopo aver condotto esperimenti sull'assone gigante di calamaro in condizioni di blocco di voltaggio (*voltage-clamp*), una tecnica elettrofisiologica che permette di rilevare correnti anche nell'ordine del pico-Ampere. Prendendo in esame la variabile n , la sua cinetica può essere espressa dalla seguente equazione differenziale:

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n \cdot (1 - n) - \beta_n \cdot n$$

Ragionando sul singolo canale, n esprime la probabilità che un canale del K^+ sia nello stato di apertura, per cui il suo valore sarà compreso tra 0 e 1; analogamente $1-n$ rappresenterà la probabilità che un canale sia nello stato di chiusura. Se prendiamo in esame la totalità dei canali, n esprime la frazione di canali aperti rispetto al numero complessivo. Le variabili α_n e β_n dipendono dal potenziale di membrana V_m e rappresentano rispettivamente i ratei (ovvero le velocità) di transizione dallo stato chiuso ad aperto (α_n) e dallo stato aperto a chiuso (β_n). Per le altre variabili di gating si ha:

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m \cdot (1 - m) - \beta_m \cdot m$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h \cdot (1 - h) - \beta_h \cdot h$$

Utilizzando i tassi di transizione è possibile ricavare l'espressione a regime per le variabili di gating e le relative costanti di tempo (di apertura o di chiusura a seconda della variabile). Prendendo in esame n si può scrivere:

$$\tau_n = \frac{1}{\alpha_n + \beta_n}$$

$$n_{ss} = \frac{\alpha_n}{\alpha_n + \beta_n}$$

$$\frac{dn}{dt} = \frac{(n_{ss} - n)}{\tau_n}$$

dove τ_n è la costante di tempo di apertura dei gates di n e n_{ss} è il valore a regime (*steady-state*) della variabile. Una volta determinate le conduttanze è possibile ricavare l'espressione della corrente relativa allo ione x come:

$$I_x = G_x \cdot (V_m - E_x)$$

dove E_x è il potenziale di Nerst dello ione x e V_m è il potenziale di membrana. L'equazione differenziale che descrive l'analogo elettrico del modello somma i contributi di tutte le correnti ioniche:

$$C_m \cdot \frac{dV_m}{dt} + G_K \cdot (V_m - E_K) + G_{Na} \cdot (V_m - E_{Na}) + G_L \cdot (V_m - E_L) = I$$

dove G_L ed E_L rappresentano rispettivamente la conduttanza di perdita (*leakage*) e il corrispondente potenziale di Nerst. Integrando in un unico sistema le loro descrizioni delle correnti di Na^+ e K^+ , H&H furono in grado di riprodurre l'AP e di spiegare come l'interazione fra queste due correnti portasse alla sua generazione. Nel 1960 Noble [15] sviluppa il primo modello di AP di cardiomiocita adattando il modello di H&H alle cellule delle fibre del Purkinje. Dal momento che all'epoca la corrente I_{CaL} non era ancora stata

scoperta, in questo modello la fase di plateau è sostenuta da una corrente di ioni Na^+ entrante. Il modello dei canali lenti del calcio venne introdotto solo nel 1975 da McAllister [16] e l'idea che un bilancio fra K^+ e Ca^{2+} fosse il responsabile del mantenimento del plateau venne confermata dai primi modelli computazionali nel 1977. I meccanismi del CICR vennero descritti per la prima volta nel modello di Di Francesco e Noble [17] nel 1985. Nel 1994 Luo e Rudy [19] hanno pubblicato un modello di AP ventricolare basato su dati sperimentali prelevati da guinea pig introducendo un compartimento SR intracellulare, la tempo-varianza delle concentrazioni ioniche intracellulari e nuove pompe e scambiatori, utilizzando la formulazione di H&H. Col passare del tempo si è assistito ad un aumento esponenziale delle conoscenze riguardo la struttura, la funzione e le dinamiche dei singoli canali ionici. Appare sempre più chiaro che il collegamento fra ciò che succede a livello molecolare e ciò che si riflette a livello di singola cellula debba necessariamente passare attraverso la costruzione di modelli che incorporino una rappresentazione esplicita degli stati dei singoli canali.

4.2 Modelli Markoviani

In generale un processo stocastico markoviano è un processo aleatorio nel quale la probabilità di transizione che determina il passaggio ad uno stato del sistema dipende unicamente dallo stato immediatamente precedente e non dal come si è giunti a tale stato. Nell'ambito dell'elettrofisiologia cellulare i modelli markoviani sono diagrammi i cui stati rappresentano delle conformazioni dei canali ionici sperimentalmente caratterizzate (aperto, chiuso, inattivato). Questi modelli forniscono un'astrazione delle interazioni molecolari che avvengono nei canali e che spesso dipendono dalla loro stessa configurazione. Questa descrizione della cinetica dei canali ionici è alternativa a quella fornita da H&H, che risultava incapace di riprodurre particolari comportamenti dei canali cellulari. Un esempio dell'utilizzo dei modelli markoviani in ambito cardiaco è quello concepito da Shannon et al. [20] per caratterizzare i recettori della rianodina (RyRs receptors).

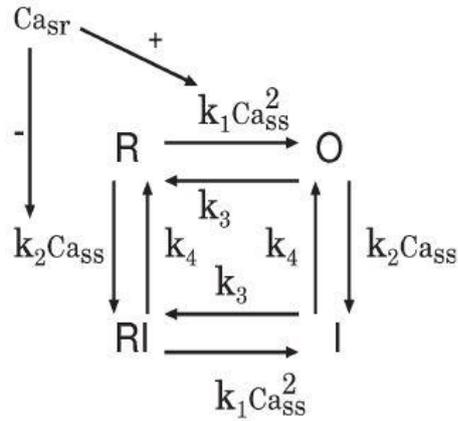


Figura 4.2: Il modello markoviano di Shannon per i RyRs receptors (da Ten Tusscher et al., 2006 [22]).

Il modello markoviano presentato in fig. 4.2 è costituito da quattro stati: *O*, *R*, *I*, *RI*. *O* rappresenta lo stato aperto, *R* quello di riposo, *I* quello inattivato e *RI* riposo inattivato. In ogni passaggio di stato abbiamo inoltre due ratei (velocità) di transizione, uno diretto ed uno inverso. I ratei k_3 e k_4 sono costanti, mentre i ratei k_1 e k_2 dipendono dalla concentrazione di Ca^{2+} all'interno del SR ($[Ca^{2+}]_{SR}$): il rateo di apertura k_1 è velocizzato e il rateo di chiusura k_2 è rallentato da un valore alto di $[Ca^{2+}]_{SR}$. Inoltre k_1 è moltiplicato per il quadrato della concentrazione di Ca^{2+} all'interno del subspace ($[Ca^{2+}]_{SS}$), ovvero una piccola regione interna alla cellula che divide i canali L-type del Ca^{2+} dalle cisterne terminali del SR dove si trovano i recettori RyRs, mentre k_2 è moltiplicato semplicemente per $[Ca^{2+}]_{SS}$: ciò significa che un alto livello di Ca^{2+} nel subspace favorisce più l'apertura dei canali piuttosto che la chiusura. Tale approccio suggerisce come la struttura e le transizioni di un determinato canale ionico governino il suo comportamento e il suo intervento nella propagazione dell'AP. Il formalismo di H&H ipotizza l'indipendenza delle variabili di gating; tuttavia i risultati sperimentali hanno dimostrato che i processi di attivazione ed inattivazione dei canali ionici tipicamente non sono svincolati, ma accoppiati. Le transizioni fra stati sono quindi correlate fra loro e l'ipotesi di gating indipendenti ipotizzata da H&H non può essere applicata. Nel modello markoviano di Shannon il sistema che descrive le configurazioni degli stati dei recettori RyRs è il seguente:

$$\frac{dR}{dt} = (k_4 \cdot RI - k_2 \cdot [Ca^{2+}]_{SS} \cdot R) - (k_1 \cdot [Ca^{2+}]_{SS}^2 \cdot R - k_3 \cdot O)$$

$$\frac{dO}{dt} = (k_1 \cdot [Ca^{2+}]_{SS}^2 \cdot R - k_3 \cdot O) - (k_2 \cdot [Ca^{2+}]_{SS} \cdot O - k_4 \cdot I)$$

$$\frac{dI}{dt} = (k_2 \cdot [Ca^{2+}]_{SS} \cdot O - k_4 \cdot I) - (k_3 \cdot I - k_1 \cdot [Ca^{2+}]_{SS}^2 \cdot RI)$$

$$RI = 1 - R - O - I$$

Il sistema è formato da 3 equazioni differenziali che determinano l'occupazione del canale ionico in uno stato più una quarta configurazione ricavabile come somma algebrica delle altre tre, sotto il vincolo che la somma totale degli stati sia 1, valore che indica la probabilità massima di un canale di trovarsi in una particolare conformazione. Gli stati descritti dalle equazioni differenziali sono calcolabili analogamente ai bilanci delle reazioni chimiche, quindi seguendo lo schema di fig. 4.2 le transizioni entranti in un determinato stato hanno segno positivo, quelle uscenti segno negativo. Il risultato dell'equazione determinerà l'occupazione del canale ionico nella condizione in esame. In base a queste caratteristiche la densità di corrente di uno ione x attraverso un insieme di canali di questo tipo può essere descritta mediante la seguente equazione:

$$I_x = G_x \cdot n \cdot O \cdot (V_m - E_x)$$

dove G_x è la conduttanza del singolo canale, n è il numero di canali per unità d'area della membrana, O è la probabilità che un canale occupi lo stato aperto e $(V_m - E_x)$ è la driving force dello ione in esame. La corrente descritta da questa equazione è il risultato del flusso ionico passante per la popolazione di canali che si trova nello stato aperto, con una probabilità che dipende dal tempo e dal potenziale. Questo tipo di formulazione, relativo ad una singola corrente, può essere facilmente incorporato in un modello di AP cardiaco ed esteso a più categorie di canali.

4.3 Il modello di Ten Tusscher-Panfilov

Negli ultimi 20 anni gli studi atti a comprendere i meccanismi e le dinamiche coinvolte nelle attivazioni dei singoli canali ionici all'interno del cardiomiocita umano hanno beneficiato di una quantità di dati sperimentali prelevati da cellule umane sempre

maggiore. Ciò ha dato vita ad una vasta gamma di modelli. Nel 1998 Priebe e Beuckelmann [24] pubblicarono il primo modello per cardiomiociti ventricolari umani (modello PB). Il loro modello era in gran parte basato sul modello “Luo-Rudy II” per cellule ventricolari di cavia (Luo e Rudy, 1994, [25]) in cui le formulazioni per le principali correnti ioniche sono state adattate ai pochi dati disponibili per le cellule ventricolari umane in quel momento. Questa limitazione è stata superata in una versione ridotta del modello PB proposto da Bernus et al. [26] nel 2002, in cui il numero di variabili è stato ridotto da 15 a 6 riformulando alcune correnti e fissando le concentrazioni ioniche intracellulari. All'inizio del 2004 è stato introdotto il modello di Ten Tusscher, Noble, Noble e Panfilov (modello TNNP, [3,22,23]). Questo modello utilizza nuove formulazioni per tutte le principali correnti ioniche basate su un dataset più ampio, derivato in gran parte da esperimenti su cellule ventricolari umane. Il modello TNNP è stato formulato allo scopo di eseguire simulazioni spaziali su larga scala. Pertanto, è stato costruito per formare un compromesso tra un livello considerevole di dettagli fisiologici ed efficienza computazionale.

Nel 2006 sono state introdotte delle modifiche al modello che coinvolgono principalmente i meccanismi legati al ciclo del Ca^{2+} . Il nuovo modello incorpora sostanzialmente tre novità:

- Una descrizione delle dinamiche del Ca^{2+} nel subspace ($[Ca^{2+}]_{ss}$), nel citoplasma ($[Ca^{2+}]_i$) e nel SR ($[Ca^{2+}]_{SR}$). Sia i canali della I_{CaL} sia quelli dei recettori RyRs rilasciano Ca^{2+} nel subspace, e di conseguenza le dinamiche di queste correnti, sono influenzate dalla $[Ca^{2+}]_{ss}$. La pompa di Ca^{2+} I_{pCa} , la corrente di Ca^{2+} di background I_{bCa} e la corrente generata dallo scambiatore NCX dipendono ancora da $[Ca^{2+}]_i$.
- Una variabile di gating dei canali della I_{CaL} responsabile dell'inattivazione Ca^{2+} -dipendente (f_{Cass}) e una doppia inattivazione voltaggio-dipendente dovuta a due variabili di gating, una lenta (f) e una veloce (f_2). Il rateo di inattivazione di f_2 è più lento di quello di f_{Cass} , ma più veloce di quello di f . Il gate f_2 inoltre non si inattiva mai completamente, a differenza degli altri due. Ciò permette al gate f_2 di superare f_{Cass} durante la fase di inattivazione iniziale, un'azione necessaria

dato che la breve durata del transiente di Ca^{2+} nel subspace ha come conseguenza il recovery della f_{CaSS} durante l'AP.

- Una versione ridotta del modello markoviano ideato da Shannon (fig. 4.2), di cui si è parlato nel paragrafo precedente, per descrivere l'attività dei recettori RyRs e il fenomeno del CICR. Si può vedere come il modello incorpori l'influenza sia della concentrazione di Ca^{2+} all'interno del subspace cellulare (il trigger) sia della concentrazione dello stesso ione all'interno del SR (il carico) sulle dinamiche di apertura e di chiusura dei recettori RyRs facendo dipendere i ratei di transizione da uno stato all'altro da queste due concentrazioni. Per migliorare l'efficienza computazionale, la dimensione del modello originario è stata ridotta da 4 a 3 facendo l'ipotesi di stato quasi-stazionario (*quasi-steady-state*) al seguente set di equazioni differenziali:

$$\frac{d\bar{R}}{dt} = -k_2 \cdot [Ca^{2+}]_{SS} \cdot \bar{R} + k_4(1 - \bar{R})$$

$$O = \frac{k_1 \cdot [Ca^{2+}]_{SS}^2 \cdot \bar{R}}{k_3 + k_1 \cdot [Ca^{2+}]_{SS}^2}$$

$$J_{rel} = V_{rel} \cdot O \cdot ([Ca^{2+}]_{SR} - [Ca^{2+}]_{SS})$$

$$\bar{R} = R + O$$

dove R è lo stato di chiusura (*resting closed*), O è lo stato di apertura (*open conducting*) e J_{rel} è la corrente generata dal CICR (rilascio di Ca^{2+} tramite i RyRs triggerato da Ca^{2+}). Tramite queste modifiche si è visto che il modello riesce a replicare l'andamento non lineare della funzione che lega il rilascio di Ca^{2+} dal SR al suo contenuto di Ca^{2+} (fig. 4.3). I dati sperimentali sono quelli ottenuti da Shannon et al. [20] su cellule cardiache di coniglio, dal momento che non esiste in letteratura un simile dato proveniente da cellule umane.

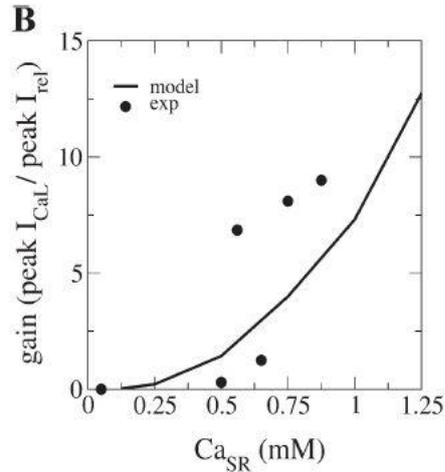


Figura 4.3: Funzione di guadagno non lineare del meccanismo di CICR riprodotta dal modello TNNP. Da Ten Tusscher et al. [22].

4.3.1 Le alternans nel modello TNNP

Per lo studio delle alternans, nel modello TNNP vengono utilizzati 4 diversi setting di parametri (fig. 4.4) corrispondenti a 4 diverse pendenze massime della curva di restitution (fig. 4.5).

Parameter Setting	G_{Kr}	G_{Ks}	G_{pCa}	G_{pK}	τ_f inact
Slope 0.7	0.134	0.270	0.0619	0.0730	$\times 0.6$
Slope 1.1	0.153	0.392	0.1238	0.0146	normal
Slope 1.4	0.172	0.441	0.3714	0.0073	$\times 1.5$
Slope 1.8	0.172	0.441	0.8666	0.00219	$\times 2$

Figura 4.4: I 4 settings di parametri corrispondenti ad un diverso valore di pendenza massima della curva di restitution per lo studio delle alternans. Il controllo corrisponde al setting 2 (slope 1.1). Da Ten Tusscher et al., 2006 [22].

Vengono applicati sia il protocollo S1S2 (*standard restitution*) sia il protocollo dinamico. Nel primo caso la cellula viene stimolata con una serie di 10 stimoli S1 ad un BCL (*basic cycle length*) di 600 ms dopo il quale sopraggiunge lo stimolo S2 riducendo progressivamente l'intervallo S1-S2. Successivamente l'APD ottenuto tramite lo stimolo S2 viene plottato rispetto al DI precedente. Sono state ottenute anche le curve di restitution ad APD₅₀ (50% della ripolarizzazione) per permettere il confronto con i dati sperimentali. I grafici ottenuti mettono in evidenza un buon fitting con i dati sperimentali per DIs inferiori ai 200 ms, ovvero quel range dove si hanno le pendenze

maggiori e l'origine delle instabilità che causano le alternans. Il protocollo dinamico invece consiste nella stimolazione della cellula con un treno di 50 impulsi ad un determinato BCL dopo il quale il CL è progressivamente diminuito (non vengono specificati gli steps). La curva di restitution è generata plottando l'ultimo APD ottenuto ad un BCL in funzione dell'ultimo DI. Come suggerito da Koller et al. [1] la pendenza della curva generata dal protocollo dinamico costituisce un indice più affidabile per lo studio delle alternans rispetto alla curva di restitution ottenuta con il protocollo S1S2. In fig. 4.5 sono mostrati i risultati ottenuti dal modello TNNP. Le figure A-D sono i grafici di restitution ottenuti con il protocollo S1S2 ognuno con uno dei set di parametri in fig. 4.4. Si vede come i dati sperimentali presi da Nash et al. [31] siano ben fittati dalla curva nel range di $DIs < 200$ ms ovvero esattamente quel range dove si verificano le instabilità legate alle alternans. Le figure E-H sono le stesse curve ottenute con il protocollo dinamico per ognuno dei set di parametri, ma soltanto nelle seconde (I-L) si vedono le biforcazioni (APD alternans) a DIs corti.

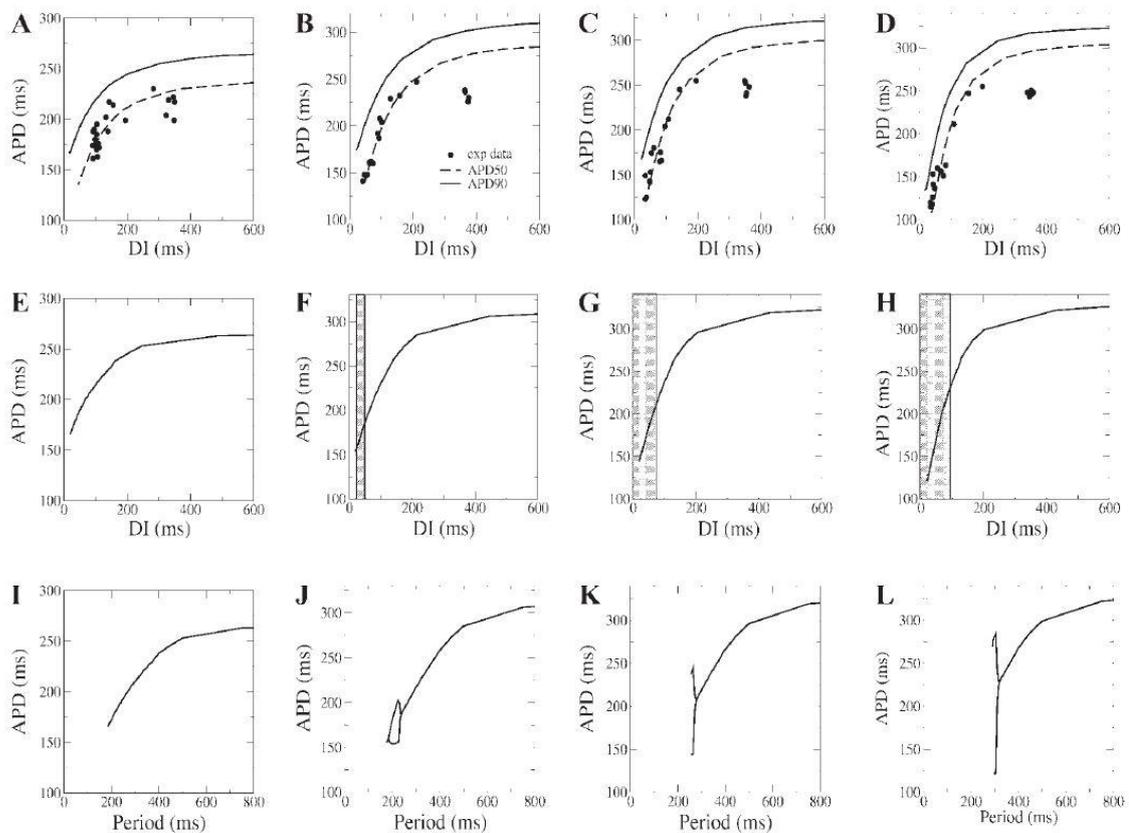


Figura 4.5: Grafici di APD restitution ottenuti con il modello TNNP. Da sinistra a destra, dall'alto verso il basso: A-D S1S2 restitution ottenute per i vari settings di parametri, E-H dynamic restitution ottenute

plottando l'ultimo APD in funzione dell'ultimo DI, I-L dynamic restitution ottenute plottando l'APD in funzione del CL. Da Ten Tusscher et al. [22].

Si nota facilmente come soltanto per il setting 1 (fig. 4.5I) non si verificano alternans. Per il setting 2 (fig. 4.5J) si hanno alternans per CLs compresi tra 236 ms e 182 ms, corrispondenti a un range di DIs compreso fra i 51 e i 24 ms, regione in cui la curva ha pendenza > 1 . Le alternans raggiungono un massimo di 48 ms di ampiezza, per poi decrescere lentamente e sparire per CLs < 182 ms. Per gli altri due settings (3 e 4, fig. 4.5K-L) si vedono alternans che appaiono a CLs sempre meno corti (CLs < 280 ms con il setting 3, CLs < 320 ms con il setting 4) e che tendono a diventare sempre più grandi in ampiezza senza mai cessare, a differenza di ciò che succede in controllo (setting 2). I risultati ottenuti sono in linea con i dati sperimentali, che suggeriscono un legame tra pendenza della curva di restitution (S1S2 o dynamic) e magnitudo delle alternans.

4.4 Il Modello di O'Hara-Rudy

Il modello O'Hara-Rudy (OR dynamic, abbreviato ORd, 2011 [2]) è il modello ventricolare umano tuttora più studiato. L'obiettivo degli autori è stato quello di riprodurre un'estesa gamma di comportamenti fisiologici, quali la dipendenza dell'APD dalla frequenza, l'APD restitution e gli effetti della Calmodulina protein-kinasi II Ca^{2+} -dipendente (CaMK) sulle correnti ioniche e sul Ca^{2+} . Un punto di forza del modello consiste nella disponibilità di nuovi e numerosi dati sperimentali ottenuti da cellule ventricolari umane sane provenienti da più di 100 cuori senza patologie. Grazie a questo importante data set gli autori hanno ottenuto nuove misure per la corrente I_{CaL} , per le correnti del K^+ e per la corrente dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). Lo schema del modello (fig. 4.6) deriva in larga parte da quello di Decker per i cardiomiociti ventricolari di cane [21]. La rilevazione di una diversa concentrazione di Ca^{2+} nelle regioni limitrofe alla membrana sarcoplasmatica ha suggerito l'aggiunta di un subspace, come nel modello TNNP del 2006. Gli altri componenti funzionali sono il reticolo sarcoplasmatico (SR) che funge da riserva per Ca^{2+} e il "bulk cytosol", ovvero il citoplasma più interno della cellula, per un totale di tre compartimenti. Rispetto ad altri modelli precedenti si può notare la suddivisione del SR in due sub-compartimenti, il NSR (*Network Sarcoplasmic Reticulum*)

e il JSR (*Junctional Sarcoplasmic Reticulum*), suddivisione assente nel modello TNNP. Dal punto di vista computazionale il modello ORD è descritto da 41 equazioni differenziali ordinarie di cui 10 sono necessarie per riprodurre gli effetti della CaMK. Gli autori hanno concepito il modello senza alcuna formulazione markoviana dei gates dei canali, utilizzando il formalismo adottato da Hodgkin e Huxley. Pur derivando dal modello di Decker [21], le equazioni delle correnti presenti in ORD sono state ampiamente riadattate (I_{Na} rapida, I_{to} , I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1} , I_{NaCa} , I_{NaK}), ad eccezione dei buffer per il Ca^{2+} e le correnti di background, che utilizzano le formulazioni di Decker con l'aggiustamento delle conduttanze.

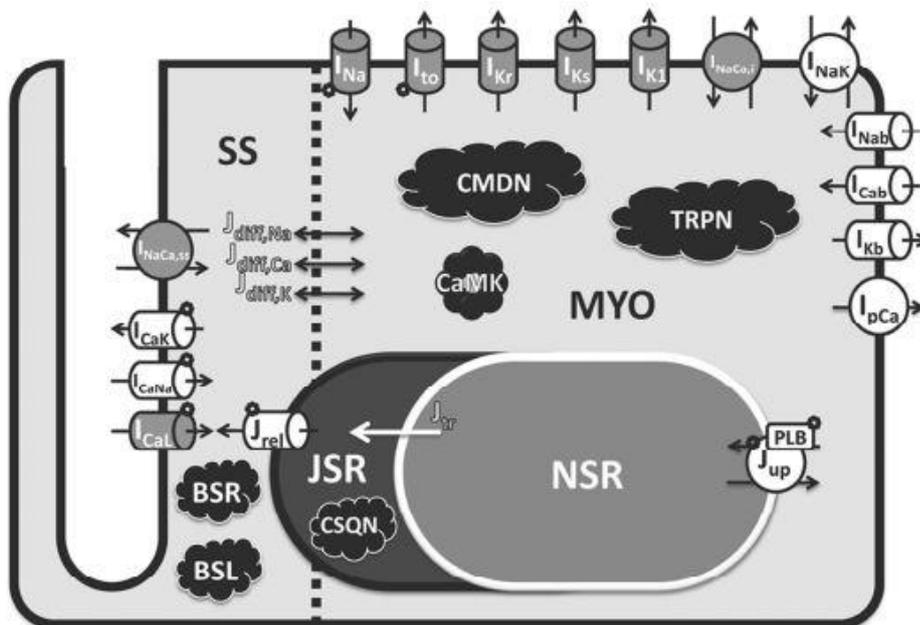


Figura 4.6: Schema del cardiomiocita ventricolare utilizzato nel modello ORD [2].

Un'altra peculiarità del modello è la separazione dell'inattivazione calcio-dipendente (CDI) dall'inattivazione voltaggio-dipendente (VDI) per quanto riguarda la corrente I_{CaL} ; per modulare l'interazione fra questi due meccanismi è stata introdotta la variabile di gate n , il cui valore rappresenta la frazione di canali operanti in modalità CDI. In condizioni fisiologiche, l'inattivazione della corrente I_{CaL} è dovuta alla combinazione di CDI e VDI, quindi n è compresa tra 0 (completa VDI) e 1 (completa CDI). Sia per VDI che CDI le inattivazioni sono caratterizzate da due costanti di tempo pesate. Per quanto concerne la dinamica del Ca^{2+} , l'azione di CaMK qui introdotta influenza la dipendenza

dalla frequenza del ciclo del Ca^{2+} nel modello. Il silenziamento di questa proteina riduce l'ampiezza dei transienti di Ca^{2+} , così come l'intensità dei flussi di riassorbimento (J_{up}) e di rilascio (J_{rel}) di Ca^{2+} , ma aumenta la concentrazione diastolica di tale ione. Un'ulteriore innovazione di questo modello è la sua capacità di riproduzione di post-depolarizzazioni precoci (EADs), che come è stato già descritto sono importanti meccanismi aritmogeni. Le EADs si sono ottenute applicando un parziale blocco (85%) della corrente rettificante ritardata I_{Kr} (a rapida apertura); la loro comparsa è collegata alla velocità di ripolarizzazione e ai suoi effetti sulla I_{CaL} , aspetto quest'ultimo in cui altri modelli peccavano, sia per una forse inaccurata formulazione dell'inattivazione di I_{CaL} , sia per la mancanza di un adeguato set di dati proveniente da cuori sani, come quello disponibile per la realizzazione di questo modello.

4.4.1 Le alternans in ORd

Come accennato nel Capitolo 3, Koller et al. [1] hanno condotto degli esperimenti su cuori umani sani e malati per indagare le differenze tra le due popolazioni a livello di restitution e per studiare il fenomeno delle alternans. Il modello ORd, applicando il protocollo dinamico descritto da Koller, riesce a fittare bene i dati sperimentali (alternans onset per $\text{CLs} < 300$ ms, alternans magnitude di circa 10 ms) ottenendo alternans di magnitudo 11 ms con onset a $\text{CL} = 250$ ms (fig. 4.7).

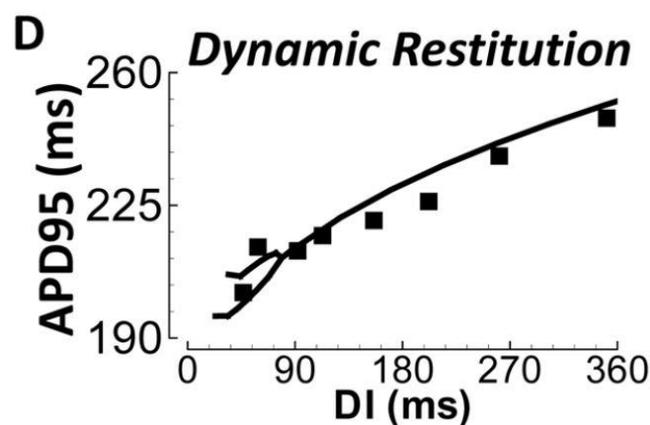


Figura 4.7: Grafico di dynamic restitution ottenuto applicando il protocollo di Koller (dati sperimentali da [1]) con il modello di O'Hara-Rudy [2].

In fig. 4.7 è riportato il grafico di dynamic restitution per DIs corti (<360 ms) ottenuto dalle simulazioni con il modello ORd, in cui è ben visibile la biforcazione per DIs<90 ms (APD alternans). Simulando con stimolazione a CL<230 ms il modello ORd va incontro ad un blocco di conduzione 2:1 in cui non si genera nessun AP. Questo accade perché a frequenze molto alte l'APD non riesce più a seguire adeguatamente un CL sempre più corto, causando una ripolarizzazione incompleta che a sua volta porta ad una aumentata refrattarietà della corrente di Na⁺. Dal momento che gli esperimenti di Koller sono stati condotti su cuori intatti, gli effetti di memoria e di accoppiamento elettrotonico potrebbero aver giocato un ruolo importante. Per questo sono state condotte simulazioni anche su un fascio di 100 cellule endocardiche per verificare che le alternans si generassero anche in un tessuto. Come si può vedere dalla fig. 4.8, per stimolazione in steady state a CL = 280 ms su una striscia di 100 cellule endocardiche prelevate da un cuore umano sano, le alternans sono evidenti nella cellula centrale del fascio (APs dalla cellula #50 in fig. 4.8).

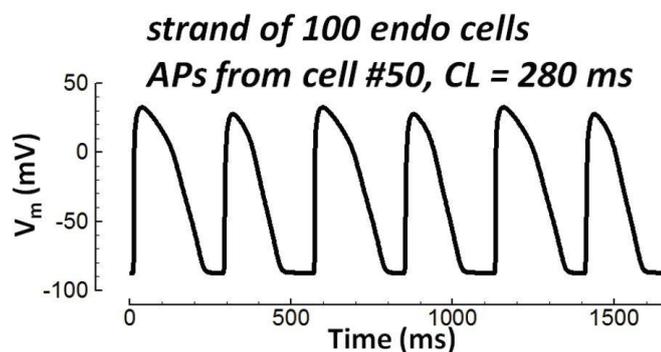


Figura 4.8: APD alternans registrata nella cellula al centro di una striscia di 100 cellule endocardiche prelevate da cuore sano. Da ORd supplement [22]).

La causa delle APD alternans nel modello ORd risiede nell'instabilità nel ciclo del Ca²⁺ intracellulare, con coupling positivo. Questo è in linea con quanto osservato in letteratura [12,27,28], ovvero che non sono tanto le instabilità nel potenziale di membrana a scatenare le alternans quanto gli squilibri nel ciclo del Ca²⁺, che si ripercuotono sul potenziale e quindi sull'APD attraverso tutte le correnti ioniche sensibili proprio a questo ione. Un elemento fondamentale per il controllo della rate dependence del ciclo del Ca²⁺ intracellulare nel modello ORd è la CaMK.

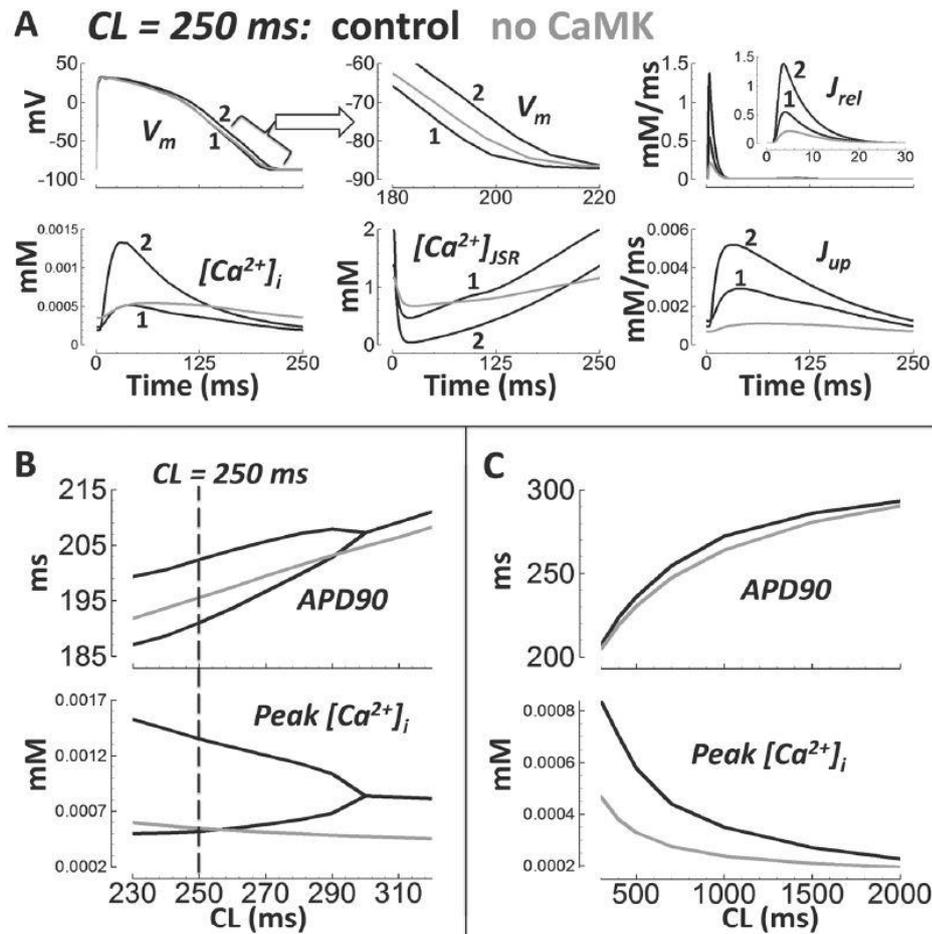


Figura 4.9: APD e CaT alternans in ORd. Le linee nere si riferiscono alla condizione di controllo, mentre le linee grigie sono ottenute sopprimendo l'effetto della calmodulina. Da O'Hara-Rudy et al. [2].

Si nota infatti (fig. 4.9B) come una soppressione del suo effetto porti all'eliminazione delle alternans. Questo effetto è spiegato dai risultati ottenuti per le concentrazioni di calcio citosoliche e del JSR ($[Ca^{2+}]_i$ e $[Ca^{2+}]_{JSR}$) e per le correnti di rilascio e di riassorbimento da parte del SR (J_{rel} e J_{up}) in presenza e in assenza di CaMK. La fig. 4.10 mostra come una soppressione della CaMK abbassi sensibilmente J_{rel} e J_{up} , oltre ad abbassare il transiente di Ca^{2+} e rendere sostanzialmente indipendente dalla frequenza il $[Ca^{2+}]_{JSR}$, che risulta più basso. Questo permette alla pompa SERCA di ripristinare facilmente l'equilibrio di Ca^{2+} all'interno del JSR, anche in virtù del fatto che c'è meno Ca^{2+} rilasciato dallo stesso JSR. In questo modo si tiene facilmente sotto controllo il contenuto di Ca^{2+} del reticolo sarcoplasmatico, lontano da zone di sovraccarico che tendono invece a generare delle instabilità.

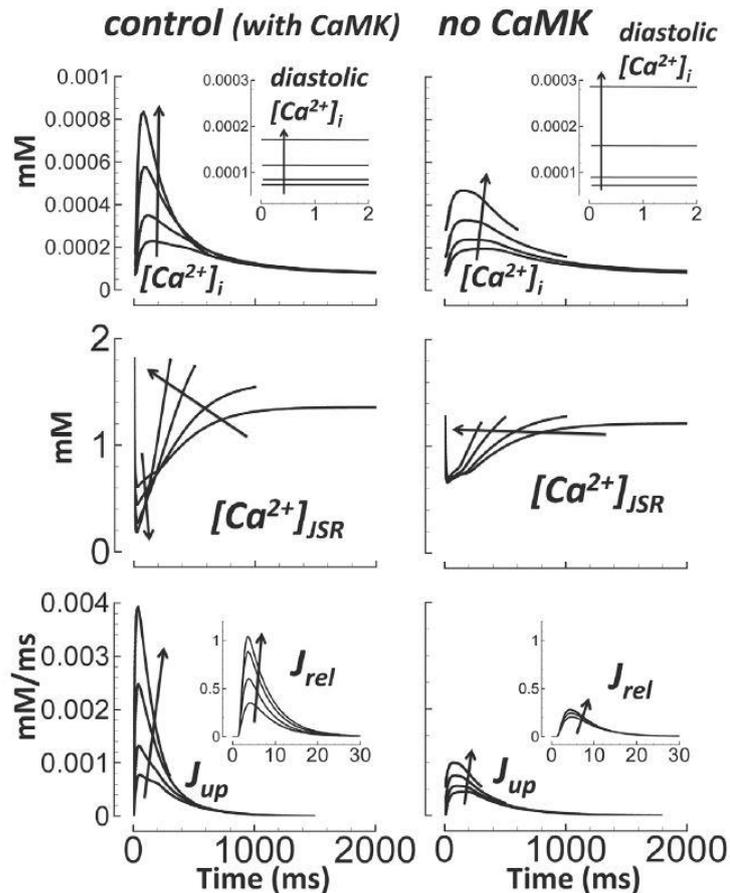


Figura 4.10: Effetti della soppressione della CaMK sul ciclo del Ca^{2+} (colonna a sinistra) comparati con una situazione di controllo (colonna a destra). In alto: transiente di Ca^{2+} e in inserto concentrazione diastolica di Ca^{2+} . Al centro: concentrazione di Ca^{2+} all'interno del JSR. In basso: corrente di riassorbimento del Ca^{2+} tramite SERCA e in inserto corrente di rilascio del Ca^{2+} tramite i recettori RyRs. Da O'Hara-Rudy et al. [2].

Il silenziamento dell'azione della CaMK porta anche ad un incremento della concentrazione diastolica di Ca^{2+} all'interno del cardiomiocita. In questa situazione il muscolo non riesce a rilassarsi in maniera corretta. Inoltre, si possono innescare una serie di meccanismi che causano squilibri nel ciclo metabolico e possono portare alla morte della cellula.

Capitolo 5

Analisi della suscettibilità alle alternans dei modelli ORd e TTNP

5.1 Metodi

Le simulazioni sono state effettuate in ambiente MATLAB, principalmente utilizzando e modificando opportunamente i codici relativi ai modelli ORd e TTNP ed eventualmente implementandone di nuovi per svolgere i protocolli richiesti. I modelli non sono altro che sistemi di equazioni differenziali ordinarie (ODE) che possono essere risolti tramite i solutori della *OdeSuite* di MATLAB. Nel presente caso è stato utilizzato il solutore *ode15s*. La stimolazione del modello di cardiomiocita è stata eseguita a partire da un CL (*cycle length*) di 350 ms per un numero sufficiente di battiti fino al raggiungimento dello steady-state. Si è visto che tra 500 e 1000 battiti non vi erano grosse differenze, quindi nel seguito verranno riportati risultati ottenuti per simulazioni di 500 battiti. Una volta stimolato per 500 battiti a CL=350 ms, e dopo aver salvato la soluzione del sistema alla fine dell'ultimo battito, si è fatta ripartire un'altra simulazione a CL=300 ms, ma con le condizioni iniziali aggiornate alla soluzione del sistema nell'ultimo battito del treno di stimolazione precedente, cercando di riprodurre il protocollo dinamico utilizzato negli studi in vivo.. Una volta giunti a CL=250 ms con passo di 50 ms si è deciso, quando necessario, di procedere con un'ultima stimolazione a CL=230 ms.

5.2 La diffusione del Ca^{2+} all'interno del SR nel modello ORd

Fino ad ora si è visto che i meccanismi coinvolti nel ciclo del Ca^{2+} sono strettamente legati alle APD alternans. In particolare, c'è un'estesa evidenza sperimentale [12,22,27] riguardo il ruolo determinante giocato dal contenuto di Ca^{2+} del reticolo sarcoplasmatico. Data la sua natura tubulare e la sua suddivisione macroscopica in domini differenti, una modellazione a più compartimenti del SR risulta lecita. Infatti, come già mostrato, nel modello ORd il reticolo è diviso in due parti: il JSR corrispondente

alle cisterne terminali del SR, ovvero le zone dove sono più concentrati i canali RyRs deputati al rilascio di Ca^{2+} necessario alla contrazione muscolare, e il NSR ovvero tutto il sistema di tubuli longitudinali di connessione tra una regione e l'altra. Le pompe SERCA sono più concentrate in quest'ultima zona, quindi una volta che il Ca^{2+} è stato riassorbito dovrà diffondere attraverso il NSR prima di tornare nel JSR. Questo processo diffusivo (J_{tr}) è modellato in ORd tramite un'equazione differenziale ordinaria del primo ordine:

$$J_{tr} = \frac{[Ca^{2+}]_{NSR} - [Ca^{2+}]_{JSR}}{\tau_{tr}}$$

dove τ_{tr} è la costante di tempo del processo, legata al fatto che il ricarico di Ca^{2+} delle cisterne terminali richiede tempo. Da esperimenti condotti all'epoca su cardiomiociti ventricolari canini emerge che la costante di tempo è di 91 ms (100 ms in ORd). L'insorgenza delle APD alternans ad alte frequenze potrebbe essere dovuta proprio a questo ritardo nel trasferimento di Ca^{2+} dal NSR al JSR che causa degli squilibri a livello di concentrazione di questo ione all'interno di tutto il reticolo. Il primo passo è stato modificare la costante di tempo τ_{tr} ponendola uguale a 1 ms, rendendo cioè la J_{tr} istantanea per verificare se, come ci si aspetterebbe, le alternans sparissero. Stimolando a CL=250 ms in condizioni di controllo insorgono alternans di 11 ms di ampiezza nel modello ORd. In fig. 5.1 vengono mostrati gli ultimi 4 APs e i transienti di Ca^{2+} ottenuti simulando a CL=250 ms con il modello modificato in cui la τ_{tr} è stata impostata al valore unitario in modo da annullare il ritardo legato al trasporto di calcio dal NSR al JSR (fig. 5.1, pannello a destra). Effettivamente non si registrano più oscillazioni nell'APD nei primi battiti, così come per tutti e 500, a differenza del controllo in cui si hanno alternans con una magnitudo di circa 11 ms (fig. 5.1, pannello a sinistra).

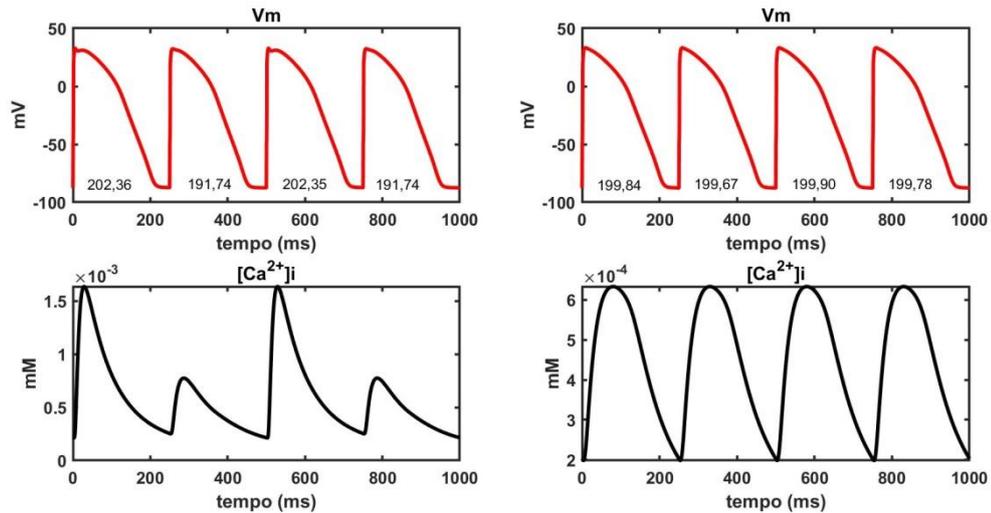


Figura 5.1: Grafico degli ultimi 4 APs (in alto) e dei transienti di calcio (in basso) generati stimolando a CL=250 ms il modello ORd in cui è stata modificata la costante di tempo del processo diffusivo di Ca^{2+} dal NSR al JSR (a destra) e in controllo (a sinistra). Sotto ogni AP è riportato il valore della sua durata (APD) espresso in millisecondi (ms).

In conclusione, dal momento che i dati sperimentali disponibili su cellule umane riguardanti la struttura del reticolo, la distribuzione dei RyRs e delle pompe non raggiungono il livello di dettaglio che viene descritto in questi modelli computazionali, è stato possibile mettere in discussione la struttura di tali meccanismi, in particolare la suddivisione del reticolo stesso. La modellazione del SR è una delle più grandi differenze tra il modello ORd e il modello TNNP. In quest'ultimo infatti non esiste alcuna suddivisione del reticolo che è trattato come un unico compartimento. Ciò fa supporre che, in virtù dei grafici di dynamic restitution in fig. 4.4, vi siano anche altri meccanismi coinvolti nell'insorgenza delle alternans e non soltanto quelli che coinvolgono il bilancio di Ca^{2+} nel SR. Nonostante sia più vecchio del modello ORd, il modello TNNP fornisce quindi spunti interessanti per il proseguo dello studio riguardante questi aspetti.

5.3 Le simulazioni con il modello TNNP

Le simulazioni sono state effettuate con il modello TNNP aggiornato al 2006. Dei quattro settings proposti (fig. 4.4), si è deciso di studiare il secondo in cui tutti i parametri sono impostati al loro valore di default (controllo). La fig. 5.2 mostra un evento di APD alternans e di Ca^{2+} alternans registrato applicando il protocollo descritto

precedentemente, con stimolazione a $CL=230$ ms. Quello che si nota è un coupling negativo, per cui ad un transiente basso corrisponde un AP più lungo e viceversa. Questo è un risultato molto interessante dal momento che nel paper originale non si fa alcun riferimento al tipo di coupling tra le alternans dell'APD e del transiente di Ca^{2+} . Emerge inoltre un'altra differenza significativa rispetto agli esperimenti condotti con il modello ORd, in cui si assiste ad un coupling positivo. Questo risultato può essere spiegato tramite la particolare formulazione della I_{Ks} nel modello TNNP, che risulta sovradimensionata rispetto alla reale densità di questa corrente nei cardiomiociti umani. Dal momento che, come visto nel Capitolo 2, la corrente I_{Ks} può determinare in base alla sua conduttanza il verificarsi di un coupling positivo o negativo, è probabile che questo coupling negativo derivi proprio da una formulazione diversa e da una densità di corrente I_{Ks} maggiore nel modello TNNP.

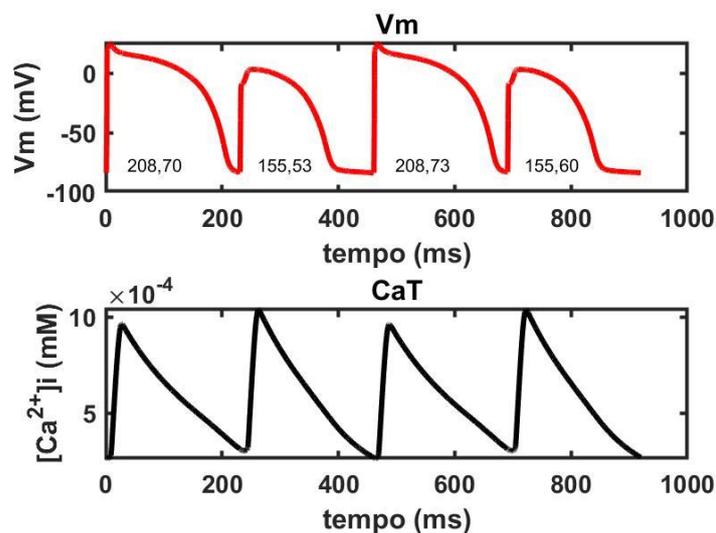


Figura 5.2: In alto: ultimi 4 APs di una serie di 500 battiti generati simulando con il modello TNNP a $CL=230$ ms utilizzando il setting di parametri n°2 (controllo). In basso: transienti di calcio.

Per avere una “fotografia” dello stato del sistema subito prima del battito lungo e subito prima del battito corto, in un regime di APD alternans, si è deciso di adottare il seguente protocollo. Integrando il modello nell’arco di un CL per 500 battiti, se l’AP generato al battito n -esimo è lungo allora si aggiorna il vettore delle condizioni iniziali, contenente le 19 variabili di stato, al risultato ottenuto risolvendo il modello al battito $(n-1)$ -esimo (ovvero ai valori che le variabili di stato assumono poco prima che si scateni l’AP successivo) e si salva come vettore delle condizioni iniziali che precede un AP lungo

($Y_{0\text{long}}$). Viceversa, se l'AP al battito n -esimo è corto la soluzione del sistema al battito ($n-1$)-esimo sarà il vettore delle condizioni iniziali che precede un AP corto ($Y_{0\text{short}}$). Successivamente la strategia è stata quella di resettare una alla volta tutte le 19 variabili di stato di $Y_{0\text{short}}$ al valore di $Y_{0\text{long}}$ (per un totale di 19 vettori di reset, uno per ogni variabile di stato) e di stimolare nuovamente allo stesso CL (230 ms) imponendo il reset all'inizio di ogni integrazione (cioè di ogni battito). Dopo aver salvato opportunamente i vettori $Y_{0\text{short}}$ e $Y_{0\text{long}}$ si è iniziato a resettare una alla volta tutte le variabili di stato, per un totale di 19 simulazioni. Il vettore delle condizioni iniziali deve essere aggiornato (quindi resettato per quell'unica variabile) prima di ogni battito. Si è quindi dovuta inserire una stringa di aggiornamento all'interno del ciclo *for* in cui il modello viene integrato nell'arco di un CL per ogni battito. Seguendo questo protocollo si è visto che il reset di 3 (una alla volta) delle 19 variabili di stato portava alla cessazione delle alternans, che sono quelle che descrivono le cinetiche di:

- inattivazione lenta voltaggio-dipendente della corrente I_{CaL}
- attivazione lenta voltaggio-dipendente della corrente I_{Ks}
- attivazione lenta voltaggio-dipendente della corrente I_{Kr}

Per quanto riguarda la variabile di gating f : in caso di stimolazione ad alta frequenza, se si ha un APD lungo e quindi un conseguente DI troppo corto allora ci sarà meno corrente I_{CaL} entrante al battito successivo, causando un transiente di Ca^{2+} più basso e quindi un AP più corto. Questo è dovuto alla cinetica lenta dei gate di inattivazione voltaggio-dipendenti della I_{CaL} , che non recuperando del tutto dall'inattivazione a causa di un DI troppo corto restano parzialmente attivi, mantenendo cioè il valore a regime inferiore a 1 e risultando in meno corrente entrante di Ca^{2+} . Le variabili di gating della I_{Ks} e della I_{Kr} giocano un ruolo fondamentale nella fase di ripolarizzazione della cellula. Queste due correnti sono caratterizzate da cinetiche lente, che in caso di DI corto non riescono a recuperare dall'inattivazione risultando ancora parzialmente attive all'inizio del battito successivo, che quindi risulterà più corto.

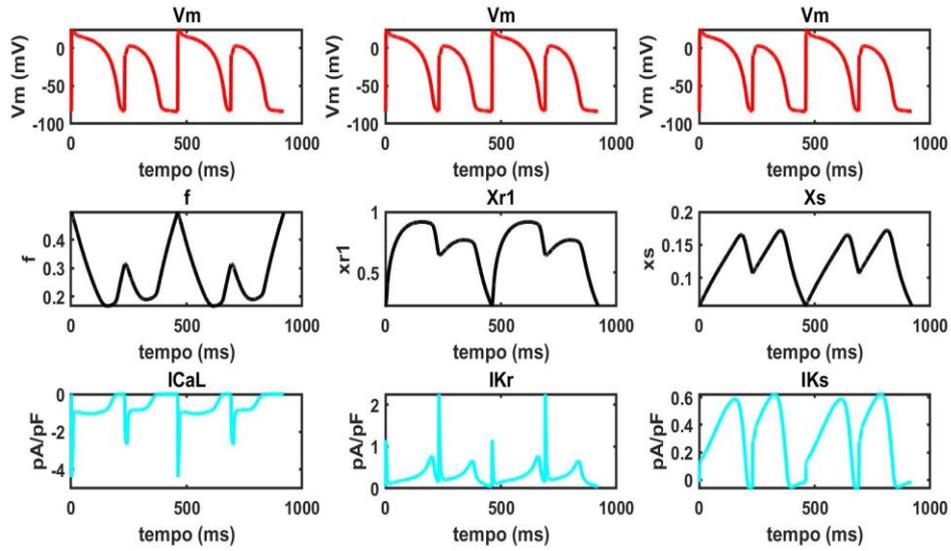


Figura 5.3: In alto: APs a $CL=230$ ms (alternans di 53 ms). Al centro: andamento nel tempo delle variabili di gating f , X_{r1} e X_s . In basso: correnti I_{CaL} , I_{Kr} e I_{Ks} .

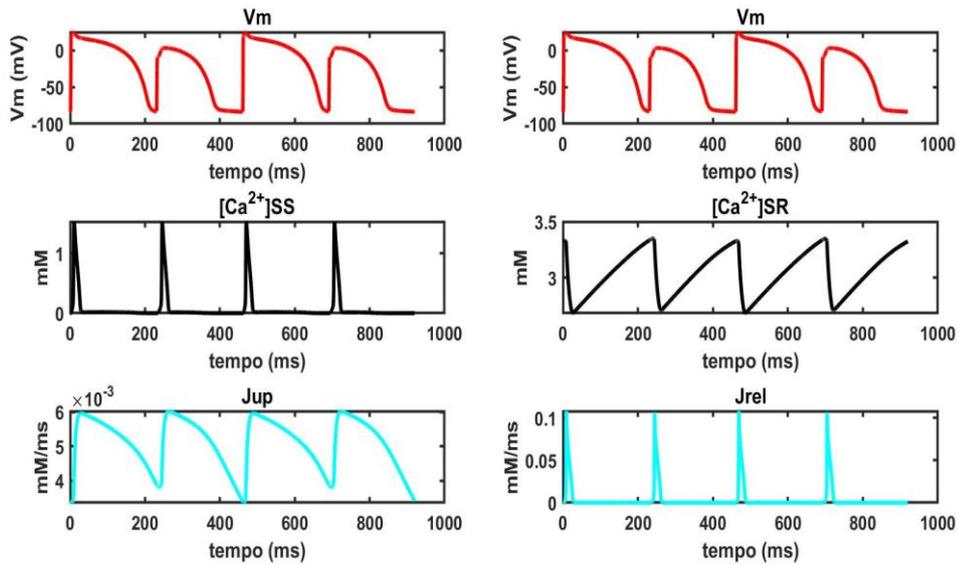


Figura 5.4: Al centro: concentrazioni di Ca^{2+} nel subspace e nel SR. In basso: correnti di rilascio e di riassorbimento.

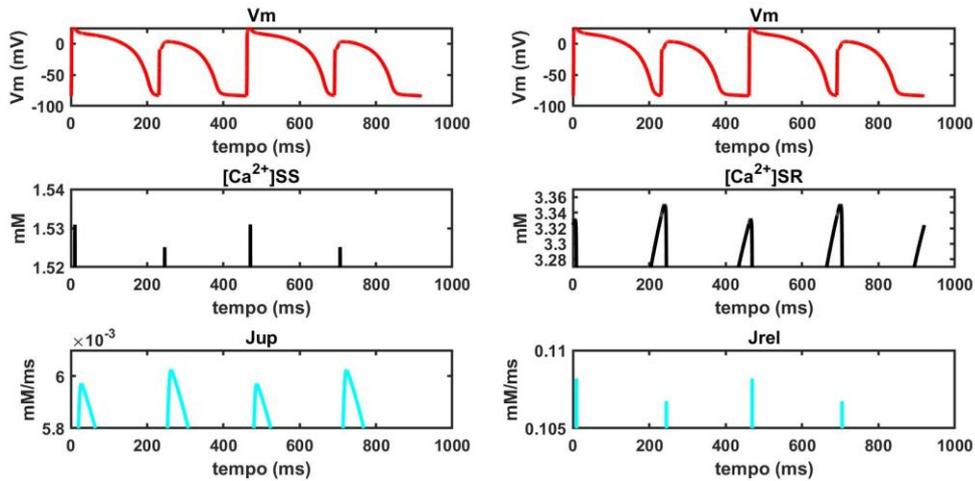


Figura 5.5: Zoom di $[Ca^{2+}]_{SS}$, $[Ca^{2+}]_{SR}$, J_{up} e J_{rel} .

La fig. 5.3 riporta gli andamenti delle tre variabili di gating f , x_{r1} e x_s coinvolte nell'analisi. La variabile di inattivazione f non riesce a recuperare adeguatamente a causa di un tempo troppo corto a potenziali di riposo (fine del battito lungo) rimanendo a valori superiori a 0, il che provoca una corrente I_{CaL} con un picco minore durante il battito successivo. Le due variabili di attivazione x_{r1} e x_s non riescono in egual modo a recuperare dato il DI troppo corto, restando a valori vicini a 1 e quindi rettificando di meno, favorendo cioè una corrente uscente che accorcia l'AP successivo. In fig. 5.4 vengono riportate alcune variabili coinvolte nel ciclo del Ca^{2+} durante lo stesso regime di alternans mostrato in fig. 5.2. Come si può notare meglio dagli zoom in fig. 5.5, durante il battito con AP lungo (corto) vengono registrate una concentrazione di Ca^{2+} nel subspace più alta (bassa) e una concentrazione iniziale di Ca^{2+} nel SR più bassa (alta) ma uno svuotamento maggiore (minore) e conseguentemente un livello di concentrazione minimo più basso (alto) (zoom non riportato). In accordo con queste osservazioni, durante il battito corto la corrente di CICR risulta minore e la corrente di riassorbimento maggiore. Sarebbe però che i risultati in fig. 5.5 siano in contrasto con l'osservazione di negative coupling tra APD e Ca^{2+} alternans nel modello TNNP. In corrispondenza di un battito corto infatti, nonostante ci sia meno I_{CaL} e meno corrente di CICR, si assiste ad un transiente di Ca^{2+} intracellulare maggiore (fig. 5.2). Questo meccanismo può essere spiegato osservando che all'inizio del battito corto la concentrazione interna di Ca^{2+} del SR è più alta rispetto all'inizio del battito lungo, causando un transiente più alto. All'inizio

del battito lungo il SR è meno carico di Ca^{2+} , ma si ha un rilascio maggiore a causa di una I_{CaL} maggiore. Il transiente però risulterà più basso, dal momento che durante il battito corto la cellula espelle più facilmente il Ca^{2+} (fig. 5.2) e il SR si carica di meno. Non avendo tempo di recuperare dallo stato di attivazione/inattivazione a causa di un DI troppo corto, le correnti ioniche di K^+ tenderanno ad essere più uscenti e quindi a ripolarizzare prima accorciando l'AP, mentre la corrente entrante di Na^+ risulterà ridotta causando una depolarizzazione verso potenziali minori. Allo stesso modo, anche il Ca^{2+} non riesce ad essere espulso completamente dalla cellula, quindi si avrà un sovraccarico di Ca^{2+} nel SR che causerà un transiente di Ca^{2+} più grande durante il battito successivo (corto).

5.4 La I_{Ks} nel modello TNNP e nel modello ORd

I dati sperimentali con cui sono state fittate le curve che descrivono la cinetica di attivazione dei gates della I_{Ks} nel modello TNNP provengono tutti da cellule umane. Il problema è che fittando la conduttanza della I_{Ks} alla densità di corrente I_{Ks} ottenuta sperimentalmente in voltage-clamp su cardiomiociti isolati a temperatura fisiologica (37°) risultava esserci una discrepanza tra la densità di corrente che emergeva dai dati sperimentali ed il reale contributo della I_{Ks} nel modello. A conferma di questo, gli autori hanno simulato il comportamento di una cellula M abbassando del 75% la densità di corrente I_{Ks} misurata sperimentalmente ed hanno visto che la differenza di APD tra la cellula M e una cellula epicardica era solo di 10 ms, quasi un ordine di grandezza in meno rispetto al risultato che ci si aspetterebbe (circa 100 ms). Secondo gli autori, la procedura di isolamento della cellula necessaria allo svolgimento dell'esperimento in voltage-clamp avrebbe avuto la conseguenza di degradare parzialmente i canali ionici della I_{Ks} prima che la misura della densità di corrente avvenisse. Per questo gli autori hanno deciso di basare il valore della conduttanza della I_{Ks} sulle misure degli APDs piuttosto che fittarla con i dati sperimentali di singola corrente ottenuti in voltage-clamp, risultando in un sovradimensionamento della I_{Ks} . La formulazione è la seguente:

$$I_{\text{Ks}} = G_{\text{Ks}} \cdot X_s^2 \cdot (V - E_{\text{Ks}})$$

$$X_s = \frac{1}{1 + e^{(-5-V)/14}}$$

$$\alpha_{xs} = \frac{1,100}{\sqrt{1 + e^{(-10-V)/6}}}$$

$$\beta_{xs} = \frac{1}{1 + e^{(V-60)/20}}$$

$$\tau_{xs} = \alpha_{xs} \cdot \beta_{xs}$$

dove E_{Ks} è un potenziale di inversione calcolato come:

$$E_{Ks} = \frac{RT}{F} \log \frac{[K]_o + p_{KNa}[Na]_o}{[K]_i + p_{KNa}[Na]_i}$$

Il rateo di permeabilità sodio-potassio p_{KNa} è stato impostato a $p_{KNa} = 0.03$ in modo tale da avere un potenziale di inversione E_{Ks} che fosse un buon compromesso tra i potenziali di inversione della I_{Ks} presenti in letteratura. Per quanto riguarda il modello ORd invece, la formulazione di questa corrente è nettamente diversa. La formulazione è la seguente:

$$I_{Ks} = G_{Ks} \cdot \left(1 + \frac{0.6}{1 + \left(\frac{3.8 \cdot 10^{-5}}{[Ca^{2+}]_i} \right)^{1.4}} \right) \cdot X_{s1} \cdot X_{s2} \cdot (V - E_{Ks})$$

$$X_{s1} = \frac{1}{1 + e^{(-V-11.6)/8.932}}$$

$$X_{s2} = X_{s1}$$

$$\tau_{xs1} = 817.3 + \frac{1}{2.326 \cdot 10^{-4} \cdot e^{\frac{V+48.28}{17.8}} + 0.001292 \cdot e^{\frac{-V-210}{230}}}$$

$$\tau_{x_{s2}} = \frac{1}{0.01 \cdot e^{\frac{V-50}{20}} + 0.0193 \cdot e^{\frac{(-V-66.54)}{31}}}$$

con la stessa formulazione vista precedentemente per E_{Ks} ma con un $p_{KNa} = 0.01833$. Si noti inoltre che la formulazione ORd prevede due gates X_{s1} e X_{s2} , uno responsabile dell'attivazione e l'altro dell'inattivazione. Questa separazione è dovuta al fatto che l'attivazione è molto più lenta dell'inattivazione e settando una costante di tempo molto maggiore dell'altra a seconda dello stato di polarizzazione della cellula (e quindi a seconda di quale dei due fenomeni comandi) permette di trattare questi due processi come due gates distinti. Vi è inoltre anche una dipendenza dalla concentrazione di Ca^{2+} intracellulare che non troviamo nella formulazione del modello TNNP.

5.5 Il trapianto della I_{Ks} da ORd a TNNP

Si è deciso quindi di effettuare il trapianto della formulazione di I_{Ks} fornita da ORd nel modello TNNP e di simulare utilizzando il protocollo descritto. Prima però si è dovuta aumentare la conduttanza G_{Kr} della corrente di rettificazione rapida da un valore di $G_{Kr} = 0,153$ nS/pF a un valore di $G_{Kr} = 0,336$ nS/pF (incremento del 119%) per avere degli APD compatibili con quelli delle simulazioni precedenti. Inoltre, la formulazione della I_{Ks} in ORd prevede due gates distinti, a differenza del modello TNNP che ne prevede soltanto uno. Si è dovuta aggiungere quindi una variabile di stato relativa al secondo gate della I_{Ks} e modificare opportunamente lo script del modello TNNP. Dai grafici mostrati in fig. 5.6 si vede che le alternans (sia dell'APD sia del transiente di Ca^{2+}) spariscono e il sistema si stabilizza attorno a una condizione di equilibrio.

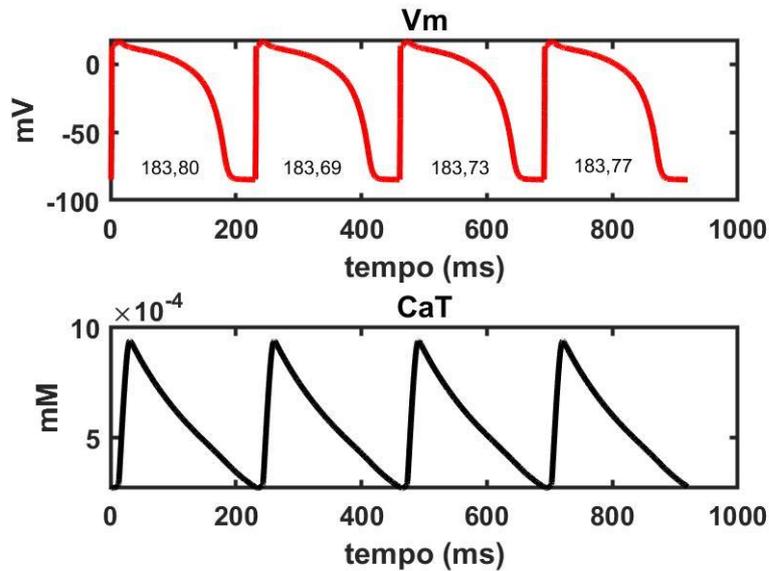


Figura 5.6: In alto: ultimi 4 APs generati con stimolazione a CL=230 ms dal modello TNNP con la formulazione della I_{Ks} presa dal modello ORd. In basso: transienti di calcio.

La soppressione delle alternans in questo caso suggerisce che la specifica modellazione della I_{Ks} nel modello TNNP possa essere un fattore chiave scatenante le alternans nel modello, mentre l'implementazione di una formulazione diversa, come quella di ORd, rende il sistema più stabile e capace di resistere alle alternans.

5.6 Il trapianto della I_{Ks} da TNPP a ORd

Per il trapianto inverso si è invece dovuta togliere una variabile di stato dal modello ORd e implementare la I_{Ks} del modello TNNP modificando lo script del modello ORd. In questo caso si è dovuta abbassare la conduttanza G_{Kr} da un valore di $G_{Kr} = 0,046$ nS/pF a un valore di $G_{Kr} = 0,029$ nS/pF (decremento del 37%), sempre per cercare di avere degli APD in accordo coi dati sperimentali precedentemente acquisiti. Inizialmente si è lasciata la costante di tempo τ_{tr} del processo diffusivo di Ca^{2+} dal NSR al JSR settata ad 1 ms. In questo caso, con la I_{Ks} trapiantata dal modello TNNP, si è visto che le alternans, sia dell'APD sia del transiente di Ca^{2+} (fig. 5.7), spariscono, lasciando pochi dubbi su quella che è una condizione necessaria affinché non si verificano le alternans, ovvero un

trasferimento istantaneo di Ca^{2+} all'interno del SR che riporta velocemente l'equilibrio e rende subito disponibile ad un nuovo rilascio tutto il Ca^{2+} riassorbito.

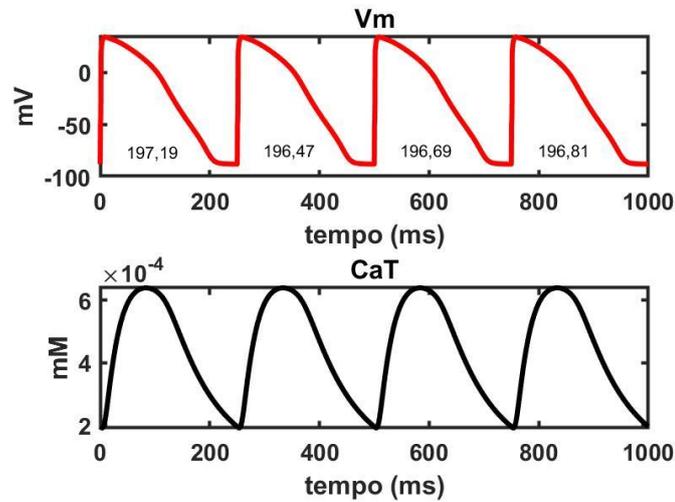


Figura 5.7: In alto: ultimi 4 APs (modello ORd) ottenuti con stimolazione a $CL=250$ ms e la formulazione della I_{Ks} trapiantata dal modello TNNP al modello ORd ($\tau_{tr} = 1$ ms). In basso: transienti di calcio.

Quando invece si è passati alla situazione di controllo ($\tau_{tr} = 100$ ms) applicando lo stesso protocollo si è visto che il trapianto non elimina le alternans, che rimangono di una magnitudo di circa 11 ms per quanto riguarda l'APD tra un battito e l'altro, esattamente come nel modello ORd originale (fig. 5.8).

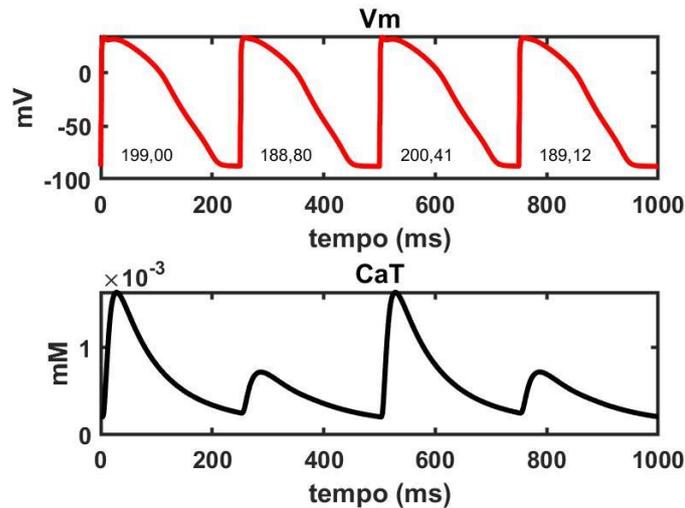


Figura 5.8: In alto: ultimi 4 APs (modello ORd) ottenuti con stimolazione a $CL=250$ ms e la formulazione della I_{Ks} trapiantata dal modello TNNP nel modello ORd (controllo). In basso: transienti di calcio.

Dal trapianto delle formulazioni si è visto che la corrente I_{Ks} del modello TNNP non è sufficiente a sopprimere le alternans nel modello ORd, che spariscono solo in luogo di una diffusione istantanea di Ca^{2+} dal NSR al JSR.

5.7 Il trapianto della I_{Kr} da ORd a TNNP

Il passo successivo è stato quello di eseguire gli stessi trapianti, stavolta con la I_{Kr} . Iniziando dal trapianto da ORd a TNNP, in fig. 5.9 viene riportato il risultato delle simulazioni con il modello TNNP modificato, in cui si vede chiaramente che il suddetto trapianto non elimina le alternans. Per ottenere degli APD in linea con le simulazioni di controllo si è dovuta abbassare la conduttanza della corrente I_{Ks} da un valore originario di $G_{Ks} = 0,392$ nS/pF a un valore di $G_{Ks} = 0,21$ nS/pF (decremento del 46%).

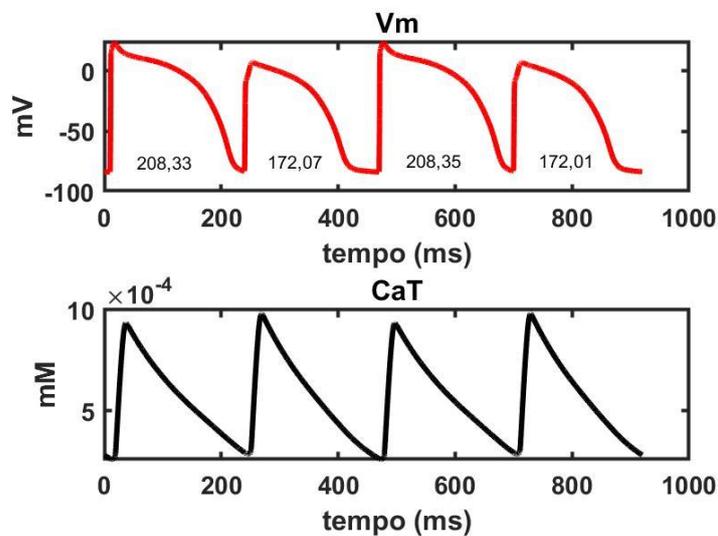


Figura 5.9: In alto: ultimi 4 APs (modello TNNP) ottenuti con stimolazione a $CL=230$ ms con la I_{Kr} del modello ORd trapiantata nel modello TNNP. In basso: transienti di calcio.

Si notano un allungamento nella durata dell'AP corto e quindi una diminuzione delle APD alternans (36 ms) rispetto al controllo (53 ms, fig. 5.2) verso valori più vicini ai range sperimentali. Si può quindi dire che la formulazione suggerita da ORd per la I_{Kr} modelli meglio il comportamento reale di questa corrente.

5.8 Il trapianto della I_{Kr} da TNNP a ORd

Infine, è stato effettuato il trapianto della I_{Kr} dal modello TNNP al modello ORd. In questo caso, la conduttanza della I_{Ks} è stata aumentata da un valore di $G_{Ks} = 0,0034$ nS/pF a un valore di $G_{Ks} = 0,014$ nS/pF (incremento del 311%) per avere APD congruenti con quelli ottenuti simulando in controllo. Si sono valutati i due casi per la costante di tempo τ_{tr} , esattamente come per il trapianto della corrente I_{Ks} : nel caso in cui si ponga il trasferimento istantaneo le alternans, sia dell'APD sia del Ca^{2+} , risultano sparire (fig. 5.10), mentre in controllo ($\tau_{tr} = 100$ ms) si assiste a delle APD alternans di magnitudo di poco inferiore ai 7 ms (fig. 5.11) che risultano leggermente attenuate in virtù degli 11 ms registrati per il trapianto della I_{Ks} nelle stesse condizioni.

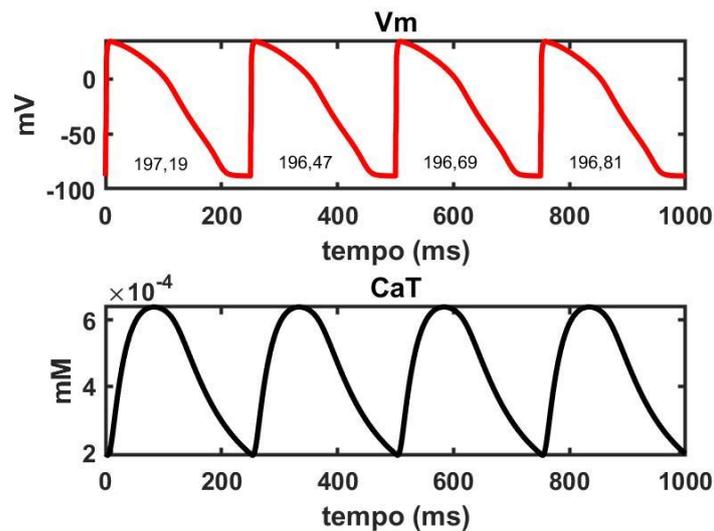


Figura 5.10: In alto: ultimi 4 APs (modello ORd) ottenuti con stimolazione a $CL=250$ ms con la I_{Kr} del modello TNNP trapiantata nel modello ORd ($\tau_{tr} = 1$ ms). In basso: transienti di calcio.

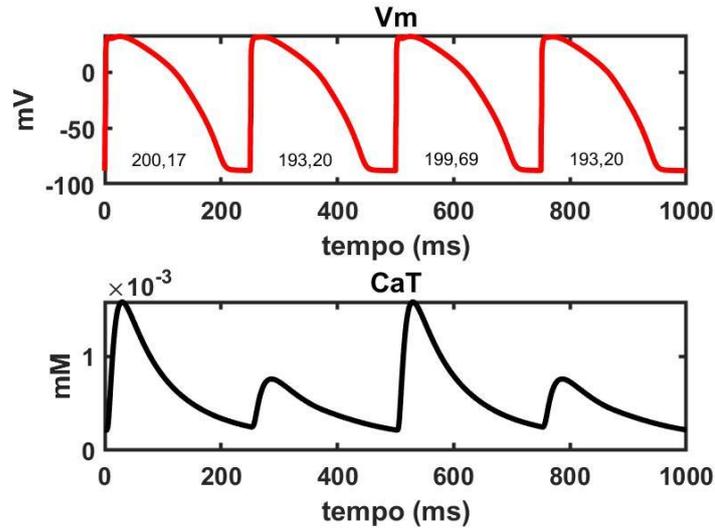


Figura 5.11: In alto: ultimi 4 APs (modello ORd) ottenuti con stimolazione a $CL=250$ ms con la I_{Kr} del modello TNNP trapiantata nel modello ORd (controllo). In basso: transienti di calcio.

Conclusioni

Lo scopo di questo elaborato è stato quello di studiare le alternans cardiache, oscillazioni a livello della durata del potenziale d'azione e dell'ampiezza del transiente di calcio intracellulare.

Dalla revisione della letteratura e dalle simulazioni effettuate emerge che un primo parametro fondamentale è l'equilibrio del calcio all'interno del reticolo sarcoplasmatico e della cellula intera. Considerando un ritardo nella diffusione del calcio tra i compartimenti prossimali e distali del reticolo sarcoplasmatico (come nel modello ORd) si possono generare delle fluttuazioni di calcio al suo interno che si traducono in instabilità elettriche tramite una vasta gamma di canali ionici e di dinamiche molecolari sensibili a tale ione.

In secondo luogo, emerge il ruolo giocato dalle cinetiche lente di attivazione e inattivazione dei canali del potassio e del calcio, rispettivamente. Un incompleto recupero dall'inattivazione dei canali del calcio e una non completa deattivazione dei

canali della corrente I_{Ks} possono portare all'insorgenza di alternans (come nel modello TTNP).

Sostituendo la formulazione della corrente I_{Ks} di ORd nel modello TNNP le alternans spariscono, confermando il ruolo importante di questa corrente per l'insorgenza delle alternans, perlomeno in tale modello. D'altra parte la sostituzione inversa non è sufficiente a far insorgere alternans nel modello ORd a cui sia stato velocizzata la diffusione del calcio all'interno del reticolo sarcoplasmatico. Si può quindi concludere che altri meccanismi di membrana, quale il lento recupero dall'inattivazione della corrente di calcio siano necessari per l'insorgenza delle alternans in questo contesto. Gli esperimenti virtuali condotti con la formulazione della corrente I_{Kr} portano invece ad escludere un ruolo fondamentale per questa corrente.

La limitata quantità di dati sperimentali sull'uomo e le problematiche relative ai protocolli utilizzati nelle sperimentazioni in vivo ed in vitro rappresentano tuttora un importante ostacolo verso la comprensione delle basi cellulari e molecolari delle aritmie cardiache. In questo contesto le analisi in silico possono aiutare ad interpretare i pochi dati disponibili fornendone una interpretazione causa-effetto e possono orientare le priorità nella progettazione di futuri esperimenti.

Bibliografia

[1] Marcus L. Koller, Sebastian K.G. Maier, Anna R. Gelzer, Wolfgang R. Bauer, M. Meesmann, Robert F. Gilmour, "Altered Dynamics of Action Potential Restitution and Alternans in Humans With Structural Heart Disease", *AHA Journal-Circulation* (2005)

[2] Thomas O'Hara, La' szlo' Vira'g, Andra' s Varro', Yoram Rudy, "Simulation of the Undiseased Human Cardiac Ventricular Action Potential: Model Formulation and Experimental Validation", *PLoS Computational Biology* (2011)

[3] Ten Tusscher, D. Noble, P. J. Noble, A. V. Panfilov, "A model for human ventricular tissue", *Am J Physiol Heart* (2004)

[4] <https://bristol.ac.uk/phys-pharm-neuro/media>

[5] <https://it.quora.com/Come-funziona-il-battito-cardiaco>

[6] https://en.wikipedia.org/wiki/Ventricular_action_potential

[7] Stefano Morotti, "Computational Modeling of Cardiac Excitation-Contraction Coupling in Physiological and Pathological Conditions" (2013)

[8] Bers DM, "Cardiac Excitation-Contraction Coupling", *Nature* (2002)

[9] Traube L, "Ein fall von pulsus bigeminus nebst bemerkungen tiber die leberswellungen bei klappenfehlern und uber acute leberatrophic", *Ber Klin Wschr.* (1872)

[10] Rosenbaum DS, Jackson LE, Smith JM, Garan H, Ruskin JN, Cohen RJ, "Electrical alternans and vulnerability to ventricular arrhythmias", *N Engl J Med.* (1994)

[11] Gehi AK, Stein RH, Metz LD, Gomes JA, "Microvolt T-wave alternans for the risk stratification of ventricular tachyarrhythmic events: a meta-analysis", *J Am Coll Cardiol.* (2005)

[12] James N. Weiss, Alain Karma, Yohannes Shiferaw, Peng-Sheng Chen, Alan Garfinkel, Zhilin Qu, "From Pulsus To Pulseless: The Saga of Cardiac Alternans", *AHA Journal-Circulation* (2006)

- [13] Hodgkin A. L., Huxley A. F., "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve", *The Journal of Physiology* (1952)
- [14] Nolasco JB, Dahlen RW, "A graphic method for the study of alternation in cardiac action potentials", *J Appl Physiol* (1968)
- [15] Noble D., "A modification of the Hodgkin-Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pace-maker potentials", *J Physiol* (1962)
- [16] McAllister, Noble, Tsien, "Reconstruction of the electrical activity of cardiac Purkinje fibres", *J Physiol* (1975)
- [17] Di Francesco D., Noble D., "A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes", *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* (1985)
- [18] Shiferaw, Sato, Karma, "Coupled dynamics of voltage and calcium in paced cardiac cells", *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* (2005)
- [19] Luo C.H., Rudy Y., "A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. Simulations of ionic currents and concentration changes", *AHA Journal-Circulation* (1994)
- [20] Shannon, Wang, Puglisi, Weber, Bers, "A mathematical treatment of integrated Ca^{2+} dynamics within the ventricular myocyte", *Biophys J.* (2004)

- [21] Decker, Heijman, Silva, Hund, Rudy, "Properties and ionic mechanisms of action potential adaptation, restitution, and accommodation in canine epicardium", *Am J Physiol Heart* (2009)
- [22] Ten Tusscher, Noble, Noble, Panfilov, "Alternans and spiral breakup in a novel computational model", *Am J Physiol Heart* (2006)
- [23] Ten Tusscher, Noble, Noble, Panfilov, "Comparison of electrophysiological models for human ventricular cells and tissues", *Am J Physiol Heart* (2006)
- [24] Priebe L., Beuckelmann D.J., "Simulation study of cellular electric properties in heart failure", *AHA Journal-Circulation* (1998)
- [25] Faber G.M., Rudy Y., "Action Potential and Contractility in $[Na^+]_i$ Overloaded Cardiac Myocytes", *Biophys J.* (2000)
- [26] Bernus, Wilder, Zemlin, Verschelde, Panfilov, "A computationally efficient electrophysiological model of human ventricular cells", *Am J Physiol Heart* (2002)
- [27] Zhou, Bueno-Orovio, Orini, Hanson, Hayward, Taggart, Lambiase, Burrage, Rodriguez, "In Vivo and In Silico Investigation Into Mechanisms of Frequency Dependence of Repolarization Alternans in Human Ventricular Cardiomyocytes", *AHA Journal-Circulation* (2016)
- [28] Joshua N. Edwards, Lothar A. Blatter, "Cardiac alternans and intracellular calcium cycling", *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2014)

[29] Mary E. Díaz, Stephen C. O'Neill, David A. Eisner, "Sarcoplasmic Reticulum Calcium Content Fluctuation Is the Key to Cardiac Alternans", *AHA Journal-Circulation* (2004)

[30] Kennedy, Bers, Chiamvimonvat, Sato, "Dynamical effects of calcium-sensitive potassium currents on voltage and calcium alternans", *J Physiol* (2017)

[31] Nash, Bradley, Sutton, Clayton, Kallis, Hayward, Paterson, Taggart, "Whole heart action potential duration restitution properties in cardiac patients: a combined clinical and modelling study", *Exp Physiol* (2006)

Appendice: Dati sperimentali sulle alternans nel cuore umano

<u>Autori</u>	<u>Titolo</u>	<u>Rivista</u>	<u>Anno</u>	<u>Exp/Sim</u>	<u>Specie</u>	<u>Single cell/tessuto</u>	<u>AP model</u>	<u>Protocolli</u>	<u>CL/frequenza Onset</u>	<u>Vm/Ca alternans</u>	<u>Coupling</u>	<u>Mechanisms</u>	<u>Note</u>
1. Xin Zhou, Blanca Rodriguez et al.	In vivo and in silico mechanisms of frequency dependence repolarization alternans in human ventricular cardiomyocytes	Integrative physiology	2016	Entrambi	Human	Single cell	ORd	Range di 6 CLs da 600 a 350 ms a step di 50 ms	Fork-type: 500 ms in vivo, 350 ms in silico Eye-type: 550 ms in vivo, 475 ms in silico	Entrambi	In phase. CaT alto può potenziare ICaL inactivation (APD short) e potenziare INaCa (APD long)	Larger Jrel and smaller Jup → Sarcoplasmic Reticulum Calcium Balance (SRCB) fluctuations → APD alternans SRCB → [Ca2+]i fluctuations → larger INaCa → APD alternans (Eye-type) Larger GCaL → [Ca2+]i increase → SERCA increase → alternans end INaCa -60% → no alternans	
2. Thomas O'Hara, Yoram Rudy et al.	Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: model formulation and experimental validation	PLOS Computational Biology	2011	Exp e sim	Human	Single cell e tessuto	ORd	S1S2 e Dynamic	CL=250 ms (in single cell). CL=280 ms (in tissue)	Vm e Ca alternans	Positive (on viene approfondito nel resto del paper)	Ca2+ subsystem alternans → APD alternans SERCA +20% elimina alternans. CaMK elimina alternans + riduzione picco [Ca2+]i a frequenze elevate	
3. Marcus L. Koller, Robert F. Gilmour Jr et al.	Altered dynamics of action potential restitution and alternans in human with structural heart disease	AHA Journal	2005	Solo exp	Human	Tessuto	-	S1S2 e Dynamic	SHD patients: 168±7 bpm No SHD: 225±4 bpm DI range: 68±11 ms for	Solo APD alternans	-	Aumento slope curva restitution → alternans (SHD e no SHD).	

									SHD, 12±2 ms for no SHD			
4. Ten Tusscher and Panfilov	Alternans and spiral breakup in a human ventricular tissue model	AJP-Heart and Circulatory Physiology	2006	Solo sim	Human	Single cell e tessuto	TNNP	S1S2 e Dynamic	2° setting (control): CLs tra 182 e 236 ms 3° setting: CLs<280 ms 4° setting: CLs<320 ms	Solo APD alternans	-	Control: eye-type alternans (slope 1.1) 1° setting: no alternans (-12.5% GKr, -31% GKs, -50% GpCa, GpK x5, tauf x0.6, slope 0.7) 3° setting: fork-type alternans (+12% GKr, +12% GKs, +67% GpCa, -50% GpK, tauf x1.5, slope 1.4) 4° setting: fork-type alternans (+12% GKr, +12% GKs, +86% GpCa, -97% GpK, tauf x2, slope 1.8)