

ALMA MATER STUDIORUM -UNIVERSITA' DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

**DIPARTIMENTO DI
INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E
DELL'INFORMAZIONE
"GUGLIELMO MARCONI"**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
INGEGNERIA BIOMEDICA**

**Sviluppo, implementazione e testing di un
simulatore di Dynamic Clamp
multicellulare per valutazioni di sicurezza
cardiaca dei farmaci**

**Tesi in
Modelli e Metodi per la Cardiologia Computazionale**

Relatore
Prof. Stefano Severi

Presentata da
Maria Camporesi

Correlatore
Dott. Chiara Bartolucci

Anno Accademico 2018/2019

*This is the point at which to make one of the important
points about the philosophy of modelling.
It is one of the functions of models to be wrong!
Not, of course, in arbitrary or purely contingent ways,
but in ways that advance our understanding.*

(D. Noble and Y. Rudy, 2001)

INDICE

| | |
|--|------------|
| Introduzione | 9 |
| 1. Elettrofisiologia cardiaca | 11 |
| 1.1 Il potenziale d'azione | 12 |
| 1.2 Tecniche di misura in elettrofisiologia..... | 14 |
| 1.2.1 Voltage clamp e AP clamp..... | 15 |
| 1.2.2 Dynamic clamp..... | 17 |
| 1.2.3 Automated patch clamp..... | 23 |
| 1.3 La modellistica cardiaca..... | 25 |
| 1.4 La valutazione della safety dei farmaci | 27 |
| 1.5 Valutare la proaritmicità in un esperimento in dynamic clamp | 29 |
| 2. Metodi | 33 |
| 2.1 Modello in silico di O'Hara-Rudy | 33 |
| 2.3 Modellazione del sistema eterologo..... | 37 |
| 2.3.1 I_{Kr} | 38 |
| 2.3.2 I_{K1} | 41 |
| 2.3.3 I_{CaL} | 41 |
| 2.3.4 Il rumore sovrapposto..... | 45 |
| 2.2 Modellazione del sistema di acquisizione | 45 |
| 2.4 Simulazione in Dynamic Clamp | 51 |
| 2.4.1 Compensazione della corrente di leakage | 52 |
| 2.4.2 Protocollo di stima del fattore di scala | 54 |
| 2.5 Somministrazione virtuale di un farmaco | 59 |
| 3. Risultati | 61 |
| 3.1 I fattori che influenzano la durata del potenziale d'azione | 61 |
| 3.1.1 Fattori derivanti dal sistema di acquisizione | 61 |
| 3.1.2 Fattori derivanti dal modello in silico | 87 |
| 3.2 Valutazione degli effetti dei farmaci | 90 |
| Conclusioni | 101 |
| Bibliografia | 103 |

ACRONIMI

| | |
|---------------------------------------|--|
| AP | Potenziale d'azione |
| APD₉₀ | Durata del potenziale d'azione al 90% della ripolarizzazione |
| [Ca⁺⁺]_{ss} | Concentrazione di calcio nel <i>subspace</i> |
| CHO | Linea cellulare da tessuto ovarico di criceto cinese |
| CICR | <i>Calcium-Induced Calcium Released</i> |
| CiPA | <i>Comprehensive in Vitro Proarrhythmia Assay</i> |
| CL | <i>Cycle length</i> |
| C_m | Capacità di membrana |
| EFTPC_{max} | <i>Maximal effective therapeutic free concentration</i> |
| E_k | Potenziale di Nerst del potassio |
| E_{leak} | Potenziale di inversione della corrente di leakage |
| g_{leak} | Conduttanza della corrente di leakage |
| G_{max} | Conduttanza massima |
| G_{scale} | Fattore di scala |
| IC₅₀ | Concentrazione per cui il 50% dei canali sono inibiti |
| I_{Ca,L} | Corrente di calcio di tipo long lasting |
| I_{K1} | Corrente di potassio rettificante entrante |
| I_{Kr} | Corrente di potassio rettificante ritardata rapida |
| I_{leak} | Corrente di leakage |
| I-V | Caratteristica corrente- tensione |
| [K⁺]_i | Concentrazione intracellulare di potassio |
| [K⁺]_o | Concentrazione extracellulare di potassio |

| | |
|-----------------------|--|
| R_s | Resistenza in serie all'elettrodo |
| R_{seal} | Resistenza del sigillo tra la membrana cellulare e la pipetta |
| V_{cmd}, V_{com} | Tensione in input al sistema di acquisizione |
| V_{hold} | Potenziale a cui viene mantenuta la cellula durante un protocollo in <i>voltage clamp</i> |
| V_m | Potenziale di membrana |
| V_{off}, V_{offset} | Offset in tensione residuo |
| V_p | Potenziale sulla micropipetta |
| V_{step} | Gradino in tensione a cui viene portata la cellula durante un protocollo in <i>voltage clamp</i> |

INTRODUZIONE

Valutare la sicurezza cardiaca è un processo fondamentale nello sviluppo dei farmaci, che deve seguire le linee guida fornite dalle agenzie per la regolamentazione. In particolare, in fase preclinica è utile individuare quali composti possono causare un aumento del rischio di Torsione di Punta, una tachicardia ventricolare che può rivelarsi fatale. Le attuali linee guida prevedono di valutare l'affinità dei composti con la corrente ripolarizzante di potassio, I_{Kr} , il cui blocco porta ad un allungamento del potenziale d'azione aumentando il rischio di insorgenza di aritmie. Considerando però la complessa interazione tra le correnti durante il potenziale d'azione, valutare la cardio-tossicità su una sola corrente potrebbe non rivelarsi esaustivo.

Facendo riferimento anche alle nuove iniziative per la valutazione della cardio-tossicità, in questo elaborato viene presentata la simulazione di un sistema per valutare la sicurezza cardiaca basato sull'utilizzo di un modello in silico unito alla tecnica elettrofisiologica di *dynamic clamp* per connettere in un circuito chiuso la parte software alle cellule in vitro. In questo modo è possibile esaminare gli effetti di un farmaco su un numero maggiore di correnti prelevate direttamente dal sistema biologico e integrarle in un modello di potenziale d'azione.

Nel primo capitolo viene introdotto il concetto di potenziale d'azione e viene riportato il funzionamento delle principali tecniche di misura usate nell'elettrofisiologia cardiaca. Vengono poi introdotti i modelli matematici di potenziale d'azione cardiaco, viene fornita una breve spiegazione delle attuali linee guida per la valutazione della safety cardiaca e viene descritto come un esperimento in *dynamic clamp* collegato a un modello in silico può essere impiegato nella valutazione della sicurezza.

Nel secondo capitolo viene descritto il funzionamento dell'esperimento in *dynamic clamp* e la sua simulazione in ambiente Matlab® e Simulink®. Sono stati implementati i tre principali sistemi: le cellule in vitro che esprimono le correnti di interesse, il sistema in *voltage clamp* con cui le correnti vengono acquisite e il modello in silico di O'Hara-Rudy. Inoltre, sono descritti i protocolli ideati e realizzati e che sono necessari per la riuscita dell'esperimento in *dynamic clamp*: il protocollo di compensazione della corrente di leakage, quello per l'aggiunta dell'inattivazione calcio-dipendente alla

corrente I_{CaL} acquisita dal sistema eterologo e il protocollo di stima del fattore di scala. Infine, viene descritto come è stata simulata la somministrazione di un farmaco nei sistemi eterologhi.

Nel terzo capitolo sono presentati i risultati di alcuni test fatti sul simulatore. È stata effettuata prima un'analisi di sensitività per comprendere come alcuni elementi circuitali del sistema fisico di acquisizione e le relative compensazioni possono andare ad influire sulla durata del potenziale d'azione cardiaco, poi è stata testata la risposta del sistema così simulato alla somministrazione virtuale di alcuni farmaci.

Capitolo 1

ELETTROFISIOLOGIA CELLULARE

La capacità meccanica del cuore di riuscire a pompare sangue nel sistema circolatorio dipende strettamente dalla sua funzionalità elettrica, grazie all'accoppiamento tra eccitazione e contrazione che avviene nei cardiomiociti. La contrazione viene regolata da un meccanismo detto *Calcium-Induced Calcium Released*, ovvero, grazie all'apertura dei canali del calcio sulla membrana dei T-tuboli entrano ioni calcio nella cellula che a loro volta inducono il rilascio di ioni calcio dal reticolo sarcoplasmatico. Con l'aumento della concentrazione degli ioni calcio all'interno della cellula si instaura un meccanismo che permette ai filamenti di miosina di legarsi ai siti dell'actina provocando la contrazione della cellula.

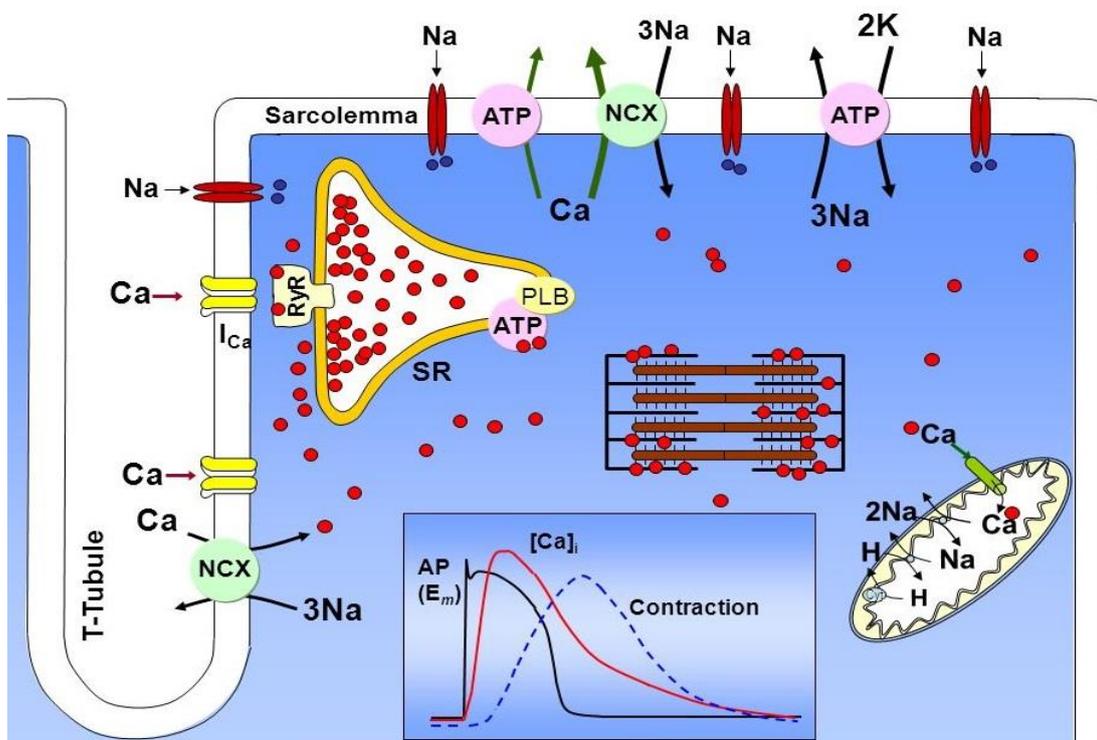


Figura 1.1, Rappresentazione schematica della correlazione tra potenziale d'azione, concentrazione di calcio intracellulare e contrazione. Tratto da [1]

L'apertura dei canali del calcio situati sulla membrana dipende a sua volta dal valore del potenziale di membrana, e quindi dall'attività elettrica della cellula. La contrazione

delle cellule miocardiche avviene in modo sincrono e organizzato grazie a un sistema di conduzione elettrico dedicato, che porta lo stimolo elettrico dalle cellule del nodo seno atriale agli atri e ai ventricoli.

L'attività elettrica delle cellule miocardiche è rappresentata dal potenziale d'azione, che riflette la variazione del potenziale di membrana nel tempo causata dalle correnti attraverso i canali ionici. Una variazione delle correnti ioniche si riflette perciò in una variazione del potenziale d'azione stesso e in un'alterazione dell'attività elettrica che può portare ad un cambiamento nella meccanica cardiaca.

1.1 IL POTENZIALE D'AZIONE

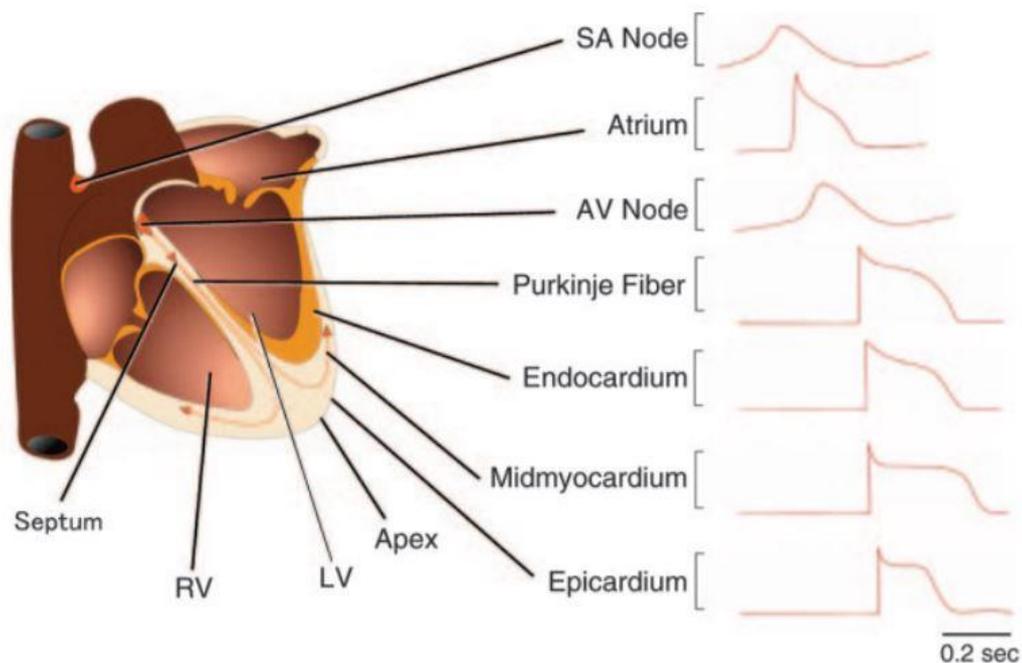


Figura 1.2, Andamenti tipici di potenziali d'azione generati in regioni differenti. Tratto da [2]

I cardiomiociti sono cellule eccitabili in grado perciò di generare un potenziale d'azione in presenza di uno stimolo esterno, ovvero una rapida variazione del potenziale di membrana che passa dal suo valore a riposo, circa -90 mV, per arrivare a valori positivi, circa 40 mV, per poi tornare al suo valore iniziale. In generale, il potenziale d'azione è un evento del tipo “tutto o nulla”, ovvero ha origine solo se lo

stimolo iniziale supera un certo valore di soglia, e, una volta che il valore del potenziale di membrana ha superato la soglia, la forma del potenziale d'azione si riproduce in modo predefinito e indipendente dallo stimolo che lo ha generato. La forma è però caratteristica della regione del miocardio dove si genera il potenziale d'azione. Infatti, ogni regione presenta diversi livelli di espressione dei canali ionici che danno origine a potenziali d'azione con morfologie differenti, come si nota in Figura 1.2.

Ogni potenziale d'azione cardiaco è contraddistinto da varie fasi che rispecchiano il succedersi di specifiche correnti attraverso la membrana cellulare.

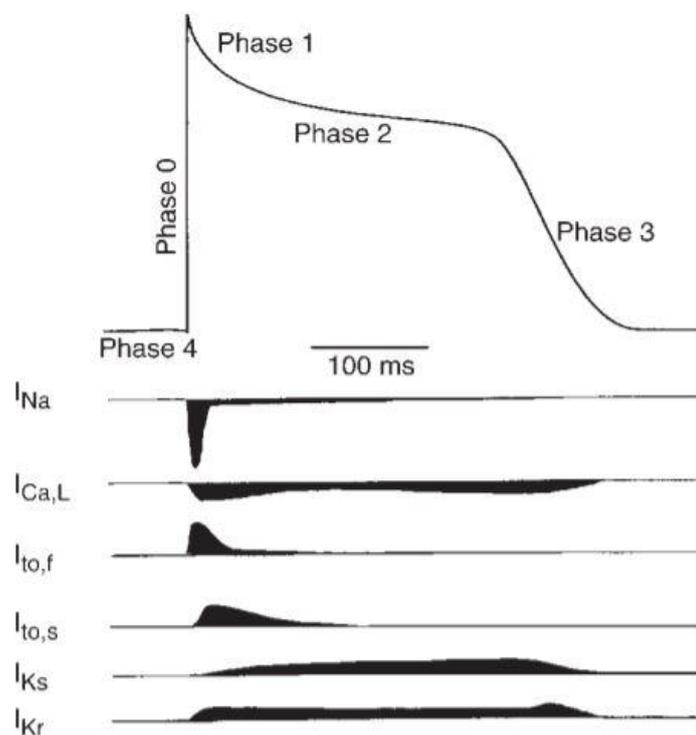


Figura 1.3. Andamento tipico del potenziale d'azione in un cardiomiocita ventricolare adulto, insieme agli andamenti nel tempo delle principali correnti durante il potenziale d'azione. Tratto da [2]

Osservando il potenziale d'azione delle cellule endocardiche, si nota una fase iniziale, detta fase 0, di rapida depolarizzazione della membrana cellulare causata dalla veloce attivazione dei canali del sodio e all'entrata di ioni Na^+ all'interno della cellula. Questa fase è seguita da una lieve ripolarizzazione, detta fase 1, causata principalmente dall'apertura dei canali potassio che producono una corrente uscente detta I_{to} , transiente uscente. La fase 1, più pronunciata nelle cellule ventricolari e del Purkinje, influenza l'ampiezza della fase 2. La fase 2, cosiddetta fase di plateau, è tipica

dell'andamento del potenziale d'azione ventricolare. In questa fase il potenziale di membrana rimane quasi costante a causa del contributo alla depolarizzazione della corrente entrante di ioni calcio, che rimane quasi costante per tutta la durata di questa fase. Nella fase 3, a causa dell'inattivazione dei canali del calcio, prevale la corrente uscente di potassio che porta il potenziale di membrana a ripolarizzarsi e a tornare al suo valore di riposo, fase 4. Il periodo in cui il potenziale d'azione rimane a riposo riflette il periodo di diastole, mentre la durata del potenziale d'azione coincide con il periodo di sistole e di contrazione della cellula.

1.2 TECNICHE DI MISURA IN ELETTROFISIOLOGIA

L'elettrofisiologia è quella branca della fisiologia che si occupa del flusso di ioni attraverso i tessuti biologici e delle tecniche di registrazione di questi flussi. Tra le varie tecniche di posizionamento dell'elettrodo, vengono dette di registrazione intracellulare quelle tecniche che consistono nell'inserire la punta di un elettrodo direttamente all'interno di una cellula. L'elettrodo normalmente consiste in una micropipetta in vetro borosilicato con un diametro in punta minore di 1 μm , con all'interno un filo in argento ricoperto di cloruro d'argento in punta immerso in una soluzione contenente ioni cloro. Questo elettrodo ha la funzione di registrare un flusso di corrente dall'interno della cellula, ma anche di far scorrere corrente verso l'interno della cellula, grazie alla reversibilità della reazione $\text{Ag}^+ + \text{Cl}^- \rightleftharpoons \text{AgCl} + e^-$ che permette di convertire i flussi di corrente ionici intracellulari in flussi di corrente elettrica e viceversa, Figura 1.4.

Un elettrodo di questo tipo permette di effettuare due diverse tipologie di registrazioni a seconda del verso in cui scorre il flusso ionico. Se la corrente viene fornita dall'esterno alla cellula si può misurare il valore del potenziale di membrana a cui si porta la cellula a causa della corrente applicata, andando a misurare la differenza in tensione tra la punta dell'elettrodo intracellulare e un elettrodo di riferimento posto nel

bagno extracellulare. Questa configurazione viene detta di *current clamp*, viceversa, se alla cellula si impone una differenza di potenziale e si registrano le correnti che ne derivano si parla di configurazione in *voltage clamp*.

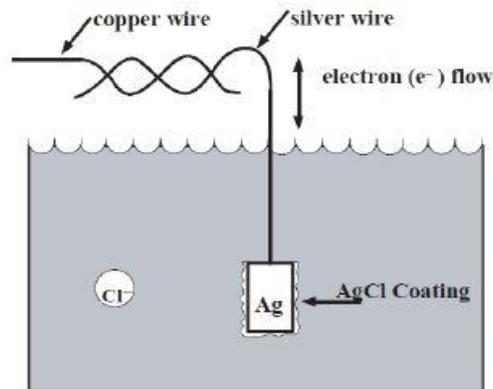


Figura 1.4, Rappresentazione dell'elettrodo in cloruro d'argento in una soluzione contenente ioni cloro. Tratto da [3]

1.2.1 Voltage clamp e AP clamp

La configurazione in *voltage clamp*, sebbene non riproduca un processo fisiologico come invece avviene in *current clamp*, offre alcuni vantaggi. Per prima cosa, fissare il potenziale a un valore costante elimina le correnti capacitive, tranne che per una piccola frazione di tempo successiva al gradino in tensione. Secondo, il flusso di corrente che viene registrato è proporzionale solo alla conduttanza di membrana e quindi alla percentuale di canale aperti a causa di quel valore di potenziale, e infine, per quei canali i cui gates dipendono solo dal potenziale di membrana, la configurazione in *voltage clamp* è utile per determinare la chiusura e l'apertura dei canali ionici. La configurazione classica di *voltage clamp* prevede l'utilizzo di due micropipette inserite dentro la cellula. Questo è ovviamente possibile solo nel caso di cellule di grandi dimensioni, per cui la configurazione in realtà più utilizzata è quella detta di *patch clamp*, che tra l'altro, consente anche di effettuare misure di singolo canale. La configurazione in *whole-cell patch clamp* (Figura 1.5) prevede l'utilizzo di un singolo elettrodo che viene messo in contatto con l'interno della cellula, prima appoggiando la punta della pipetta alla membrana e formando un sigillo tramite

suzione, poi rompendo la porzione di membrana che si trova all'interno della pipetta tramite una suzione aggiuntiva. In questo modo l'interno della cellula è in continuità con la soluzione all'interno della pipetta e i flussi di corrente possono essere registrati dall'elettrodo. La particolarità di questa configurazione sta anche nel fatto che lo stesso elettrodo viene utilizzato per registrare sia la corrente che fluisce attraverso l'elettrodo, sia per portare la cellula al valore di potenziale desiderato. In configurazione di *voltage clamp* possono essere eseguiti diversi protocolli per caratterizzare le correnti in funzione del valore del potenziale di membrana. In un protocollo di *voltage clamp* la cellula viene mantenuta a un valore costante detto V_{hold} a cui si susseguono una serie di gradini a diversi valori V_{step} . Variando i valori di V_{hold} o V_{step} , o il periodo che intercorre tra i gradini, si riescono a ottenere diversi protocolli per studiare aspetti diversi delle correnti ioniche. Grazie agli esperimenti in *voltage clamp* e ai diversi protocolli, A. L. Hodgkin e A. Huxley riuscirono nel 1952 a caratterizzare le correnti di sodio e di potassio che danno origine al potenziale d'azione nei neuroni e a descriverne i gates con una dinamica di prim'ordine esplicitando la dipendenza delle costanti di tempo e dei valori di equilibrio dal valore di potenziale di membrana.

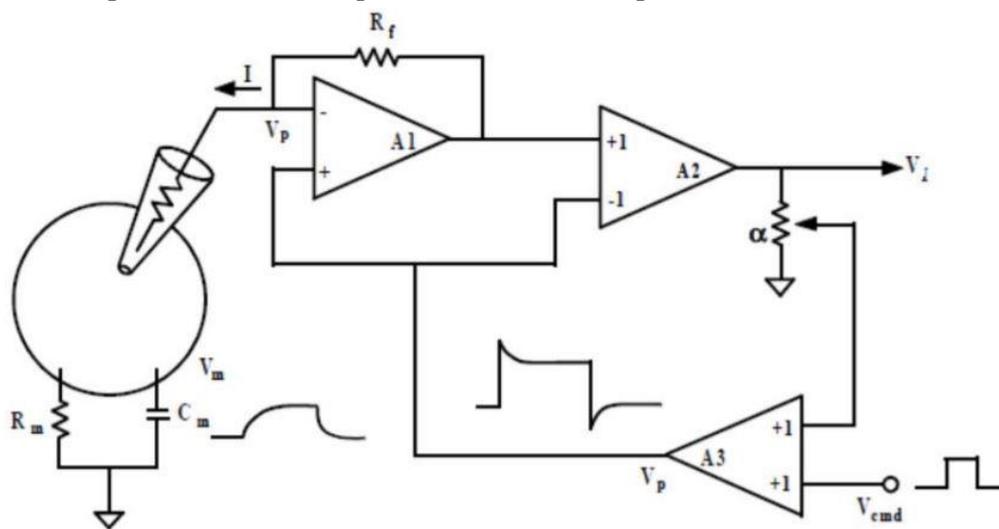


Figura 1.5, Rappresentazione del circuito utilizzato per misure di voltage clamp in una configurazione di patch clamp. Il potenziale di membrana V_m si porta al valore in tensione V_p comandato dal gradino in tensione V_{cmd} . La corrente registrata è rappresentata da V_i . Tratto da [3]

Gli impulsi a gradino con cui vengono effettuati i protocolli in *voltage clamp* non riflettono però l'andamento del potenziale di membrana nel tempo. Un'alternativa, che prende il nome di *AP clamp*, è quella di utilizzare un potenziale d'azione

precedentemente registrato da un cardiomiocita come segnale di comando e registrare l'andamento della corrente che si produce. Andando a utilizzare dei bloccanti sulle varie correnti di interesse, si può registrare l'andamento fisiologico delle correnti durante il potenziale d'azione. Infatti, si registra prima la corrente complessiva in *AP clamp*, poi, utilizzando un bloccante specifico per la corrente di interesse, e assumendo che il bloccante blocchi effettivamente tutti i canali, si ripete la registrazione in *AP clamp*. A questo punto si va a sottrarre alla prima corrente la corrente acquisita in presenza di bloccante, in questo modo si ottiene l'andamento speculare della corrente di interesse. In questo elaborato si è ipotizzato di operare con sistemi eterologhi con sovra espressa solo la corrente di interesse, per cui anche durante le acquisizioni in *AP clamp* non è necessario l'utilizzo di bloccanti specifici. Questa tecnica può rivelarsi utile per testare nuovi modelli di potenziale d'azione, andando a confrontare la corrente prodotta dal modello e la corrente acquisita in *AP clamp* utilizzando il potenziale d'azione prodotto dal nuovo modello in silico.

1.2.2 Dynamic clamp

La tecnica di *dynamic clamp* è una tecnica di misurazione elettrofisiologica che, a partire dagli anni Novanta, si è rilevata utile nello studio dei canali ionici e delle relative correnti in quelle cellule che danno origine ad un potenziale d'azione, come neuroni e cardiomiociti. L'idea di creare una connessione tra software e materiale biologico risale ai primi esperimenti in *patch clamp* e la tecnica di *dynamic clamp* permette proprio di avere un'integrazione diretta tramite un circuito chiuso tra un modello in silico e una cellula in vitro.

Nel 1979, fu ideato un sistema in cui due cellule isolate, e non fisicamente in contatto, potevano essere accoppiate elettricamente tramite un circuito analogico esterno che continuamente applicava una corrente tempo-dipendente a ciascuna delle due cellule con un'intensità di corrente pari a quella che si sarebbe osservata se le due cellule fossero state fisicamente accoppiate tramite *gap junction*. Tramite un microelettrodo veniva continuamente misurato il potenziale di membrana delle due cellule, poi una corrente proporzionale alla differenza dei due potenziali veniva iniettata in ciascuna

delle due cellule tramite una resistenza. Viceversa, lo stesso circuito fu usato per compensare la corrente che fluisce nelle *gap junction* tra due cellule accoppiate. Sempre misurando il potenziale di membrana di entrambe le cellule, e iniettando una corrente di accoppiamento stimata fino a osservare il disaccoppiamento elettrico delle due cellule, si poté stimare la resistenza di *gap junction* tra due cluster. Poco tempo dopo l'introduzione delle tecniche di *dynamic clamp* nell'elettrofisiologia cardiaca, tecniche simili furono introdotte indipendentemente nel campo della neurofisiologia con il nome di "*conductance injection*". Sebbene la tecnica di *dynamic clamp* abbia avuto origine nell'elettrofisiologia cardiaca, è sicuramente diventata una tecnica più comune in neurofisiologia dove viene utilizzata in particolare per lo studio delle attività sinaptiche [4].

Negli esperimenti sui neuroni, infatti, l'obiettivo è quello di investigare la relazione tra una determinata corrente sinaptica e i suoi effetti sul potenziale di membrana, e conseguentemente sulla genesi del potenziale d'azione. In un semplice esperimento in *current clamp*, la corrente che viene iniettata nella cellula è costante, e non riproduce gli effetti di una conduttanza variabile sul neurone, mentre è interessante misurare la variazione del potenziale di membrana in risposta ad una specifica variazione della conduttanza. Le tecniche tradizionali di *voltage clamp* o *current clamp* non sono adatte a questa situazione, in quanto in *voltage clamp* si riesce a misurare un transitorio di corrente ma non si ha più informazione di come varia il potenziale in risposta a esso, e viceversa in *current clamp*. In questa situazione, una tecnica come quella di *dynamic clamp*, che permette di costruire un ciclo in feedback tra cellula e software, risulta utile. Ad esempio, si può lavorare in *current clamp*, iniettando una corrente e andando a misurare come varia istantaneamente il potenziale di membrana, e andando a utilizzare questo valore di potenziale per ricalcolare in real-time il valore di corrente tramite un opportuno modello in silico [5].

Per quanto riguarda gli esperimenti in elettrofisiologia cardiaca la tecnica di *dynamic clamp* può essere usata per accoppiare elettricamente più cellule, siano esse un cardiomiocita, un sistema eterologo in cui è sovra espressa una corrente di interesse, oppure un modello computazionale che simuli le proprietà di un cardiomiocita.

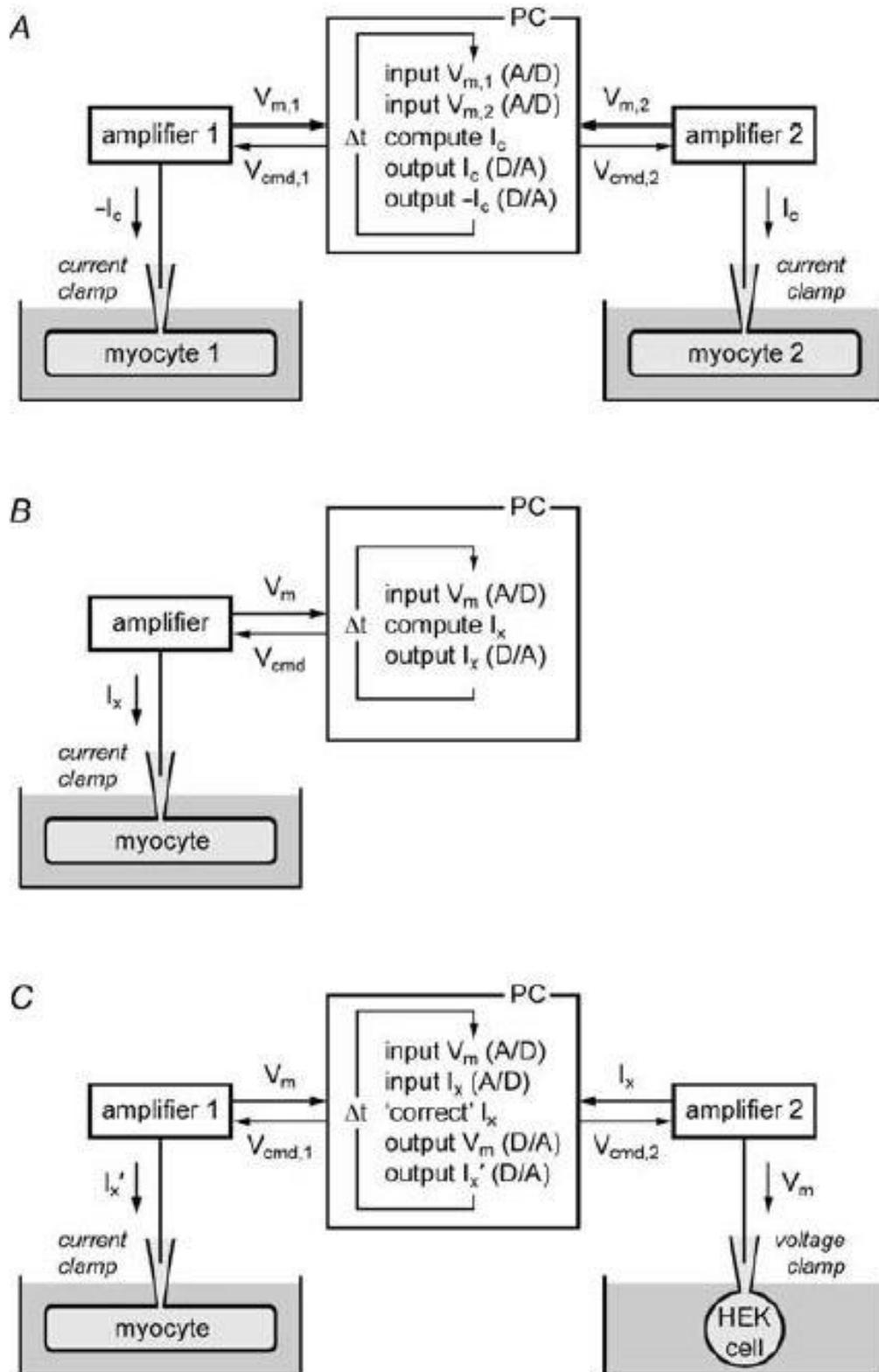


Figura 1.6, Le tre configurazioni in dynamic clamp: A) Coupling clamp, B) Model clamp e C) Dynamic action potential clamp. Tratto da [6]

Le configurazioni per operare in *dynamic clamp* sono tre, e dipendono dal tipo di *clamp* che viene eseguito. La prima configurazione, Figura 1.6A, è proprio quella detta di *coupling clamp*, ovvero la prima configurazione in cui venne utilizzata la tecnica di *dynamic clamp* per accoppiare elettricamente due cellule isolate. Sono necessari perciò due diverse cellule con i rispettivi sistemi di *patch clamp* e un modello per la stima della corrente. La seconda configurazione detta *model clamp*, Figura 1.6B, prevede l'utilizzo di un solo cardiomiocita in cui viene continuamente iniettata una corrente. Questa corrente, voltaggio-dipendente, viene stimata in real-time tramite un modello in silico, da cui questa tecnica prende il nome, che tiene conto del valore di potenziale di membrana del cardiomiocita a sua volta misurato e dato in input al calcolatore. Un utilizzo di questa tecnica sono gli esperimenti in elettrofisiologia con cellule hPSC, ovvero cellule staminali umane pluripotenti indotte, che però mostrano una naturale mancanza di corrente I_{K1} , e per questo hanno comportamenti diversi dai cardiomiociti adulti. Per far sì che gli esperimenti condotti su questo tipo di cellule rifletta il comportamento di cellule adulte, viene iniettata corrente di potassio I_{K1} , calcolata grazie a un modello di cardiomiocita ventricolare umano tenendo conto del valore di potenziale di membrana della cellula, tramite la tecnica di *dynamic clamp*. In questo modo anche le cellule hPSC riescono a raggiungere un potenziale di membrana a riposo e una durata del potenziale di azione simile ai cardiomiociti adulti, andando a eliminare la loro tipica auto eccitabilità [7].

La terza configurazione viene detta *dynamic action potential clamp*. In questa configurazione si hanno due cellule in *patch clamp*, un cardiomiocita in cui è stato farmacologicamente bloccato un canale di interesse e un sistema eterologo, e un circuito per mettere in connessione le due cellule. Invece che iniettare al cardiomiocita una corrente calcolata tramite un modello matematico, si cerca di riprodurre una situazione più fisiologica in cui la corrente viene prelevata da una cellula in vitro. Come si vede in Fig. 1.6C, il cardiomiocita si trova perciò in configurazione di *current clamp*, mentre la corrente del sistema eterologo viene prelevata in *voltage clamp*, utilizzando il valore di potenziale di membrana che viene continuamente misurato dal cardiomiocita, realizzando perciò una configurazione di *AP clamp*, dove i valori di

potenziale di membrana sono direttamente correlati all'esperienza attuale invece che essere presi da un potenziale d'azione precedentemente registrato.

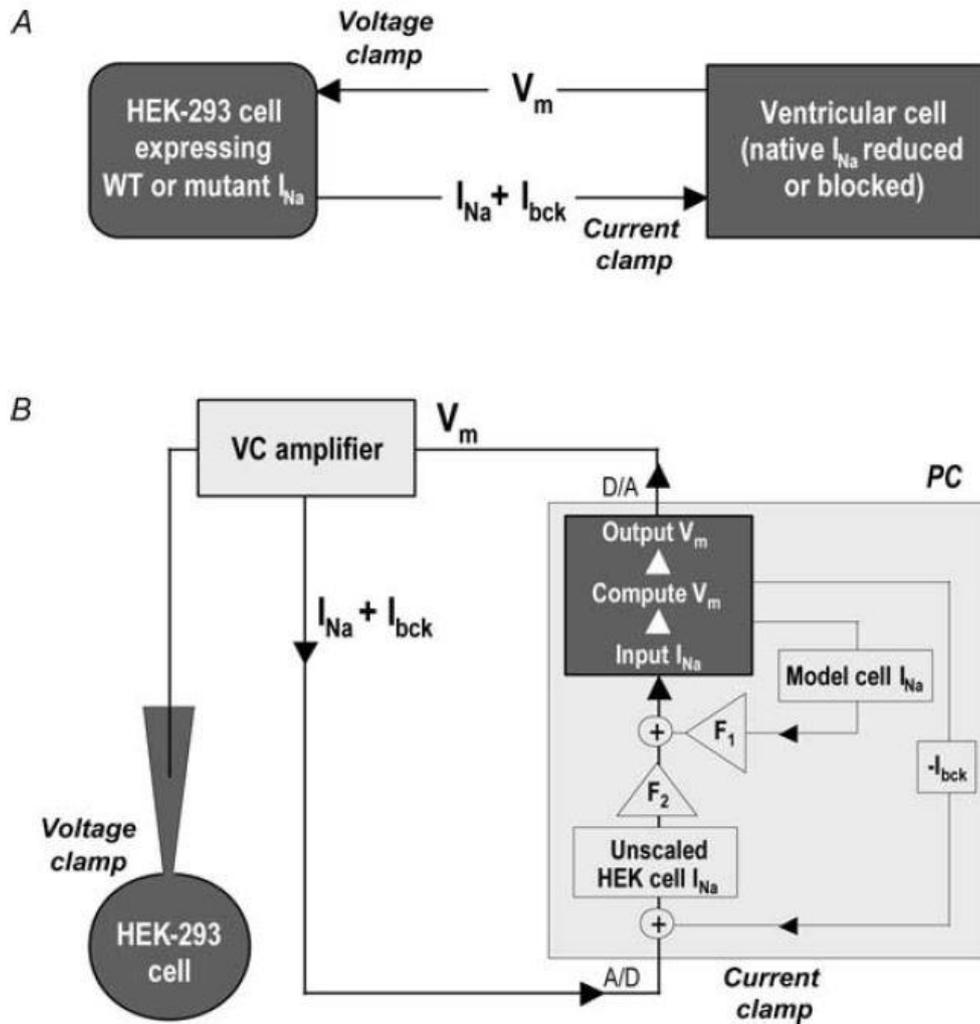


Figura 1.7, A) Dynamic action potential clamp creato tramite circuito chiuso tra un sistema eterologo e un cardiomiocita. B) Dynamic action potential clamp creato tramite circuito chiuso tra un sistema eterologo e un modello in silico, con relativa conversione analogico-digitale e viceversa. Tratto da

[8]

In questo modo viene mantenuta la voltaggio-dipendenza della corrente, che rispecchia proprio il comportamento di un determinato canale quando il cardiomiocita si trova ad un determinato valore di potenziale. Il vantaggio di questa operazione risiede nel fatto che per osservare i cambiamenti nel potenziale di azione dovuti a una certa corrente, non è necessaria la descrizione matematica della corrente che si vuole analizzare. Grazie a questa tecnica è anche possibile valutare gli effetti di correnti provenienti da

geni mutati o sotto l'azione di farmaci, in quanto non è necessaria una descrizione matematica dettagliata perché la corrente viene prelevata direttamente dalla cellula in vitro. Osservando dati ottenuti in questo modo può risultare più facile comprendere i meccanismi che legano l'andamento della corrente al potenziale d'azione, essendo gli andamenti di potenziale e corrente strettamente correlati.

Una variazione a questa configurazione prevede l'utilizzo di un modello in silico di potenziale d'azione cardiaco al posto del cardiomiocita, Figura 1.7B. Questo tipo di *dynamic clamp* può anche essere definito *model-cell mode* proprio perché si vanno ad accoppiare una cellula in vitro con un modello in silico. Il modello in silico, in cui sono state eliminate le equazioni relative alla corrente dal sistema eterologo, deve generare in real-time il valore del potenziale d'azione, elaborato sulla base della corrente acquisita, che viene poi utilizzato come valore di *AP clamp* per la cellula in vitro.

- **Set up per dynamic clamp**

Per realizzare un esperimento in *dynamic clamp* sono necessarie una strumentazione hardware e un software dedicato. Il software usato per il *dynamic clamp* deve essere in grado di campionare in modo continuo uno o più segnali analogici, eseguire i calcoli necessari prendendo in input i segnali acquisiti per ottenere l'output desiderato e mandare in output il risultato. Un problema che può sorgere negli esperimenti in *dynamic clamp* è il ritardo che intercorre tra quando viene misurato il segnale di input e quando viene fornito il segnale di output. Questo comprende il tempo necessario per acquisire e convertire il segnale in digitale, quello per effettuare il calcolo computazionale del valore di uscita e convertirlo in analogico. Essendo il modello matematico un sistema di equazioni differenziali, è fondamentale tenere conto della velocità del processore. Il secondo fattore limitante di questo processo è la velocità di acquisizione dati, perciò è fondamentale avere un convertitore analogico digitale che permetta una veloce conversione dei segnali acquisiti in digitale e dei segnali in output in analogico, specialmente se si ha più di un segnale in input, insieme ad un'alta risoluzione, usando ad esempio una conversione a 16 bit, per minimizzare l'errore nella discretizzazione. Con una strumentazione adeguata è possibile arrivare ad una frequenza di campionamento di 10 kHz e oltre, con tempi di campionamento anche

minori di 100 μ s [4]. In generale, è importante lavorare con un passo temporale minore della più piccola costante di tempo del sistema, che solitamente è rappresentata dalla costante di tempo della corrente di sodio $I_{Na,fast}$. Un ulteriore accorgimento da tenere presente è quello di utilizzare un sistema operativo che assicuri che il passo temporale selezionato venga mantenuto il più possibile costante e con una minima presenza di *jitter*, ovvero una variazione nell'intervallo di tempo con cui vengono ricevuti o trasmessi i dati. Ad esempio, a una frequenza di 10 kHz, il periodo di tempo dovrebbe essere di 100 μ s, ma può accadere che si abbiano dei passi temporali di 97 o 103 μ s. Questo fenomeno è praticamente inesistente se si opera solo con un'implementazione hardware, ma non può essere evitato quando si utilizza un sistema operativo. Questo problema può essere contenuto utilizzando un sistema operativo in cui sono presenti solo due processi: il software che opera in real-time detiene la massima priorità, e perciò viene garantito che il campionamento e le operazioni di calcolo siano eseguite effettivamente in real-time, mentre il sistema operativo standard ha una bassa priorità e può essere interrotto dal software real-time. Un esempio di software è RTX1, Real-Time eXperiment Interface, che opera in ambiente Linux.

1.2.3 Automated patch clamp

Il sistema di acquisizione che si vuole utilizzare per effettuare questo esperimento in *dynamic clamp* è un sistema che permette il *patch clamp* automatico di più cellule in parallelo. Un esempio di tale macchinario è il SinchroPatch 384i, prodotto da Nanion, che permette di effettuare il *patch clamp* di 384 cellule poste ciascuna in un pozzetto dedicato. Questo sistema permette di lavorare con un alto numero di cellule e di accorciare i tempi necessari per effettuare il *patch clamp*, in questo modo il numero di pozzetti funzionanti a disposizione dell'esperimento rimane comunque elevato anche in presenza di una percentuale rilevante, ad esempio il 30%, di *patch clamp* falliti. Per questo progetto, un sistema di acquisizione di questo tipo risulta particolarmente adatto in quanto permette di lavorare con molte cellule in parallelo e avere così un numero significativo di dati, in modo più veloce rispetto alle tecniche di *patch clamp* tradizionale.

Il gold standard per la tecnica di *patch clamp* è attualmente rappresentato dalla tecnica manuale inventata da Neher e Sakmann nel 1992 (Figura 1.8A). L'operatore deve appoggiare la punta della micropipetta alla cellula per creare il sigillo e mettere in connessione l'interno della pipetta con il citoplasma cellulare. Questo sigillo avviene quando la membrana cellulare si lega chimicamente con la punta della pipetta e assicura che la corrente prelevata fluisca all'interno della micropipetta e non ci sia corrente di leakage. Il sigillo viene detto *gigaseal* in quanto è necessario che l'impedenza elettrica misurata sia dell'ordine dei gigaohm per garantire una misura accurata. Per creare il sigillo è necessario posizionare la pipetta alla giusta distanza dalla cellula e aspirare leggermente la membrana all'interno della pipetta. L'operatore muove la micropipetta tramite un micromanipolatore, che assicura una maggiore precisione nei movimenti, fino a che un valore opportuno del sigillo non viene raggiunto. Questo processo richiede tipicamente mesi di addestramento prima che l'operatore sia in grado di effettuare misurazioni precise. La complessità dell'operazione riduce il numero di misurazioni che un operatore può effettuare incrementando così i costi della procedura.

Le tecniche di *patch clamp* automatico possono variare a seconda dello stato in cui si trovano le cellule. Ad esempio, le cellule in vitro possono essere poste in sospensione, Figura 1.8B, e la micropipetta può essere sostituita da un microchip con dei piccoli fori (1-2 μm di diametro) su cui le cellule si posizionano automaticamente in pochi secondi, grazie a una leggera suzione (200-600 mbar), in questo modo, non è necessario utilizzare un manipolatore per posizionare le cellule [9]. Il *gigaseal* per ottenere la configurazione *whole-cell*, viene creato tramite una successiva suzione di minor durata ma maggiore intensità, che rompe la porzione della membrana cellulare posizionata sopra il microforo. La base del microchip separa il bagno in cui sono contenute le cellule, che rappresenta la soluzione extracellulare, dalla soluzione intracellulare, tradizionalmente contenuta nella micropipetta. Ogni foro è in collegamento con un compartimento isolato, detto pozzetto, contenente la soluzione extracellulare in modo da poter effettuare la misura dell'attività elettrica sulla singola cellula.

Un sistema di acquisizione con microchip ha il beneficio di poter effettuare più misure in parallelo senza l'intervento di un operatore. Un ulteriore vantaggio, che viene

offerto dai macchinari di *patch clamp* automatico, è quello di poter visualizzare una stima dei parametri del *patch clamp* di ogni singolo pozzetto, ad esempio il valore di resistenza del *gigaseal* o una sua rappresentazione in codice colore, oppure il valore della resistenza serie, così da poter escludere quelle cellule in cui non si è raggiunta la qualità del *patch clamp* desiderata [10]. Inoltre, maneggiare cellule in sospensione è più facile rispetto alle cellule in cultura o in vivo, perciò le misure di *patch clamp* possono essere molto più veloci, e, essendo in sospensione, le cellule sono staccate l'una dalle altre e questo permette di effettuare misure precise in ambiente controllato senza l'interferenza di altre cellule.

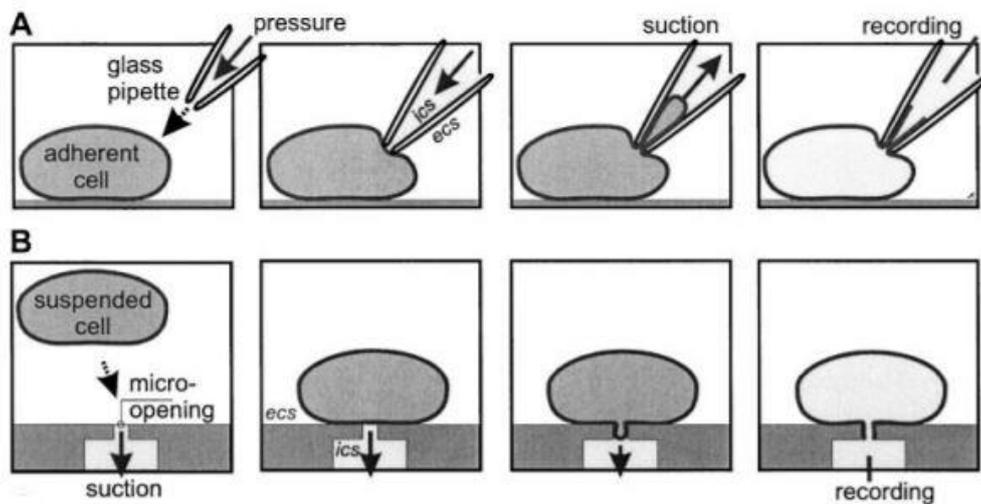


Figura 1.8, A) Configurazione di whole-cell patch clamp con metodo tradizionale. B) Patch clamp con cellule in sospensione e microchip forato. Tratto da [11]

1.3 LA MODELLISTICA CARDIACA

Nel 1952 A.L. Hodgkin e A. Huxley pubblicarono uno studio [12] in cui proponevano un modello matematico di potenziale d'azione nell'assone gigante di calamaro, sfruttando i dati provenienti dagli esperimenti in *voltage clamp*. Il modello descriveva l'evoluzione nel tempo del potenziale di membrana conseguente alle variazioni di concentrazioni intra ed extra cellulari causate dalle correnti attraverso la membrana cellulare, che a loro volta presentavano una dinamica dipendente dal potenziale di membrana. La voltaggio-dipendenza delle correnti venne modellata grazie alla

dinamica di prim'ordine dei gates, sia di attivazione che di inattivazione, che rappresenta i cambiamenti conformazionali dei canali ionici. Nel 1962 D. Noble sviluppò il primo modello di potenziale d'azione specifico per i cardiomiociti basandosi sul modello di Hodgkin-Huxley [13]. Negli ultimi 50 anni nuovi modelli di potenziale d'azione cardiaco sono stati sviluppati seguendo una formulazione alla Hodgkin-Huxley includendo nuovi canali ionici e meccanismi di trasporto attivo, come pompe e scambiatori. Questi modelli sono stati utilizzati per investigare meccanismi biologici, per comprendere l'origine di certi fenomeni patologici, e recentemente, per predire l'effetto di farmaci. Ogni modello è differente da un altro per diversi motivi, sebbene molti modelli siano stati sviluppati come estensioni di modelli precedenti. Prima di tutto, bisogna tenere conto del tipo di cellula su cui è stato sviluppato il modello. Attualmente i modelli di potenziale d'azione cardiaco spaziano dalle cellule del nodo seno atriale, alle cellule del Purkinje e ai cardiomiociti ventricolari ma anche cardiomiociti provenienti da differenti specie animali (e.g. guinea pig, coniglio, ratto). Ogni modello presenta una formulazione diversa per le correnti ioniche, così come il numero e la scelta di correnti che vengono modellate varia per ciascun modello. Ad esempio, i primi modelli sviluppati presentavano poche correnti e non comprendevano meccanismi di trasporto attivo, successivamente i meccanismi di funzionamento di pompe e scambiatori fu maggiormente studiato e i modelli successivi ne aggiunsero le descrizioni matematiche. Allo stesso modo, modelli recenti presentano formulazioni diverse per correnti attraverso canali ionici codificati da geni diversi, mentre in modelli precedenti queste correnti potevano essere riunite in un'unica corrente a seconda dello ione interessato, un esempio è proprio la corrente di potassio, che nel tempo è stata divisa in correnti diverse come I_{Kr} e I_{Ks} . Anche il numero di compartimenti considerati può essere differente, i primi modelli consideravano l'interno della cellula come un unico compartimento, per arrivare a modelli multi-compartimentali in cui l'interno della cellula viene suddiviso per tenere conto dei diversi livelli di concentrazioni ioniche all'interno della cellula. In più il reticolo sarcoplasmatico rappresenta un compartimento a sé stante la cui descrizione fu fondamentale nel descrivere il meccanismo di accoppiamento eccitazione-contrazione.

Al giorno d'oggi, i modelli di potenziale d'azione cardiaco si rivelano essere degli strumenti importanti in quanto forniscono una descrizione quantitativa dei meccanismi biologici e possono essere utilizzati sia per comprendere certi meccanismi sia per predirli. In un modello in silico le descrizioni matematiche delle correnti vengono elaborate insieme per riprodurre il potenziale d'azione, in questo modo, grazie all'utilizzo del modello si possono osservare anche meccanismi complessi dove più correnti interagiscono tra loro ed esaminare il contributo complessivo al potenziale d'azione.

1.4 LA VALUTAZIONE DELLA SAFETY NEI FARMACI

Lo sviluppo di farmaci è un processo lungo e costoso. Un nuovo farmaco, non solo deve essere efficace per lo scopo per cui viene prodotto, ma deve anche essere sicuro e avere un numero limitato di effetti collaterali. Per questo motivo un aspetto importante nella produzione di nuovi farmaci è proprio la valutazione della sicurezza sin nella fase iniziale dello sviluppo, in modo da scartare quei composti che potrebbero rivelarsi non sicuri. In particolar modo deve essere testato l'eventuale effetto proaritmico, anche in quei farmaci non destinati alla cura di malattie cardiovascolari, specialmente per quello che riguarda la probabilità di provocare una particolare aritmia ventricolare chiamata torsione di punta. Questo tipo di aritmia è sì rara ma fatale, per cui diventa essenziale scartare farmaci potenzialmente proaritmici prima dei trials clinici. Per valutare la sicurezza di nuovi composti si utilizzano alcuni biomarker che sono stati associati a un maggior rischio di torsione di punta. Uno di questi biomarker è la capacità di un farmaco di bloccare i canali hERG, e quindi la corrente I_{Kr} , e di prolungare la durata del potenziale d'azione, effetto che si manifesta poi come un prolungamento dell'intervallo QT dell'elettrocardiogramma.

Un metodo per testare l'effetto di un composto su una corrente è quello di operare degli esperimenti in *voltage clamp* con diverse concentrazioni di farmaco. Andando a

registrare il picco di corrente ottenuto per ogni diversa concentrazione e confrontandolo con l'ampiezza del picco registrato in assenza di farmaco, si può ricostruire una curva che mette in relazione la percentuale di corrente bloccata con la concentrazione del farmaco. Questi dati possono essere interpolati grazie a una funzione sigmoidale, in modo che la capacità di bloccaggio di un composto per una specifica corrente sia rappresentato interamente dai parametri IC_{50} e dal coefficiente di Hill.

Su questi due biomarker sono state sollevate obiezioni, in particolare sull'effettiva capacità predittiva del rischio proaritmico. Un'ulteriore obiezione sollevata riguarda l'effetto che queste linee guida hanno sullo sviluppo di nuovi farmaci e su quei composti il cui sviluppo viene precocemente scartato a causa dell'affinità con i canali hERG ma che non necessariamente implicava un effetto proaritmico [14]. I test per valutare l'affinità di un composto con il canale hERG sono infatti altamente sensibili, ma risultano poco specifici. Queste limitazioni hanno portato alla creazione di un'iniziativa, *Comprehensive in Vitro Proarrhythmia Assay* (CiPA, Figura 1.9) promossa da FDA, l'ente statunitense per la regolamentazione di prodotti alimentari e farmaceutici, per portare una modifica alle linee guida includendo la valutazione di più canali ionici e l'utilizzo di modelli in silico, e l'uso di altri biomarker, ad esempio la post-depolarizzazione precoce (EAD). In particolare, osservando l'effetto di un composto su più correnti e integrandole grazie a un modello di potenziale d'azione si può valutare il risultato complessivo e stimare correttamente e più efficientemente i nuovi composti sin nelle fasi iniziali di sviluppo. Infatti, un farmaco potrebbe bloccare i canali hERG, e quindi essere classificato come proaritmico, ma allo stesso tempo agire anche come bloccante di correnti depolarizzanti, facendo sì che complessivamente non vi sia un allungamento eccessivo dell'intervallo QT.

Le prime due fasi di valutazione, suggerite dall'iniziativa CiPA, consistono nella valutazione degli effetti sulle singole correnti e la successiva integrazione di questi effetti con un modello in silico. Nella prima fase deve essere determinata la capacità di un composto di bloccare una certa percentuale di corrente, e questo può essere realizzato tramite una procedura di *patch clamp* tradizionale, che però risulta lenta e costosa e ha un rendimento troppo basso per poter essere utile a livello commerciale,

oppure utilizzando un macchinario di *patch clamp* automatico in parallelo in modo da avere un maggior numero di dati in poco tempo e poter investigare più correnti. Grazie poi all'utilizzo dei modelli in silico si possono simulare in modo economico e veloce un'ampia varietà di scenari andando a simulare concentrazioni diverse di farmaco, e quindi diverse percentuali di canali ionici bloccati, per predire il rischio proaritmico di tale composto.

Comprehensive *In Vitro* Proarrhythmia Assay: Four Components

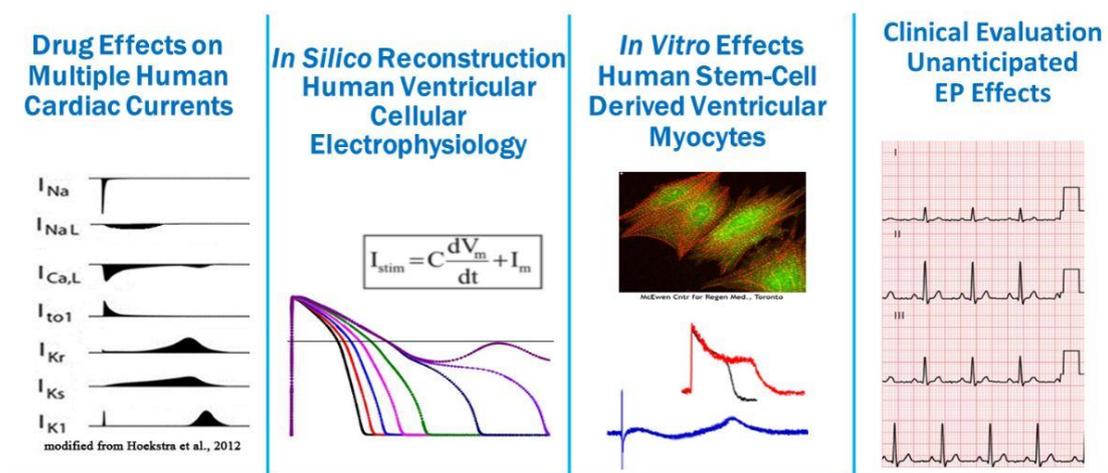


Figura 1.9, Le diverse fasi comprese dall'iniziativa CiPA per la valutazione della safety dei farmaci durante la fase di sviluppo. Tratto da [15]

1.5 VALUTARE LA PROARITMICITÀ IN UN ESPERIMENTO IN DYNAMIC CLAMP

Un limite di questo metodo di valutazione dell'effetto dei farmaci sulle correnti è che dipende dall'accuratezza con cui viene descritta la capacità del farmaco di bloccare la corrente. La descrizione tramite IC_{50} è una descrizione semplice ma che non include la cinetica con cui il farmaco blocca i canali e che perciò non può essere inclusa nella simulazione in silico. Da queste considerazioni e in linea con le proposte dell'iniziativa CiPA, è nata l'idea di utilizzare un macchinario di *patch clamp* automatico in parallelo

per un esperimento in *dynamic clamp* per valutare la safety dei farmaci. Tramite un esperimento in *dynamic clamp* è possibile incorporare nei modelli in silico l'interazione di un farmaco con i canali ionici senza doverne fornire una descrizione matematica. Il composto può essere messo direttamente a contatto con le cellule in vitro, nelle concentrazioni desiderate, e gli effetti dei differenti bloccaggi combinati tra loro possono essere visualizzati direttamente sul potenziale d'azione prodotto dal modello in silico. Questo riduce il numero di ipotesi su cui si basa la valutazione in modo da aumentare la capacità predittiva del test. Inoltre, facendo uso di uno strumento per il *patch clamp* automatico si riesce ad avere un'elevata quantità di dati agevolando il futuro utilizzo di una tecnica simile in ambito industriale.

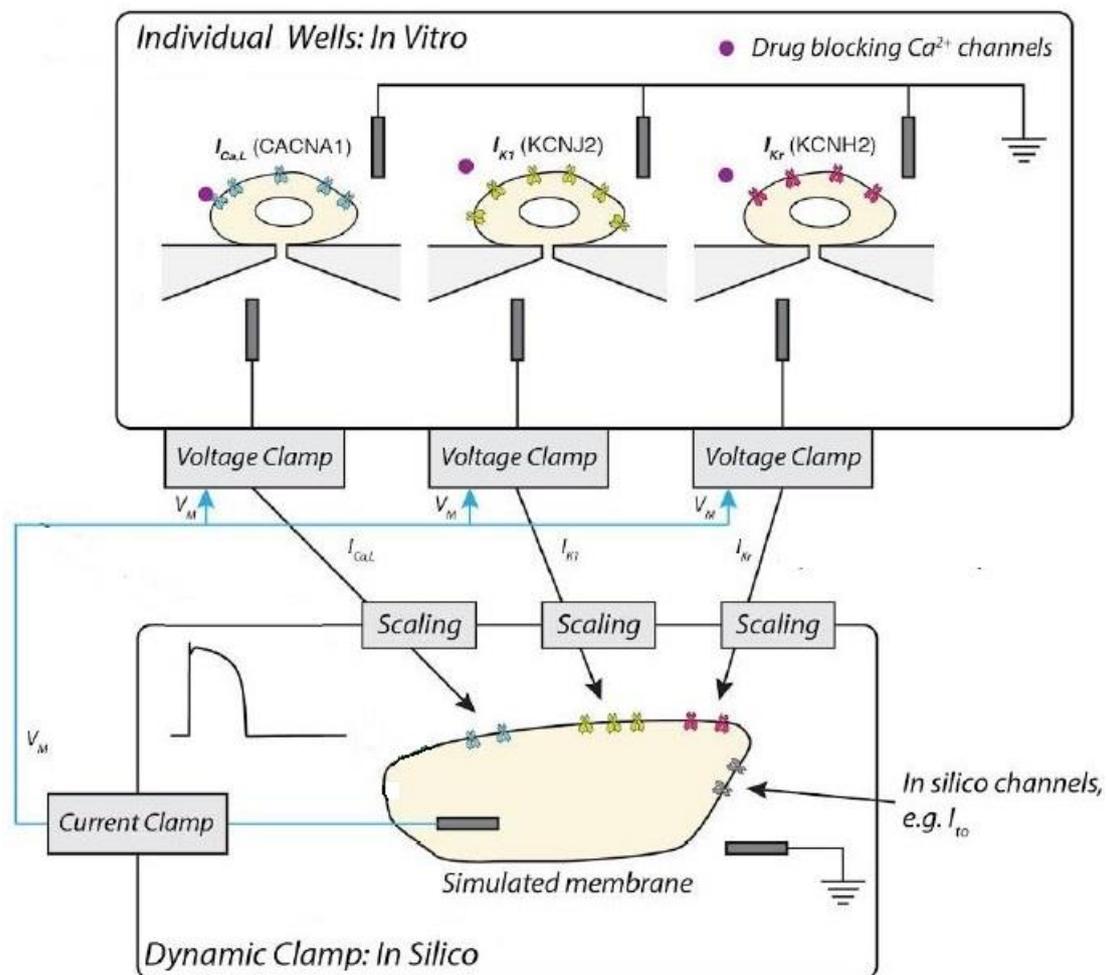


Figura 1.10, Schematizzazione del funzionamento dell'esperimento in *dynamic clamp* considerando tre cellule diverse che esprimono ognuna una corrente (I_{CaL} , I_{Kr} e I_{K1}). Tratto da [17]

In un esperimento in *dynamic clamp* è possibile creare un modello ibrido connettendo una cellula in vitro con un modello in silico tramite una simulazione real-time. Le

cellule si trovano in una situazione di *AP clamp*, dove il potenziale di comando è quello che viene elaborato in real-time dal modello in silico, mentre il modello si trova in una situazione di *current clamp*, in quanto gli vengono dati in input i valori corrispondenti delle correnti prelevate dalle cellule in vitro, come schematizzato in Figura 1.10. Il modello in silico utilizzato è il modello di O'Hara-Rudy [16] in cui sono state eliminate le descrizioni matematiche delle correnti prelevate dalle cellule in vitro. Questo modello è basato su dati provenienti da cardiomiociti ventricolari umani, in questo modo l'obiettivo è quello di ricreare una situazione il più simile possibile alla realtà.

Un sistema di questo tipo, per poter essere utilizzato nella valutazione della safety cardiaca, deve assicurare dei risultati che rispecchino la realtà del potenziale d'azione cardiaco. Questo significa che il sistema di acquisizione delle correnti non deve introdurre errori e rumore che inficiano eccessivamente il potenziale d'azione prodotto dal modello in silico. In questo elaborato è stata implementata una simulazione del sistema per valutare prima i protocolli necessari per un corretto funzionamento dell'esperimento in *dynamic clamp*, poi per effettuare un'analisi delle possibili cause di errore da parte del sistema di acquisizione, così come una simulazione di valutazione dell'effetto di farmaci in un esperimento di *dynamic clamp*.

Capitolo 2

METODI

2.1 MODELLO IN SILICO DI O'HARA-RUDY

Gli esperimenti di elettrofisiologia, essenziali per comprendere i meccanismi aritmici del cuore, sono solitamente eseguiti su canali espressi in cellule diverse dai cardiomiociti oppure su cardiomiociti non umani, a causa della difficile reperibilità di cardiomiociti umani sani. Un'alternativa valida per valutare le variazioni sul potenziale d'azione cardiaco risulta essere l'utilizzo di modelli computazionali, da soli o associati a esperimenti su cellule in vitro, anche se molti dei modelli computazionali di potenziale d'azione cardiaco presenti in letteratura sono stati realizzati partendo da dati di cardiomiociti animali, come coniglio o topo. Tra specie diverse, anche se tutti mammiferi, esistono differenze nella struttura e nel funzionamento dei canali ionici, quindi anche i meccanismi che si vogliono studiare risultano essere fortemente specie dipendenti. Questo può essere un fattore che limita l'utilizzo dei modelli matematici di cardiomiociti nello studio computazionale dell'elettrofisiologia cardiaca umana e di un loro utilizzo nella pratica clinica.

Il modello di O'Hara-Rudy [16] è un modello di potenziale d'azione di cardiomiocita ventricolare di seconda generazione realizzato partendo da dati provenienti da cardiomiociti umani e validato con essi, che perciò rispecchia maggiormente le caratteristiche e i comportamenti di un cuore sano. Attualmente, questo modello rappresenta il gold standard tra i modelli computazionali di un cardiomiocita ventricolare umano sano. Non solo il modello riesce a riprodurre una durata fisiologica del potenziale d'azione cardiaco, ma sono stati indagati anche altri meccanismi del potenziale d'azione, ad esempio meccanismi di restituzione cardiaca e di *rate dependance*. Il modello prende il nome di ORd, O'Hara-Rudy *dynamic*, dove *dynamic* sta a indicare che sono stati presi in considerazione anche i bilanci delle concentrazioni ioniche nel citoplasma. In più, questo modello è in grado di rappresentare l'eterogeneità transmurale del miocardio, riuscendo a riprodurre i potenziali d'azione

di cellule endocardiche, epicardiche e cellule M. Il potenziale d'azione preso come riferimento è quello delle cellule endocardiche, da cui sono stati derivati gli altri due modelli.

Il modello di O'Hara-Rudy è stato costruito come modello alla Hodgkin-Huxley, ovvero sono presenti tanti moduli quante sono le correnti descritte, questo permette di sostituire la descrizione di una determinata corrente con un'altra equazione, ad esempio sottoforma di modello Markoviano oppure con una formulazione che comprenda la mutazione del canale ionico, ma anche di andare a eliminare la descrizione della corrente nel modello per sostituirla con un input preso dall'esterno, ad esempio con la corrente prelevata da una cellula in-vitro.

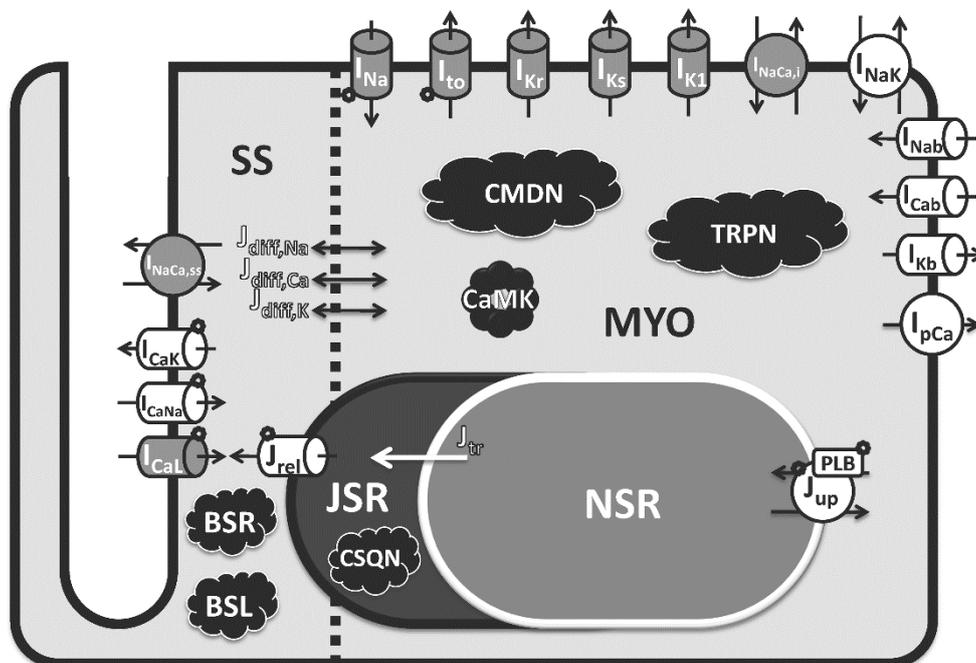


Figura 2.1, Schema del Modello O'Hara Rudy tratto da O'Hara et al. 2011 [16]

La Fig. 2.1 mostra lo schema del modello, già utilizzato in precedenza, a cui è stata aggiunta la regolazione da parte di CaMK su alcuni canali. A differenza dei modelli matematici precedenti, le equazioni delle correnti e dei flussi vennero riformulate basandosi su esperimenti provenienti da esperimenti su cardiomiociti umani sani, e validati con registrazioni prese da cardiomiociti ventricolari sani a 37 °C. Il modello include quattro compartimenti:

- Il mioplasma (MYO)
- Il reticolo sarcoplasmatico detto *junctional* (JSR), che comprende i recettori della rianodina
- Il reticolo sarcoplasmatico detto *network* (NSR), che comprende la pompa SERCA
- Il *subspace* (SS), definito come lo spazio di mioplasma vicino ai tubuli T.

Le correnti del mioplasma sono:

- corrente di sodio, che comprende sia $I_{Na_{fast}}$ che $I_{Na_{late}}$;
- corrente di potassio transiente uscente (I_{to});
- corrente di potassio rettificante ritardata rapida (I_{Kr});
- corrente di potassio rettificante ritardata lenta (I_{Ks});
- corrente di potassio rettificante entrante (I_{K1});
- corrente dello scambiatore sodio-calcio ($I_{NaCa,i}$), che tiene conto dell'80% del totale di questa corrente nel cardiomiocita;
- corrente della pompa sodio-potassio (I_{NaK});
- correnti di background (I_{Nab} , I_{Cab} e I_{Kb});
- corrente della pompa calcio del sarcolemma (I_{pCa}).

Le correnti del *subspace* sono:

- corrente di calcio L-type (I_{CaL}), non totalmente selettiva con una corrente di sodio entrante (I_{CaNa}) e una di potassio uscente (I_{CaK});
- corrente dello scambiatore sodio-calcio ($I_{NaCa,ss}$), che tiene conto del rimanente 20% di questa corrente.

I flussi ionici sono:

- flusso di calcio attraverso i recettori della rianodina (J_{rel});
- flusso di calcio tra NSR e JSR (J_{tr});
- riassorbimento di calcio nel NSR tramite la pompa SERCA (J_{up});
- diffusione tra *subspace* e mioplasma ($J_{diff,Na}$, $J_{diff,Ca}$ e $J_{diff,K}$).

I buffer del calcio sono:

- calmodulina (CMDN);
- troponina (TRPN);
- calsequestrina (CSQN);
- siti di legame del calcio (BSR, BSL);
- protein-chinasi dipendente dalla calmodulina (CaMK).

In totale, il modello di O'Hara-Rudy prevede 41 variabili di stato, tenendo conto anche della regolazione da parte di CaMK, e altrettante equazioni differenziali e relative condizioni iniziali. Ai fini di questo progetto, il modello è stato implementato in ambiente Simulink® e risolto con il metodo 'ode15s'.

A questo modello sono state apportate alcune modifiche per poterlo utilizzare in una simulazione di *dynamic clamp*. Innanzitutto, sono stati eliminati tutti i sistemi di equazioni per calcolare le correnti I_{Kr} e I_{K1} dato che queste vengono prelevate dai vari sistemi eterologhi, così come è stata eliminata l'equazione differenziale di primo ordine per il calcolo del gate di attivazione d nella corrente I_{CaL} , perché anch'essa prelevata da un sistema eterologo.

Sono state mantenute, per semplicità, le espressioni delle correnti di sodio e di potassio attraverso i canali del calcio L-type, dato che il sistema eterologo per I_{CaL} è stato modellato come una corrente puramente di calcio. In questo modo, la corrente prelevata dal sistema eterologo va a influire solo sulle concentrazioni di calcio intracellulare, mentre per il bilancio delle concentrazioni di sodio viene utilizzata l'espressione della corrente I_{CaNa} del modello in silico. È utile sottolineare il fatto che se la concentrazione intracellulare di sodio viene ipotizzata costante, allora anche l'equazione della corrente I_{CaNa} può essere eliminata dal modello. Infatti, un'ulteriore modifica effettuata è stata quella di eliminare il set di equazioni per il calcolo di $[K^+]_i$ e fissare questa concentrazione al suo valore in diastole, 143,79 mM. Innanzitutto, la concentrazione di potassio intracellulare non subisce variazioni considerevoli durante la durata di un singolo potenziale d'azione, per cui questo non ha particolari effetti sulla genesi del potenziale d'azione da parte del modello in silico. Inoltre, dato che nel sistema eterologo la presenza della pipetta fa sì che le concentrazioni intracellulari

rimangano costanti al valore presente nella soluzione intracellulare, può essere utile porsi nella medesima situazione anche nel modello in silico.

Infine, è stata mantenuta la presenza di una componente della corrente I_{CaL} fosforilata e modellata interamente dal modello in silico, tenendo però conto della permeabilità dei canali del sistema eterologo. Questo perché è stato ipotizzato che, nel sistema eterologo, l'effetto della fosforilazione, che dipende a sua volta dalla concentrazione del calcio, sia trascurabile.

2.2 MODELLAZIONE DEL SISTEMA ETEROLOGO

Gli esperimenti di elettrofisiologia cellulare che mirano a valutare il comportamento di un determinato canale ionico in risposta a un certo farmaco richiedono l'utilizzo di linee cellulari con determinate caratteristiche. Innanzitutto, è utile avere a disposizione un numero illimitato di cellule che presentino tutte le stesse proprietà, in più si preferisce utilizzare delle linee cellulari che possano esprimere un elevato numero di canali ionici, in modo da riuscire a ottenere delle misure con un elevato rapporto segnale rumore. Per ottenere questo si va a creare un sistema eterologo partendo da cellule che normalmente non esprimono, o esprimono in maniera limitata, il canale ionico di interesse, andando a sovra esprimere una determinata proteina tramite opportune tecniche di trasfezione. La scelta delle linee cellulari dipende da vari criteri: omogeneità nella dimensione e forma delle cellule, in modo da rendere più veloce il *patch clamp*; una buona capacità di espressione genica, per ottenere una buona misura dell'attività elettrica; capacità di formare un sigillo con la micropipetta; una presenza di correnti endogene quanto più bassa, per ottenere una misura il meno rumorosa possibile; e la capacità di sopravvivere per un tempo sufficiente dopo che la membrana cellulare è stata rotta per consentire il *patch clamp*. Al giorno d'oggi, le linee cellulari più utilizzate per gli esperimenti di elettrofisiologia sono la linea HEK-293 e la linea CHO.

Le cellule CHO sono una linea cellulare epiteliale derivata dall'ovaia di criceto cinese, ottenuta nel 1957 da T.T. Puck dalla biopsia di un criceto cinese adulto. Queste cellule sono ampiamente utilizzate in elettrofisiologia in quanto hanno una minima espressione di canali ionici endogeni. Nelle cellule non transfettate, il potenziale di membrana a riposo è nel range di $-5 \text{ mV} - 10 \text{ mV}$, che suggerisce una attività dei canali del potassio molto bassa. In più, nelle cellule non transfettate si registrano correnti entranti o uscenti molto piccole indipendentemente dal valore di potenziale di membrana, indicando che non sono presenti canali voltaggio dipendenti particolarmente rilevanti. L'assenza di correnti di background rende questa linea cellulare particolarmente indicata a studiare i canali ionici del potassio andando a sovra esprimere il gene di interesse. Un altro vantaggio di questa linea cellulare è la facilità con cui si riesce a formare un *gigaseal* con un buon valore di resistenza, il che la rende ideale per le tecniche di *patch clamp*. In generale, questa linea cellulare rappresenta spesso una soluzione conveniente quando si vogliono studiare i canali ionici di mammiferi in quanto la linea stessa proviene da un mammifero e sono facili da transfettare [18].

Per quanto riguarda la simulazione in *dynamic clamp*, sono state implementate tante cellule quante le correnti che si volevano integrare nel sistema, ovvero le correnti I_{K_r} , I_{K_1} e I_{CaL} . Dato che le cellule CHO non hanno altre correnti endogene rilevanti se non quella data dal canale ionico che è stato sovra espresso, l'intera cellula è stata modellata solo attraverso la corrente di interesse.

2.2.1 I_{K_r}

La corrente I_{K_r} detta *rapid delayed rectifier current*, i cui canali vengono codificati dal gene hERG, o KCNH2, è una corrente di potassio che si attiva per ripolarizzare la cellula fino al valore del potenziale di riposo. La caratteristica principale di questa corrente è il gate di inattivazione molto rapido che quindi fa velocemente inattivare il canale quando si raggiungono potenziali positivi. Allo stesso modo, quando il potenziale di membrana scende per tornare a valori negativi, il canale recupera velocemente dall'inattivazione aprendosi e perciò si registra una corrente uscente di

potassio. Un fattore importante da tenere a mente quando si lavora con sistemi eterologhi dei canali potassio è che la conduttanza del canale è dipendente dalla concentrazione di potassio extracellulare, per cui la corrente misurata sarà dipendente dalla composizione del bagno extracellulare [19]. Questa corrente è una delle correnti che suscita maggiore interesse negli esperimenti di farmacologia, e su cui si è maggiormente concentrata la ricerca nell'ambito della sicurezza cardiaca. Infatti, una modifica di questa corrente, causata ad esempio da un farmaco che blocca questi canali o va ad agire sul gene hERG, causa un prolungamento del potenziale di azione e una ripolarizzazione non fisiologica che può portare all'insorgenza di eventi aritmici. Per quanto riguarda questa corrente, il modello [20] preso in considerazione prevede di descrivere la cellula attraverso un'equazione del tipo $G_{max} \cdot a \cdot r \cdot (V_m - E_K)$, dove a rappresenta il gate di attivazione, mentre r quello di inattivazione, entrambi descritti con una dinamica del primo ordine. Il valore del potenziale di Nerst è stato posto costante a -87,6 mV, cioè supponendo che la composizione del bagno extracellulare e della soluzione intracellulare rimanga costante per tutta la durata del potenziale d'azione, essendo il potenziale di Nerst funzione di entrambe le concentrazioni come descritto dalla formula: $E_K = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i}$. Questo significa supporre costante la concentrazione di potassio extracellulare e intracellulare. Questa ipotesi è sufficientemente verificata, in quanto la composizione del bagno extracellulare è poco influenzata dall'attività della cellula, per cui $[K^+]_o$ può essere facilmente considerato costante, allo stesso modo $[K^+]_i$ dipende non solo dall'attività cellulare, ma in particolar modo dalla composizione della soluzione intracellulare posta nella pipetta. Tenendo conto che l'esperimento viene effettuato in configurazione di *whole-cell patch*, la composizione della soluzione nella pipetta gioca un ruolo rilevante nel mantenere costante $[K^+]_i$ all'interno della cellula. Si può anche notare come data l'equazione del potenziale di Nerst, e tenendo conto che $[K^+]_o$ non varia, l'incidenza di una variazione di $[K^+]_i$ sul risultato finale è limitata, e questo rafforza l'ipotesi di potenziale di inversione costante.

- **La corrente I_{K_r} nel modello di O'Hara-Rudy**

Per quanto riguarda I_{K_r} , il modello della corrente di Beattie et al. 2018 [20] utilizzato per descrivere il sistema eterologo, è diverso da quello di O'Hara et al. 2011 [16] utilizzato nel modello in silico, e, di conseguenza, gli andamenti della corrente I_{K_r} nelle due formulazioni risultano differenti, Figura 3.23. Tutte e due le descrizioni presentano la stessa formulazione del tipo $G_{max} \cdot a \cdot i \cdot (V_m - E_k)$, dove a è il gate di attivazione e i è il gate di inattivazione, ma con delle differenze nella descrizione dei gates. Innanzitutto, il gate di inattivazione del modello di O'Hara-Rudy è descritto con un'espressione algebrica in funzione del potenziale di membrana e quindi risulta istantaneo, mentre il gate di inattivazione del modello di Beattie 2018 è descritto con una dinamica di primo ordine. I gates di attivazione presentano entrambi una dinamica del primo ordine, ma nel modello di O'Hara-Rudy questo gate è descritto come combinazione di due gates, uno chiamato *fast* e uno *slow*, che condividono lo stesso valore di equilibrio ma presentano due diverse formulazioni per la costante di tempo, da cui deriva la differenza tra il gate lento e quello veloce. La combinazione di questi due gates viene modulata da un fattore A che a sua volta è funzione del potenziale di membrana. Osservando gli andamenti delle correnti le principali differenze sono durante la fase di plateau. Infatti, tutte e due le correnti presentano un picco iniziale all'inizio del potenziale d'azione, ma mentre la corrente descritta da O'Hara-Rudy continua quasi linearmente a crescere per poi arrivare ad un massimo durante la fase 3 del potenziale d'azione, la corrente descritta da Beattie 2018 prima diminuisce, poi torna a crescere per avere un picco pronunciato alla fine del potenziale d'azione. La differenza principale si ritrova perciò durante la fase di plateau dove la corrente descritta da Beattie 2018 presenta una minor forza ripolarizzante a causa della minore ampiezza.

Un'ulteriore differenza tra le due formulazioni sta nel fatto che nel modello di O'Hara-Rudy il valore di conduttanza massima è modulato dalla concentrazione extracellulare di potassio da un termine del tipo $\sqrt{\frac{[K^+]_o}{5.4}}$. Ai fini della simulazione questa differenza tra le due formulazioni rientra comunque nei casi possibili in cui la cellula da cui viene prelevata la corrente di interesse non sia un cardiomiocita, per cui una variabilità tra le

correnti è prevedibile, e deve essere gestita adeguatamente, facendo in modo che questo non vada a incidere significativamente sul risultato finale.

2.2.2 I_{K1}

La corrente I_{K1} detta *inward rectifier current*, i cui canali vengono codificati dal gene KCNJ2, è una corrente di potassio che si attiva nella fase finale della ripolarizzazione del potenziale di membrana. Il nome deriva dal fatto che questa corrente assume valori molto maggiori quando è entrante, cosa che non avviene per valori fisiologici del potenziale di membrana, mentre rimane piccola quando uscente. Questi canali rimangono aperti al valore di potenziale di riposo, che perciò dipende proprio dalla permeabilità di questi canali. Quando la cellula si depolarizza questi canali si chiudono facilitando l'insorgere del potenziale di azione e il mantenimento della fase di plateau, per poi riaprirsi durante la ripolarizzazione [19]. Per le cellule che sovra esprimono il gene per il canale ionico della corrente I_{K1} si è preso lo stesso modello presente nel modello O'Hara-Rudy, andando a sostituire il valore di conduttanza massima con uno tipico per le cellule CHO dove è stata indotta l'espressione del gene KCNJ2 [21]. Anche per questa corrente la modellazione consiste nel considerare un gate di attivazione, avente una dinamica del primo ordine, e un gate di inattivazione istantaneo. In generale, la corrente I_{K1} è una corrente molto rapida. Il valore del potenziale di inversione considerato è identico per tutte le correnti di potassio, ipotizzando una concentrazione di potassio extracellulare costante nel bagno dove sono poste le cellule. Inoltre, la conduttanza massima dipende direttamente da $[K^+]_o$ che è stata considerata costante a 5,4 mM.

2.2.3 I_{CaL}

La corrente I_{CaL} , dal nome dei suoi canali *L-type calcium channels* dove *L* sta per *long-lasting* e sta a indicare la lunghezza del periodo di attivazione di questi canali, è una corrente di calcio che si attiva nella fase iniziale del potenziale d'azione e perdura per l'intera durata di questo, ed i cui canali vengono codificati dal gene CACNA1C. La

particolarità di questo canale è quella di avere, oltre al tipico meccanismo di inattivazione voltaggio-dipendente, anche un meccanismo di inattivazione calcio-dipendente. Questo fa sì che il canale si apra all'insorgere del potenziale d'azione facendo entrare calcio nella cellula e venga inattivato dal legame tra il calcio e la calmodulina che causa una diminuzione della corrente entrante. Successivamente, con la ripolarizzazione del segnale di membrana e la diminuzione della concentrazione di calcio intracellulare, l'inattivazione prevalente diventa quella voltaggio-dipendente. Per la simulazione è stata usata la formulazione fornita da [16] del tipo: $P_{Ca} \cdot \Psi_{Ca} \cdot d \cdot (f \cdot (1 - n) + f_{Ca} \cdot n \cdot j_{Ca})$, dove P_{Ca} è la permeabilità del canale, Ψ_{Ca} è l'espressione del potenziale di inversione per il calcio descritto con un'equazione alla Goldman-Hodgkin-Katz, d è il gate di attivazione voltaggio-dipendente, f è il gate di inattivazione voltaggio-dipendente, f_{Ca} e j_{Ca} sono i gates di inattivazione che descrivono la calcio-dipendenza, tutti descritti con una dinamica di primo ordine, e n è il gate dipendente dal calcio che descrive il legame con la calmodulina e che modula la calcio-dipendenza, anch'esso descritto con una dinamica del primo ordine. Come si vede dalla descrizione di questa corrente [16], il gate n è presente sia nell'inattivazione calcio-dipendente sia nell'inattivazione voltaggio-dipendente, e ha la funzione di pesare diversamente i due tipi di inattivazione a seconda della concentrazione di calcio presente nella cellula.

Quando si osserva la corrente di calcio nei cardiomiociti, è importante ricordare il ruolo ricoperto dal reticolo sarcoplasmatico. Il reticolo ha la funzione di immagazzinare ioni calcio e rilasciarli durante la sistole per far avvenire la contrazione. In questo modo la concentrazione di ioni calcio aumenta velocemente e questo non sarebbe possibile senza il rilascio di ioni calcio da parte del reticolo sarcoplasmatico. Il rilascio di ioni calcio da parte del reticolo è strettamente collegato alla corrente I_{CaL} da un meccanismo detto *Calcium-Induced Calcium Released*, infatti, nel momento in cui entrano ioni calcio nella cellula a causa dell'attivazione della corrente I_{CaL} , questi si vanno a legare a dei canali presenti sulla superficie del reticolo sarcoplasmatico, detti recettori della rianodina, che aprendosi lasciano fuoriuscire calcio. L'aumento della concentrazione intracellulare di ioni calcio è responsabile poi dell'inattivazione calcio-dipendente di I_{CaL} . Se questa corrente viene prelevata da un sistema eterologo è fondamentale tener conto che in queste cellule non è presente il

reticolo sarcoplasmatico. Per cui, anche se transfettate con il gene che esprime I_{CaL} , la corrente prelevata avrà un andamento differente da quella misurata in un cardiomiocita dato che, non essendo presente il meccanismo di *CICR*, la concentrazione di calcio intracellulare non raggiunge i livelli di concentrazione normalmente presenti in un cardiomiocita durante la sistole. Questo fa sì che anche il meccanismo di inattivazione calcio-dipendente sia diverso da quello di un cardiomiocita, a causa di un minor legame tra gli ioni calcio e la calmodulina che lo rende quasi trascurabile. Per questo motivo, non è possibile integrare la corrente I_{CaL} prelevata da un sistema eterologo in un modello in silico durante un esperimento in *dynamic clamp* senza operare le opportune modifiche. Perciò, si è pensato di prelevare la corrente dal sistema eterologo, eliminare tutte le componenti dipendenti in qualche modo dalla concentrazione di calcio intracellulare e reinserire direttamente quelle del modello in silico dove, invece, la variazione di concentrazione di calcio intracellulare simulata è propria di un cardiomiocita umano.

In questa simulazione è stato ipotizzato che, non essendoci il reticolo sarcoplasmatico, la concentrazione di calcio intracellulare rimanga costante anche durante la sistole, ovvero anche in presenza di calcio entrante a causa dell'attivazione dei canali di I_{CaL} , tenendo anche presente che le concentrazioni ioniche intracellulari rimangono costanti anche a causa della contiguità tra il compartimento intracellulare e la soluzione all'interno della pipetta. Per prima cosa bisogna stimare la concentrazione intracellulare di calcio, non essendo possibile misurarla direttamente, infatti, solitamente non è presente calcio nei preparati per la soluzione intracellulare, quindi il valore non è noto a priori, e la concentrazione intracellulare di calcio in una cellula non eccitabile rimane dell'ordine di qualche decina di nanomolare e quindi minore della sensibilità della strumentazione. Questa stima è stata effettuata andando a prelevare la corrente I_{CaL} dal sistema eterologo durante un esperimento in *AP clamp*, e andando a trovare, tramite minimizzazione della somma degli scarti quadratici, il valore di $[Ca^{++}]_{ss}$ che, nel modello di O'Hara-Rudy, meglio descrive la corrente del sistema eterologo. Osservando la formulazione della corrente I_{CaL} descritta da [16], si nota che solo Ψ_{Ca} e n dipendono direttamente dalla concentrazione di calcio, mentre tutti gli altri gates, anche quelli responsabili dell'inattivazione calcio-dipendente sono funzione solo del potenziale di membrana. Una volta stimato il valore di $[Ca^{++}]_{ss}$, si

possono calcolare, con il modello di O'Hara-Rudy, Ψ_{Ca} e l'inattivazione, sia voltaggio-dipendente che calcio-dipendente, in ogni istante dato, che sono solo funzione del potenziale d'azione, mentre la concentrazione di calcio da cui dipendono rimane costante. Perciò, durante l'esperimento in *dynamic clamp*, la corrente prelevata in un certo istante viene divisa per il valore stimato di Ψ_{Ca} e per il valore dei gates di inattivazione così che nella corrente in input al modello in silico non siano più presenti fattori dipendenti dalla concentrazione di calcio intracellulare. A questo punto al modello in silico arriva solo $P_{Ca} \cdot d$ che viene moltiplicato per tutti gli altri fattori presenti nell'equazione, calcolati tenendo conto dell'andamento di $[Ca^{++}]_{ss}$ ottenuto con il modello di O'Hara-Rudy:

$$I_{CaL,input} = G_{scale} \cdot \frac{I_{CaL,eterologo}}{\Psi_{Ca,eterologo} \cdot (f \cdot (1-n) + f_{Ca} \cdot n \cdot j_{Ca})_{eterologo}} \cdot \Psi_{Ca,ORd} \cdot (f \cdot (1-n) + f_{Ca} \cdot n \cdot j_{Ca})_{ORd}$$

In questo modo si riesce ad avere una corrente I_{CaL} prelevata sì da un sistema eterologo, ma con un andamento consistente con quello di un modello in silico di potenziale d'azione di cardiomiocita umano. A differenza di altre correnti prelevate da un sistema eterologo, però, i gates di inattivazione sono completamente modellati in silico. Questo fa sì che per la corrente I_{CaL} non si riescano a valutare gli effetti dei farmaci sui gates di inattivazione, ma solo su quello di attivazione e sulla permeabilità, e comunque, in nessun modo si potrebbero fare valutazioni sull'inattivazione calcio-dipendente essendo praticamente assente nelle cellule prive di reticolo sarcoplasmatico. Questo compromesso è comunque accettabile in quanto il maggior effetto dei farmaci sui canali ionici è sul valore di conduttanza massima piuttosto che sull'andamento dei gates.

Per modellare il sistema eterologo in simulazione, oltre alla descrizione della corrente presa da O'Hara-Rudy, sono stati considerati una concentrazione di calcio intracellulare pari al valore di concentrazione di calcio nel *subspace* in diastole del modello di O'Hara-Rudy, e un valore tipico di permeabilità di una cellula HEK-293 transfettata per esprimere i canali della corrente I_{CaL} [22] andando a osservare la caratteristica I-V della corrente, prendendo il valore di picco della corrente e

dividendolo per il valore di Ψ_{Ca} , calcolato con la formulazione di O'Hara-Rudy al valore di tensione corrispondente e utilizzando il valore di $[Ca^{++}]_{ss}$ in diastole.

2.2.4 Il rumore sovrapposto

Nella simulazione è stata considerata anche la presenza di rumore dovuto alla naturale fluttuazione dei canali tra la configurazione aperta e la configurazione chiusa o inattivata. Questa interferenza nella misura, che si va a sovrapporre al rumore introdotto invece dalla strumentazione, è naturalmente presente e non può essere eliminato, per cui è stato modellato andando a sommare alla corrente in uscita dalla cellula del rumore bianco centrato in 0 A, con potenza di rumore pari a 10^{-11} dB/Hz. L'apertura e chiusura dei canali ionici è un processo stocastico, la cui probabilità può variare con il potenziale di membrana, nel caso di canali voltaggio-dipendenti, o a seconda dell'interazione con determinate sostanze chimiche, nel caso di canali ligando-dipendenti. Per questo è stato scelto un rumore bianco, in cui i valori istantanei sono indipendenti da altre variabili e totalmente scorrelati tra loro.

2.3 MODELLAZIONE DEL SISTEMA DI ACQUISIZIONE

Per questa simulazione, il sistema di acquisizione è stato modellato e implementato in Simulink[®] partendo dal set up di amplificazione in *patch clamp* nel singolo pozzetto. La modellazione fa riferimento ad una configurazione di *voltage clamp* in *whole-cell patch clamp* per prelevare la corrente I_{KR} da cellule CHO in cui è stato sovra espresso il gene HERG.

Il circuito di *voltage clamp*, comandato esternamente da una tensione V_{cmd} , fissa il potenziale di membrana a una tensione V_p e va a prelevare corrente dalla cellula utilizzando un amplificatore di transimpedenza, un sistema in feedback che converte la corrente in input in una tensione di output. La corrente desiderata è quella del canale

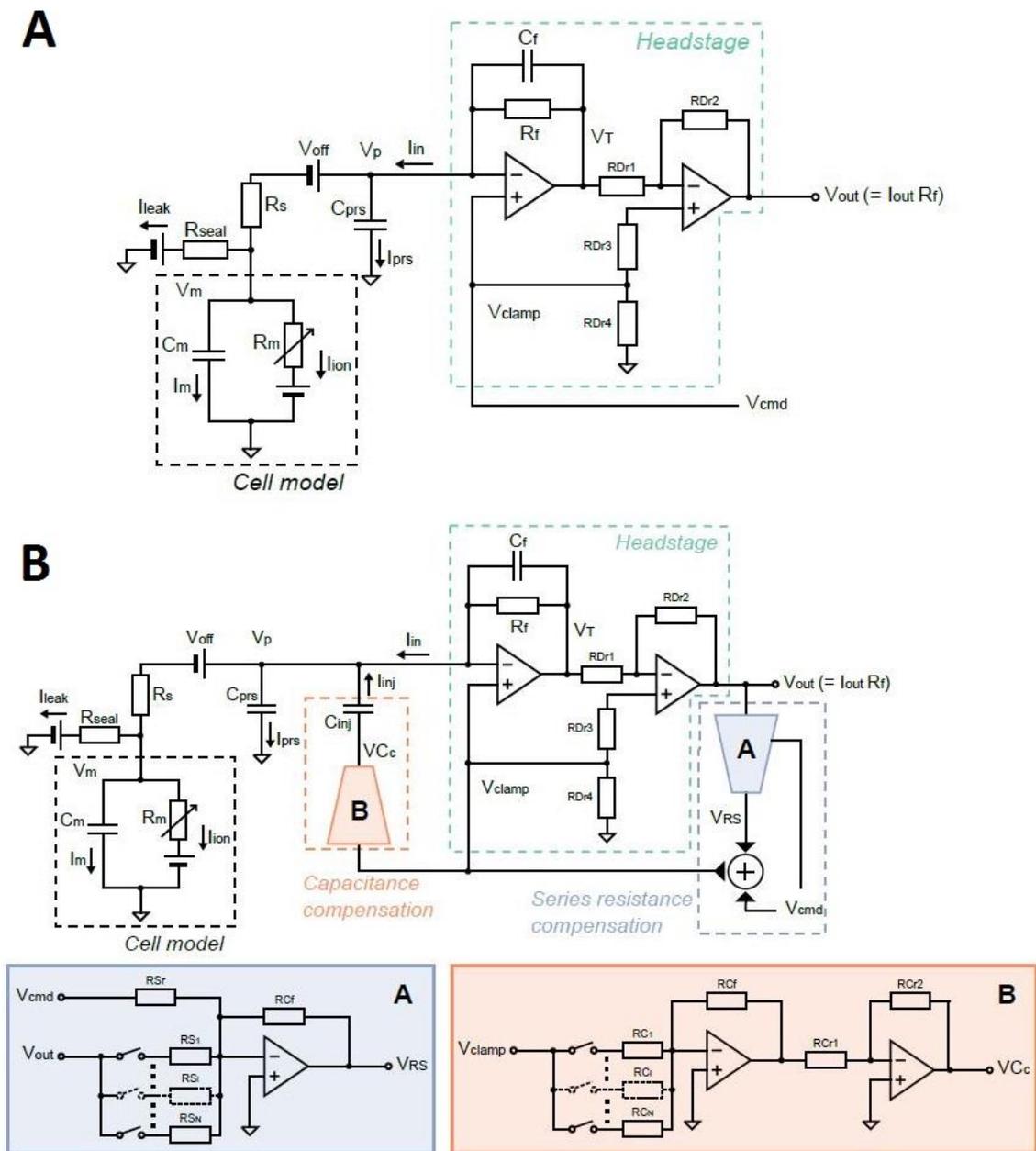


Figura 2.2, A) Sistema di acquisizione non compensato B) sistema di acquisizione compensato. Tratto da [23]

ionico di interesse, eventualmente contaminata da una corrente endogena, $I_{\text{endogenous}}$, di altre specie ioniche, in quanto, oltre al canale di interesse, potrebbero essere presenti altri canali all'interno della micropipetta. Analizzando il circuito che modella la cellula e la micropipetta, in Figura 2.2, si nota che la corrente prelevata contiene anche altre componenti: una componente di corrente di leakage, dovuta al sigillo non perfettamente ermetico tra membrana cellulare e pipetta, la corrente che attraversa la

membrana cellulare, descritta come la corrente che serve per caricare la capacità di membrana, e la corrente dovuta alla capacità parassita dell'elettrodo.

A causa di queste correnti aggiuntive, è necessario prelevare la corrente tramite un circuito di amplificazione compensato, Figura 2.2B, volto a ridurre al minimo le correnti che altrimenti andrebbero a sovrapporsi a quella di interesse. I principali effetti indesiderati che è opportuno compensare sono: la presenza di un offset in tensione, V_{off} , a causa della resistenza serie della micropipetta, l'effetto capacitivo della membrana cellulare, C_m , e la capacità parassita, C_{prs} . A questi si aggiungono una perdita di corrente dovuto al leakage della micropipetta e la presenza di specie ioniche voltaggio-dipendenti presenti nella cellula oltre a quella di interesse che è stata sovra espressa. È importante notare che, se si vuole utilizzare un circuito di questo tipo in un esperimento di *dynamic clamp*, e quindi in real-time, il circuito deve includere già tutte le opportune compensazioni, in quanto non è possibile eseguire le compensazioni offline.

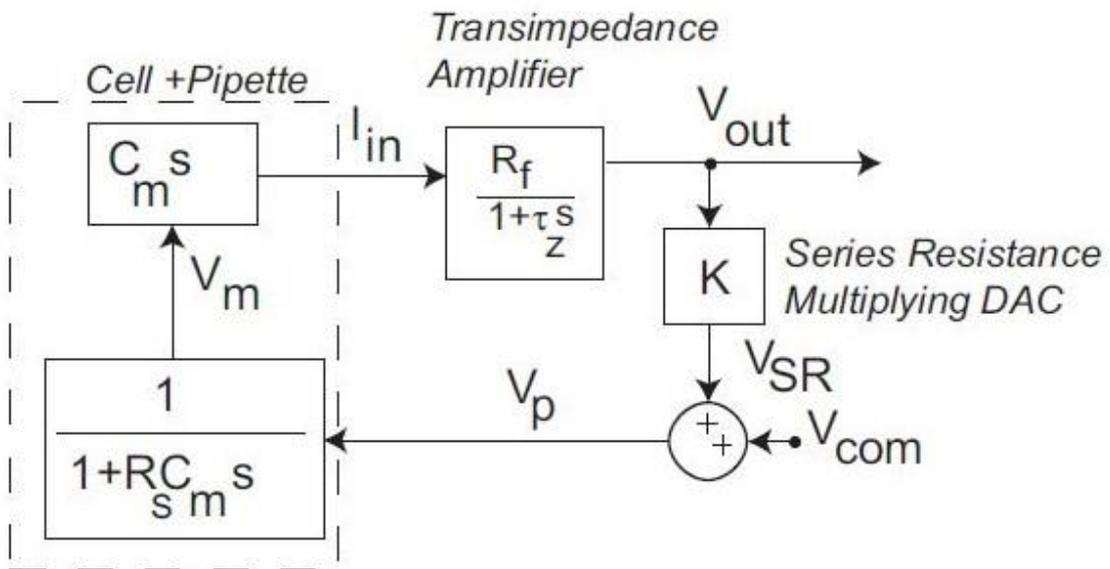


Figura 2.3, Modello a blocchi di un sistema in patch clamp con circuito di compensazione della resistenza serie. Si nota come la tensione V_{out} in uscita dal sistema venga moltiplicata per un certo fattore e sommata alla tensione in input al sistema V_{com} . Tratto da [24]

Il problema dell'offset in tensione è dovuto alla resistenza della micropipetta, nello schema circuitale posta in serie all'elettrodo con cui si acquisisce il segnale in corrente, detta R_s , e su cui si verifica una caduta di tensione rispetto al potenziale di *voltage clamp* che si va a imporre alla cellula. In generale, non è possibile diminuire il valore

di questa resistenza, né tanto meno annullarlo, perché strettamente collegato al diametro della micropipetta tramite la seconda legge di Ohm. Perciò, avendo bisogno di una micropipetta con un diametro in punta piccolo, perché deve essere compatibile con le dimensioni della cellula, necessariamente si ottiene una resistenza serie elevata, dell'ordine delle decine di megaohm, il cui valore è però ignoto. La compensazione della resistenza serie viene effettuata dall'amplificatore andando a stimare una percentuale della resistenza affinché la caduta di tensione venga minimizzata. Il circuito di compensazione della resistenza serie prende in ingresso la corrente di uscita del circuito di *voltage clamp*, la moltiplica per un certo fattore variabile e la somma alla tensione in input. Questo avviene in un circuito in feedback positivo così che il fattore moltiplicativo possa essere variato fino a compensare al meglio la caduta di tensione sulla micropipetta, come mostrato in figura 2.3. La compensazione della resistenza serie è utile anche per diminuire il valore della costante di tempo con cui il potenziale di membrana V_m raggiunge quello V_p imposto dal sistema di amplificazione e che dipende proprio dalla resistenza della micropipetta, oltre che dal valore della capacità di membrana.

Per eliminare gli effetti dovuti alla capacità parassita dell'elettrodo viene iniettata una corrente con verso contrario in modo da sopperire alla perdita di corrente. La corrente iniettata assume la forma di una corrente capacitiva dovuta alla derivata nel tempo della tensione V_{clamp} e proporzionale a un valore di capacità, C_{prs}^* , che equivale alla stima della capacità parassita. Questa compensazione è nota come *C-fast compensation*. Il sistema di acquisizione può prevedere anche una *C-slow compensation* effettuata nella stessa maniera, per ridurre anche gli effetti della capacità di membrana, dove il valore di capacità utilizzato, C_m^* , è la stima della capacità di membrana della cellula. A seconda del tipo di cellula su cui si sta effettuando il *voltage clamp*, la capacità di membrana varia, fino a raggiungere il valore di 100 pF per i cardiomiociti. Dato che gli elementi capacitivi hanno invece una dimensione limitata, questa compensazione viene spesso eseguita durante la fase di post-elaborazione tramite software piuttosto che essere inserita direttamente tra gli elementi circuitali.

Per quanto riguarda la presenza di leakage, considerando il set up pulito, ovvero senza la presenza di altre perdite di corrente tranne quella attraverso il sigillo formato dalla

micropipetta, è stato incluso nel sistema un modello di corrente lineare, ovvero nella forma $I_{leak} = g_{leak} (V_m - E_{leak})$, dove la conduttanza g_{leak} può essere espressa come l'inverso della resistenza di *seal* e E_{leak} è stato posto a zero, in quanto si assume un bagno perfettamente conduttivo, anche se quest'ultima ipotesi potrebbe non essere verificata. Risulta chiaro che più elevata è la resistenza del sigillo che si riesce a ottenere minore sarà la corrente di leakage. Nella simulazione è stata utilizzata una resistenza di *seal* dell'ordine dei 10 G Ω , includendo anche un'eventuale variabilità della qualità del sigillo variando il valore della resistenza tramite deviazione standard pari a 0,4 attorno al valore medio di 8 G Ω .

Il sistema così modellato può essere descritto tramite una serie di equazioni differenziali di primo ordine che descrivono l'andamento delle tre tensioni V_{clamp} , V_p e V_m , che si portano al valore deciso dal potenziale V_{cmd} , e l'andamento della corrente in uscita, che contiene sia la corrente di interesse che altre correnti indesiderate e la loro compensazione. Questo modello del sistema di acquisizione è stato testato prelevando la corrente I_{Kr} tramite un opportuno protocollo a scalini in tensione, e confrontando il risultato così ottenuto con la corrente che si avrebbe in un sistema ideale, in cui la corrente misurata coincide esattamente con quella di interesse e il potenziale di membrana arriva istantaneamente al potenziale desiderato. Si osserva che se si utilizza un sistema di acquisizione non compensato il potenziale di membrana non coincide esattamente con quello del protocollo a causa della presenza della resistenza in serie, e nella corrente misurata appaiono degli *spike* capacitivi, che non sono presenti nella corrente ideale, dovuti alle capacità parassita e di membrana. Un sistema di acquisizione non compensato non può perciò essere adatto a rilevare corrente in quanto la corrente misurata non coincide con quella reale. Applicando le compensazioni sopra elencate, invece, il potenziale di membrana segue precisamente l'andamento del potenziale di controllo V_{cmd} , a meno di un offset in tensione residuo che si stima essere dell'ordine delle decine di millivolt, e gli *spike* in corrente hanno ampiezza più ridotta. Un'ulteriore analisi mostra come la dinamica della corrente misurata sia affetta maggiormente dalle variazioni della resistenza in serie e dall'offset in tensione rispetto alle variazioni sulle capacità. In questa simulazione l'offset residuo è stato posto pari a 2 mV, assumendo che la compensazione dell'offset sia già avvenuta precedentemente offline, e la capacità parassita a 0.4 pF, con una stima automatica di

questa capacità pari esattamente al suo valore reale, mentre la resistenza in serie e la capacità di membrana, rispettivamente pari a 5 M Ω e 10 pF, sono state fatte variare rispetto a questi valori medi con deviazione standard rispettivamente pari a 0,3 e 0,1. In questo modo si è potuto simulare il sistema includendo una variabilità sia intercellulare, per quanto riguarda la dimensione delle cellule, sia del sistema stesso, variando la resistenza in serie della micropipetta del *patch clamp* nei diversi pozzetti. La compensazione sia della resistenza in serie sia della capacità di membrana è stata effettuata considerando di riuscire a compensare il 90% del loro valore stimato.

Per la scelta della resistenza di retroazione si sono seguite le indicazioni fornite dall'azienda HEKA per la loro strumentazione di *patch clamp* automatico e si è scelta una resistenza pari a 500 M Ω , consigliata per la misurazione di correnti dell'ordine dei nanoampere. Essendo l'amplificatore di tipo passa basso, la capacità e la resistenza in retroazione determinano il valore della frequenza di taglio che assume un valore di circa 1 kHz.

A fronte delle compensazioni sopra descritte, la cellula viene portata a una tensione V_m , con una certa costante di tempo che dipende dal valore della resistenza serie e dalla sua capacità di membrana, pari a V_p a meno di un offset in tensione residuo. La tensione V_p è la tensione a cui viene portato il sistema, con una certa costante di tempo τ_{clamp} , ed è pari alla tensione V_{cmd} , in ingresso al sistema di acquisizione, più il termine di compensazione della resistenza serie. La corrente in uscita dall'amplificatore, I_{out} , è pari alla corrente che viene prelevata dalla cellula, I_{in} , ovvero, la corrente dal canale di interesse a cui si aggiungono una serie di termini indesiderati. Il sistema di acquisizione compensato è descritto dal seguente sistema di equazioni differenziali di primo ordine [23]:

$$\left\{ \begin{array}{l}
I_{\text{ion}} = I_{\text{Kr}} + I_{\text{endogenous}} \\
I_{\text{leak}} = g_{\text{leak}}(V_m - E_{\text{leak}}) \\
\frac{dV_m}{dt} = \frac{1}{R_s C_m} (V_p + V_{\text{off}} - V_m) - \frac{1}{C_m} I_{\text{ion}} \\
\frac{dV_p}{dt} = \frac{1}{\tau_{\text{clamp}}} (V_{\text{clamp}} - V_p) \\
\frac{dV_{\text{clamp}}}{dt} = \frac{1}{\tau_{\text{sum}}} ((V_{\text{cmd}} + \alpha R_s I_{\text{out}})) - V_{\text{clamp}} \\
I_{\text{in}} = I_{\text{ion}} + I_{\text{leak}} + C_m \frac{dV_m}{dt} + C_{\text{prs}} \frac{dV_p}{dt} - (C_m^* + C_{\text{prs}}^*) \frac{dV_{\text{clamp}}}{dt} \\
I_{\text{out}} = \frac{1}{\tau_z} (I_{\text{in}} - I_{\text{out}})
\end{array} \right.$$

Dove I_{ion} è la corrente attraverso il canale ionico considerato, τ_{sum} è la costante di tempo del circuito di compensazione della resistenza serie, α è la percentuale di R_s compensata e τ_z è la costante di tempo per portare la corrente in uscita all'amplificatore al valore di corrente prelevata dal sistema eterologo.

2.4 SIMULAZIONE IN DYNAMIC CLAMP

L'esperimento in *dynamic clamp* avviene collegando in un circuito chiuso il modello in silico con i vari sistemi eterologhi attraverso il sistema di acquisizione. Affinché la corrente prelevata da un sistema eterologo possa essere data in input al modello in silico ed essere consistente con quello che la corrente originale del modello prevede, sono necessari alcuni passaggi prima di iniziare la simulazione in *dynamic clamp*. In particolare, per ogni tipo di corrente viene compensata l'eventuale corrente di leakage che si va a sovrapporre al segnale, la corrente viene scalata in modo da rientrare nell'ordine di grandezza previsto dal modello, e viene trasformata in densità di corrente andando a dividere la corrente misurata per un valore di capacità di membrana stimato. Per effettuare questa simulazione sono stati sviluppati e implementati i protocolli descritti successivamente.

2.4.1 Compensazione della corrente di leakage

A causa del sigillo tra la membrana cellulare e la pipetta, si verifica una perdita di ioni durante l'acquisizione della corrente dal compartimento extracellulare. Prima di effettuare un esperimento in *patch clamp* la qualità del sigillo viene sempre verificata assicurandosi che la sua resistenza superi il valore di 1 GΩ. Anche in questo caso, però, si ha una presenza di corrente, cosiddetta di leakage. Nel caso di una semplice misurazione di una corrente in *voltage clamp*, la compensazione del leakage può essere fatta successivamente all'esperimento, andando a misurare, in *voltage clamp* e sotto lo stesso protocollo in tensione, la corrente che si ottiene in presenza di un bloccante specifico. Supponendo che il bloccante sia efficace e che effettivamente non ci sia traccia della corrente di interesse, tutto quello che si va a misurare deve essere per forza una corrente da compensare. A questo punto si può togliere alla prima corrente acquisita quella misurata in presenza del bloccante ottenendo il tracciato della corrente senza leakage.

L'esperimento in *dynamic clamp*, però, avviene in real-time, questo impone che le compensazioni non possano avvenire offline al termine dell'esperimento, ma debbano essere incluse online all'interno dell'esperimento stesso. Una soluzione per compensare la corrente di leakage online è quella di stimare i parametri che descrivono la corrente di leakage prima dell'esperimento in *dynamic clamp* così da poter sottrarre, durante l'esperimento real-time, un certo valore di leakage stimato. L'ipotesi su cui si basa la compensazione fatta in questa simulazione è che la corrente di leakage abbia un andamento lineare dipendente dal potenziale V_p ai capi della pipetta [25], e che quindi possa essere stimata, conoscendo i due parametri g e E , tramite un'equazione del tipo: $I_{leak,stimata} = g \cdot V_{cmd} + E$, dove V_{cmd} è il valore di potenziale imposto dal sistema di acquisizione alla cellula. Qualora la corrente di leakage non avesse un andamento lineare, questa stima non sarebbe più valida e potrebbe essere opportuno indagare le cause che portano a una situazione di non linearità [25].

La stima dei due parametri viene effettuata tramite un protocollo iniziale in *voltage clamp*, prima di proseguire con l'esperimento. L'idea è quella di porsi in una situazione in cui i gates di attivazione della corrente che stiamo osservando siano il più possibile vicini a 0, in modo che questa corrente durante il protocollo sia nulla. Osservando le

caratteristiche I-V delle correnti si può vedere quali intervalli di potenziale garantiscono un'assenza di corrente. Questo vuol dire portare il potenziale di membrana a valori molto negativi per correnti come I_{Kr} o I_{CaL} oppure a valori positivi per la corrente I_{K1} . Dopo aver aspettato un certo intervallo di tempo, 10 ms in Figura 2.4 per assicurarsi che tutti i transistori capacitivi si siano esauriti, si impone alla cellula una rampa in tensione [26], con una certa pendenza e per un certo intervallo di tempo, e si va a misurare la corrente che si ottiene. Dato che la corrente di interesse è assente perché sono stati imposti valori di potenziale che annullano la corrente, la corrente che si registra è presumibilmente solo la corrente di leakage. Tramite una funzione di fitting lineare si possono stimare i due parametri g e E che meglio descrivono la rampa in corrente che è stata acquisita in questo protocollo in *voltage clamp*. A questo punto in tutte le acquisizioni successive, compreso il protocollo di stima del fattore di scala, alla corrente che viene acquisita viene sottratto il valore corrispondente di leakage stimato in quell'istante tenendo conto dei parametri stimati e del valore di potenziale V_{cmd} che viene imposto dal sistema di acquisizione alla cellula. Durante l'esperimento in *dynamic clamp* in un set up reale, potrebbe essere opportuno ricalcolare i parametri della corrente di leakage stimati di tanto in tanto in modo da riuscire a effettuare sempre una sottrazione ottimale del leakage.

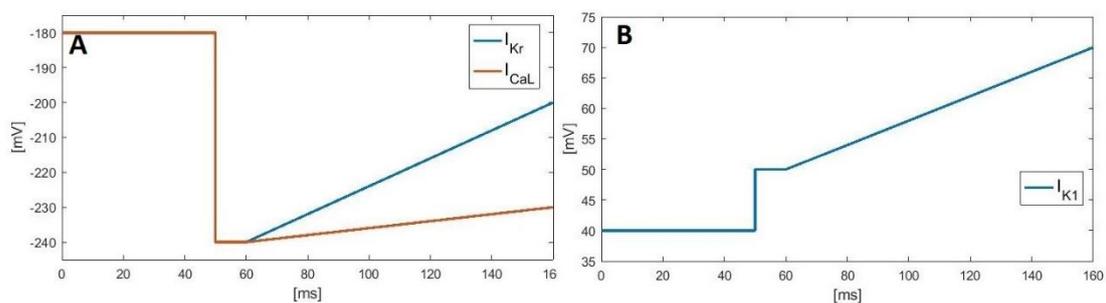


Figura 2.4, A) Protocollo in *voltage clamp* per le correnti I_{Kr} , curva blu, e I_{CaL} , curva rossa. B) Protocollo in *voltage clamp* per la corrente I_{K1} .

2.4.2 Protocollo di stima del fattore di scala

Un passaggio fondamentale della configurazione di *dynamic action potential clamp* è quello di dover scalare la corrente prima di inserirla nel modello di cardiomiocita. Determinare il corretto fattore di scala diventa perciò indispensabile, dal momento che l'utilizzo di un fattore di scala sbagliato sarà sicuramente causa di successivi errori, e quindi si genererà un potenziale d'azione che non riflette l'andamento fisiologico di un cardiomiocita, annullando la validità dell'esperimento.

La corrente prelevata dalle cellule in vitro deve essere scalata in modo che il valore di corrente iniettato sia consistente con il valore di corrente che ci si aspetta nel modello in-silico. In generale, ci si aspetta che le correnti prelevate siano maggiori rispetto a quelle misurate in un cardiomiocita, questo perché si utilizzano sistemi eterologhi dove i canali ionici sono stati sovra espressi e che quindi presentano una conduttanza massima maggiore di quella del modello in silico che invece è stato modellato sulla base di un cardiomiocita ventricolare umano. È evidente che iniettare i valori di corrente prelevati dal sistema eterologo senza apportare nessuna modifica, genererebbe degli errori nel modello, e che quindi è necessario scalarli in modo che, eliminando le equazioni di una determinata corrente all'interno del modello di cardiomiocita e sostituendole con un valore di corrente prelevato in tempo reale, il potenziale d'azione che viene generato in silico sia comunque simile a quello generato dal modello originale. In questo modo, si possono eseguire degli esperimenti in *dynamic clamp* andando a confrontare come le correnti influenzino il potenziale d'azione, essendo certi che il modello produce potenziali d'azione fisiologicamente validi, e, perciò, ogni modifica nel suo andamento è imputabile solamente a una variazione della corrente dal sistema eterologo. In caso contrario, se il fattore di scala non fosse stato calcolato correttamente, non sarebbe più possibile confrontare i potenziali d'azione, in quanto non si potrebbe escludere che le differenze tra essi siano derivate in realtà da un fattore di scala sbagliato.

Un'ulteriore questione da tener conto quando si opera in *dynamic clamp*, è che l'andamento delle correnti prelevate dal sistema eterologo potrebbe non essere identico da quello considerato nel modello in-silico. Scalare le correnti prima di inserirle nel

modello potrebbe essere vantaggioso anche nel compensare queste differenze nella dinamica.

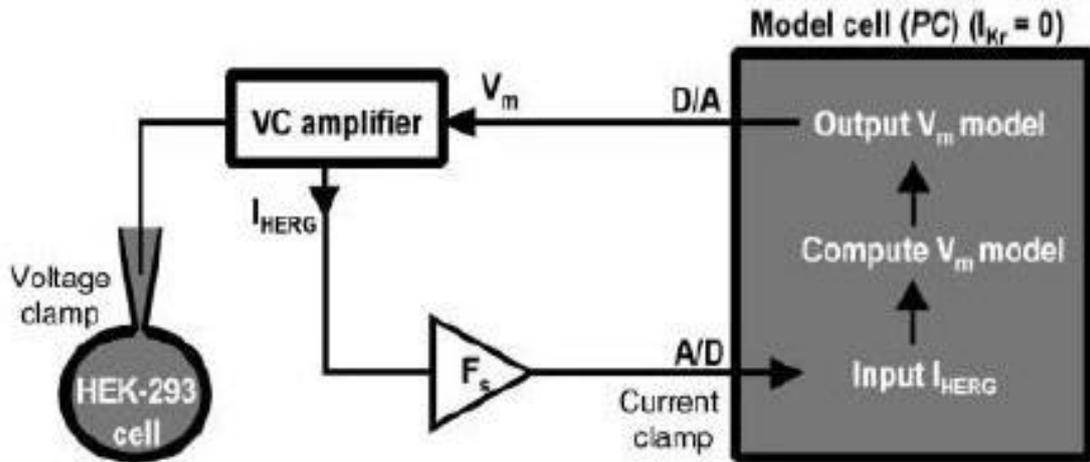


Figura 2.5, Rappresentazione schematica del processo di dynamic action potential clamp, dove la corrente I_{Kr} prelevata dal sistema eterologo viene moltiplicata per un fattore di scala F_s . Tratto da

[27]

Idealmente, conoscendo la conduttanza massima della corrente nel modello di O'Hara-Rudy che si vuole sostituire, e la conduttanza massima della corrente sovra espressa nel sistema eterologo, il fattore di scala può essere calcolato semplicemente come il rapporto tra esse, ovvero come $G_{scale} = \frac{G_{max,ORd}}{G_{max,eterologo}}$. Questo nella realtà è ovviamente impossibile, in quanto, sebbene il valore della conduttanza massima nel modello in-silico sia noto, è totalmente ignoto quello del sistema eterologo. Un metodo potrebbe essere quello di cercare di stimare il valore della conduttanza nel sistema eterologo deducendolo dalla caratteristica I-V (ottenuto quindi tramite un protocollo di attivazione in *voltage clamp*), e poi stimare il fattore di scala tramite il rapporto delle due conduttanze.

In questa simulazione si è invece pensato di andare a stimare il fattore di scala in modo da rendere il più simili possibile, non tanto le conduttanze massime, quanto l'andamento delle correnti stesse. Sono stati proposti due protocolli, uno tramite *voltage clamp* e il secondo tramite *AP clamp*. Entrambi i protocolli prevedono di andare a misurare dei valori di corrente nella cellula per poi confrontarli con quelli invece prodotti dal modello in-silico.

Il primo protocollo è un protocollo di attivazione in *voltage clamp*. Prima di connettere la cellula al sistema in *dynamic clamp* viene eseguito un protocollo di attivazione in *voltage clamp* a gradini con un potenziale di *holding* simile al potenziale di membrana a riposo della cellula (ad esempio, $V_{\text{hold}} = -90 \text{ mV}$), e una serie di gradini con valori di potenziale scelti in base alla corrente di interesse, come in Figura 2.6. Ad ogni gradino viene poi registrato il massimo valore di corrente per costruire la caratteristica I-V di quella corrente. Per rendere questo metodo più robusto al rumore è utile andare a campionare la corrente in più istanti consecutivi e poi scegliere il valore mediano (nella simulazione sono stati considerati 20 campionamenti per gradino). Utilizzando la mediana si riescono ad eliminare eventuali valori spuri causati dal rumore. Inoltre, andando a campionare la corrente in corrispondenza del suo valore massimo, si evita di registrare anche quegli *spike* in corrente, dovuti alle capacità parassite e di membrana, che appaiono all'inizio del gradino quando si va a eseguire un protocollo di attivazione con delle rapide variazioni in tensione. A questo punto la caratteristica I-V del sistema eterologo viene confrontata con la caratteristica I-V di quella determinata corrente precedentemente ricavata dal modello di O'Hara-Rudy.

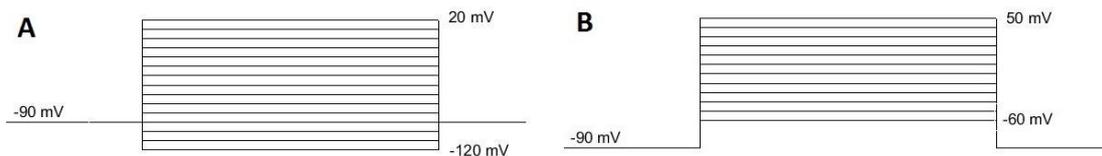


Figura 2.6, A) Protocollo di attivazione per la corrente I_{K1} e B) Protocollo di attivazione per la corrente I_{Kr}

Questo protocollo riesce a stimare dei fattori di scala che consentono di riprodurre un potenziale d'azione simile al modello di O'Hara-Rudy, anche in presenza di correnti con andamento diverso da quello del modello in-silico, e risulta robusto al rumore nella misura della corrente. Tuttavia, se si deve esplorare un'ampia gamma di valori di potenziali di membrana, questo protocollo può diventare lungo e dispendioso in termini di tempo (nell'ordine della decina di secondi). Un'alternativa potrebbe essere quella di concentrare il protocollo di attivazione solo su quei valori di V_{step} che coincidono con valori di potenziale significativi per l'andamento della corrente in modo da accorciare il tempo di esecuzione, ad esempio, eliminando quei gradini in tensione per cui la corrente I_{K1} risulta sicuramente nulla.

Il secondo protocollo prevede invece di andare ad eseguire un *AP clamp* sulla cellula, con il potenziale d'azione prodotto dal modello originale di O'Hara-Rudy, e andare a misurare la corrente che la cellula produce. Questa corrente viene poi confrontata con quella prodotta invece dal modello in-silico, che deve essere stata precedentemente memorizzata. Questo metodo presenta il vantaggio di essere molto più veloce (non più di 500 ms), e quindi risulta particolarmente adatto in un esperimento di *dynamic clamp*, dove le cellule non solo devono essere sottoposte al protocollo di attivazione, ma soprattutto all'esperimento vero e proprio, per cui è importante anche tenere conto del tempo di esecuzione. Tuttavia, è sicuramente più affetto dagli artefatti presenti nel sistema. Ad esempio, dato che si va a confrontare tra loro gli andamenti delle correnti, è importante valutare la durata della diastole rispetto alla durata della sistole, onde evitare che il confronto tra le correnti in diastole abbia un peso maggiore rispetto al confronto tra gli andamenti in sistole, che, invece, risulta maggiormente significativo ai fini della stima del fattore di scala. Per questa simulazione, perciò, si è considerato un protocollo in *AP clamp* della durata di 300 ms, in modo da escludere completamente gli andamenti di corrente in diastole. Questo è ovviamente un problema che non sussiste in un protocollo di attivazione in *voltage clamp*, in quanto non sono presenti le fasi di diastole e di sistole. Un ulteriore accorgimento nell'esecuzione di questo protocollo è quello di andare a eliminare i primi 5 ms della registrazione in modo da trascurare gli *spike* capacitivi iniziali che altrimenti andrebbero a compromettere la stima del fattore di scala.

Una volta misurata la corrente nel sistema eterologo, con uno dei due metodi sopracitati, è necessario adattare il più possibile la corrente misurata a quella del modello in-silico. Per fare questo si può andare a trovare il fattore di scala che meglio adatta la corrente con un metodo di minimizzazione dell'errore quadratico medio, ad esempio con la funzione 'mldivide' già implementata in ambiente Matlab®.

Una modifica al protocollo in *AP clamp* è invece necessaria per trovare il fattore di scala della corrente I_{CaL} , in quanto si deve stimare non solo il fattore moltiplicativo per scalare la sua conduttanza massima, ma anche la concentrazione di calcio intracellulare nel sistema eterologo. Inoltre, essendo l'andamento della corrente I_{CaL} prelevata dal sistema eterologo decisamente diverso da quello della corrente I_{CaL} nel

modello in silico, Figura 2.7, a causa della quasi mancanza di inattivazione calcio-dipendente che ne altera la forma, trovare un fattore di scala con il metodo precedentemente descritto non porterebbe a risultati accettabili.

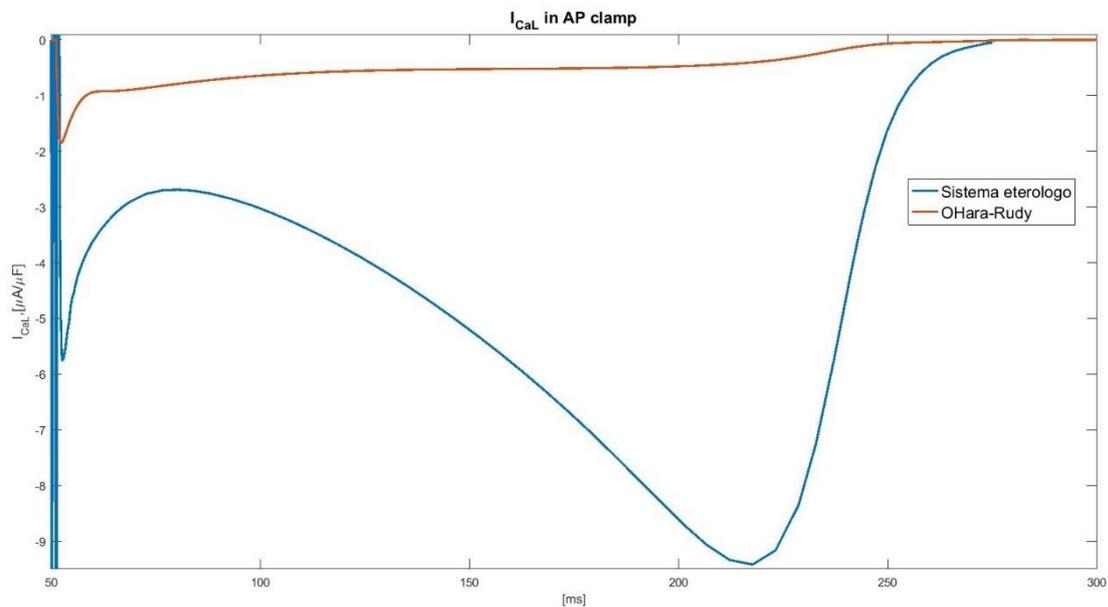


Figura 2.7, Andamento delle correnti I_{CaL} , nel sistema eterologo, curva blu, e nel modello in silico di O'Hara-Rudy, curva rossa.

Perciò, si è utilizzato comunque un protocollo in *AP clamp* per registrare la corrente I_{CaL} dal sistema eterologo, ma poi, tramite la funzione 'fminsearch' implementata in Matlab[®], si stimano i due parametri, il fattore di scala e la concentrazione intracellulare di calcio, che rendono l'andamento della corrente calcolata con le equazioni fornite dal modello di O'Hara-Rudy maggiormente simile a quella acquisita dal sistema eterologo. Dato che la corrente nel modello in silico ha un'ampiezza minore rispetto a quella prelevata da un sistema eterologo dove sono stati sovra espressi i canali di interesse, il fattore di scala risultante sarà l'inverso di quello calcolato con la funzione 'fminsearch'.

2.5 SOMMINISTRAZIONE VIRTUALE DI UN FARMACO

Per valutare l'effetto di un farmaco sul potenziale d'azione, in un sistema di *dynamic clamp*, dopo aver effettuato il protocollo per la compensazione del leakage e per la stima del fattore di scala, si pone il farmaco nel bagno extracellulare dove è posta la cellula e si effettua l'esperimento in *dynamic clamp* per un certo periodo di tempo prefissato. In questa simulazione il procedimento seguito è identico, e l'effetto del farmaco è stato simulato andando a modificare la conduttanza del sistema eterologo, dopo aver prima stimato il fattore di scala con il valore di conduttanza originale, tenendo conto della capacità del farmaco considerato di bloccare una certa percentuale di canali. In farmacologia, la capacità di una molecola di inibire i canali ionici viene descritta con una funzione sigmoidale la cui pendenza e concentrazione per cui la metà dei canali è inibita sono parametri propri di quella molecola verso un determinato canale ionico (Figura 2.8).

La funzione viene perciò descritta in funzione della concentrazione di farmaco $[C]$, come $\frac{1}{1+(\frac{IC_{50}}{[C]})^h}$, dove h rappresenta proprio la pendenza della curva, mentre IC_{50} ,

abbreviazione di *half maximal inhibitory concentration*, è il valore di concentrazione del farmaco per cui il 50% dei canali sono inibiti, ovvero la conduttanza massima è stata ridotta della sua metà. Nella simulazione, la conduttanza massima di una corrente

inibita da un farmaco è stata calcolata come $G_{max,drug} = G_{max} \cdot \left(1 - \frac{1}{1+(\frac{IC_{50}}{[C]})^h}\right)$ [28],

ovvero come porzione di conduttanza residua nonostante l'inibizione. I valori di h e IC_{50} sono stati presi da [29] così come la concentrazione di farmaco indicata in $EFTPC_{max}$.

Per valutare l'effetto di un farmaco sono state eseguite più simulazioni, dove per ognuna si sono simulate cellule diverse in pozzetti diversi, in questo modo è stata presa in considerazione la variabilità tra esperimenti differenti, sia per quanto riguarda la variabilità dei sistemi eterologhi sia per quanto riguarda la variabilità del set up del sistema di acquisizione, come descritto precedentemente, a cui è stata aggiunta anche

una variabilità sull'offset in tensione residuo altrimenti posto al valore fisso di 2 mV. Per quello che riguarda la variabilità intracellulare, oltre a una variabilità sulla capacità di membrana descritta precedentemente, è stata aggiunta una variabilità sulla misura della capacità di membrana effettivamente stimata e in più la conduttanza massima di ogni corrente è stata fatta variare secondo una curva gaussiana centrata nel valore di conduttanza massima con deviazione standard pari a 0.2. In ogni esperimento sono stati prima effettuati i protocolli di compensazione del leakage, poi sono stati stimati tutti i fattori di scala e infine è stato eseguito l'esperimento in *dynamic clamp*. Sempre nello stesso esperimento, quindi mantenendo gli stessi fattori di scala, è stata poi simulata la somministrazione del farmaco.

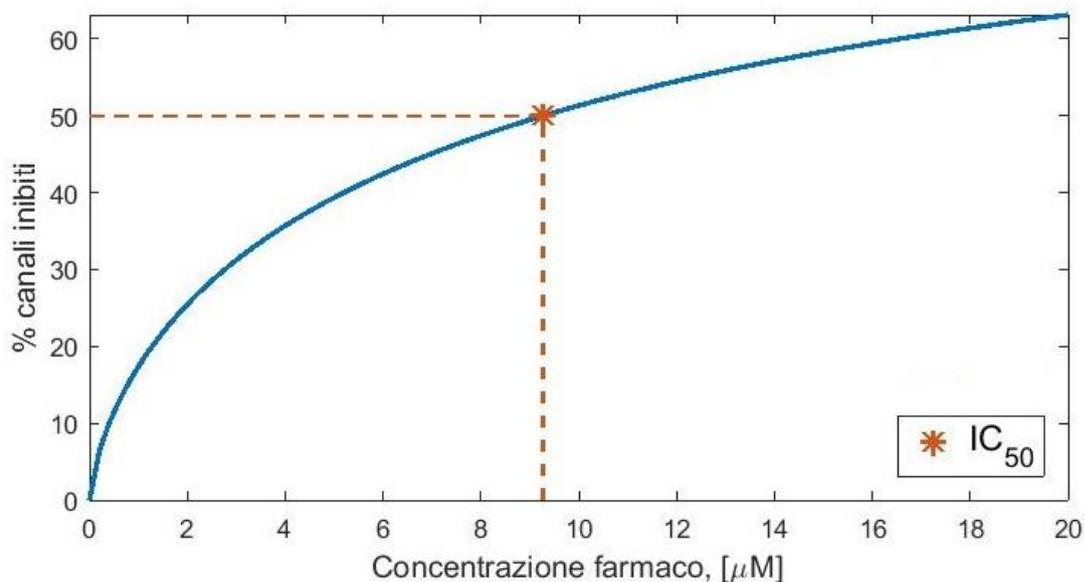


Figura 2.8, Curva che descrive la capacità inibitoria di un farmaco dato il valore IC_{50} e la pendenza h .

Capitolo 3

RISULTATI

3.1 I FATTORI CHE INFLUENZANO LA DURATA DEL POTENZIALE D'AZIONE

3.1.1 Fattori derivanti dal sistema di acquisizione

Acquisire un segnale comporta sempre una sua alterazione indesiderata dovuta al sistema fisico d'acquisizione, specialmente se il segnale in questione è un segnale biologico e di piccola entità, come le correnti ioniche nelle cellule in vitro. Un buon sistema d'acquisizione è tale se si riescono a compensare adeguatamente queste alterazioni, in modo che il segnale risultante sia il più possibile uguale a quello effettivamente prelevato e i disturbi ad esso sovrapposti non vadano ad inficiare poi sull'elaborazione finale.

Nel caso di un sistema di acquisizione usato per esperimenti in *dynamic clamp*, è fondamentale che le correnti acquisite siano effettivamente quelle presenti nella cellula osservata, in quanto non si va a valutare direttamente il segnale in corrente, ma questo serve da input per una simulazione real-time che riproduce un potenziale d'azione cardiaco. Un'incorretta acquisizione della corrente, ovvero un segnale a cui sono state aggiunte alterazioni dal sistema di acquisizione, può produrre un potenziale d'azione diverso da quello aspettato. Nel caso di esperimenti con correnti *wild-type* l'output desiderato è noto, in quanto è nota la forma e la durata del potenziale d'azione prodotto dal modello in silico di O'Hara-Rudy, per cui un'acquisizione errata di una corrente che si ripercuote sul potenziale d'azione può essere facilmente identificata, ma, nel momento in cui l'obiettivo dell'esperimento è quello di valutare gli effetti di un nuovo farmaco sui canali ionici del cardiomiocita, una modifica del potenziale d'azione rispetto al modello originale deve poter essere univocamente imputabile al farmaco stesso, e non a un difetto nel sistema d'acquisizione, altrimenti, l'esperimento in *dynamic clamp* perde di veridicità e risulterebbe inutile a questo scopo.

Per questo motivo, il sistema d'acquisizione deve prevedere delle compensazioni adeguate per tutti quei fattori che possono alterare il segnale di corrente acquisito. Queste compensazioni spesso sono basate su una stima di alcuni parametri circuitali o caratteristiche della cellula che per loro natura introducono degli errori, per cui una stima incorretta di questi parametri comporta poi una compensazione errata che si riflette sul potenziale d'azione.

In questo capitolo sono presentate le principali compensazioni da effettuare in un sistema di acquisizione per *patch clamp* e il loro impatto sulla durata del potenziale d'azione. La durata del potenziale d'azione, e in particolare la misura dell'APD₉₀, è stata scelta come principale biomarker per valutare gli effetti delle compensazioni, perché la modifica della durata del potenziale d'azione è proprio uno dei maggiori effetti delle correnti ioniche e uno dei parametri che si valuta nel drug testing. Per fare questa valutazione si sono effettuate due analisi: una sulle correnti ripolarizzanti di potassio e una sulla corrente depolarizzante di calcio L-type.

Nella prima analisi si sono prese in considerazione due correnti di potassio uscenti (I_{Kr} e I_{K1}), nella formulazione di O'Hara-Rudy, che hanno la funzione di ripolarizzare il potenziale d'azione. Con queste correnti si è eseguita una simulazione in *dynamic clamp* partendo da un sistema di acquisizione perfettamente compensato e in cui i parametri sono stati fatti variare uno alla volta per poter correlare una variazione dell'APD₉₀ solo all'effetto della compensazione di quel parametro.

- **La compensazione della capacità di membrana**

Essendo la cellula dotata di una membrana cellulare a doppio strato fosfolipidico, nella sua rappresentazione circuitale viene inclusa anche una capacità che rappresenta appunto la capacità di membrana. Se si vanno a valutare gli effetti di questa capacità nell'acquisizione delle correnti, si nota che non solo va ad influire sulla costante di tempo con cui la cellula si porta al valore di potenziale imposto dal sistema, ma vengono prodotte anche delle oscillazioni in corrente che non rappresentano il flusso di corrente attraverso i canali ionici. Per questo motivo è utile prevedere una compensazione di questa capacità partendo da una stima del suo valore.

Il valore stimato della capacità di membrana viene utilizzato anche per trasformare la corrente acquisita in una densità di corrente, opportunamente scalata, da utilizzare nel modello in silico di O'Hara-Rudy. Questa trasformazione, in realtà, non ha un'influenza significativa sulla durata del potenziale d'azione, perché un errore nel calcolo della densità di corrente, ottenuta andando a dividere la corrente misurata per il valore di C_m stimato, viene poi compensato nel calcolo stesso del fattore di scala, in quanto anche la corrente di riferimento viene ottenuta andando a moltiplicare la densità di corrente del modello originale di O'Hara-Rudy per lo stesso valore di C_m stimato.

Una modifica nel valore dell' APD_{90} è perciò imputabile solo all'effetto che ha un'incorretta compensazione della capacità di membrana sulla corrente acquisita. La corrente necessaria per caricare questa capacità è una corrente di tipo entrante, perciò nel caso di una sottostima del valore di C_m rimane una parte di corrente capacitiva entrante non compensata che si sovrappone alla corrente di interesse e, dato che in questa analisi sono state considerate solo correnti uscenti, ne va a diminuire il valore finale. Viceversa, se il valore di C_m viene sovrastimato, la corrente entrante viene totalmente compensata, ma si aggiunge anche una percentuale di corrente capacitiva uscente, dovuta all'ipercompensazione, che si somma alla corrente di interesse andandone ad aumentare il valore.

Analizzando il caso in cui il valore di capacità stimato sia minore di quello reale si nota un aumento della durata del potenziale d'azione a causa di una sotto compensazione della corrente capacitiva, come si può notare nella parte sinistra di Figura 3.1, in corrispondenza dei valori di C_m stimati pari a una percentuale minore del valore esatto. L'impatto maggiore di questa compensazione si nota osservando l'andamento della corrente I_{K1} . Infatti, questa corrente presenta un'ampiezza quasi nulla per la maggior parte della durata del potenziale d'azione, per cui, il sistema di acquisizione, che registra anche la corrente capacitiva sovrapposta, preleva una corrente complessivamente entrante. Questa corrente entrante, perciò, va a sostenere il mantenimento del plateau, aumentando la durata del potenziale d'azione.

Analizzando, invece, il caso in cui il valore di capacità stimato sia maggiore di quello reale, si nota una diminuzione della durata del potenziale d'azione a causa di una ipercompensazione della corrente capacitiva, come si può notare nella parte destra di

Figura 3.1, in corrispondenza dei valori di C_m stimati pari a una percentuale maggiore del valore esatto. Di nuovo, questo effetto può essere maggiormente imputabile alla corrente I_{K1} , che essendo una corrente piccola risente maggiormente dei disturbi sovrapposti. Alla corrente acquisita si è aggiunta, questa volta, una componente di corrente uscente che va ad aumentare la corrente complessiva. Questa corrente uscente dovuta all'ipercompensazione si ritrova anche in quel tratto in cui I_{K1} dovrebbe apparire quasi nulla. Questo fa sì che, per tutta la durata del potenziale d'azione, sia sempre presente una piccola quantità uscente di I_{K1} , che, insieme ad altre correnti ripolarizzanti, fisiologicamente presenti e presenti nel modello in silico di O'Hara-Rudy, va ad accorciare il potenziale d'azione.

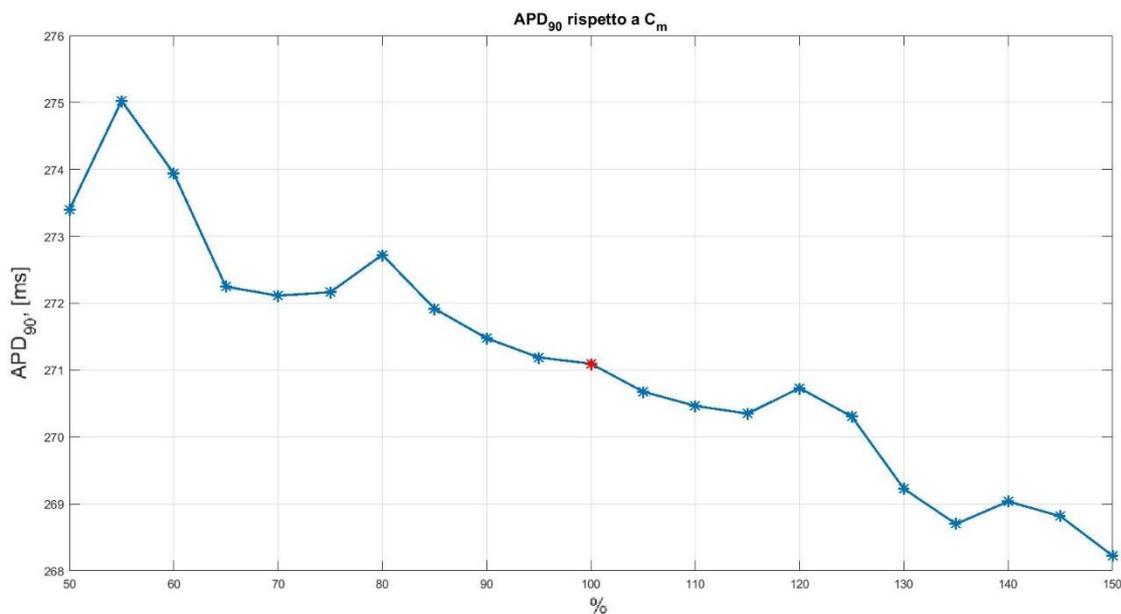


Figura 3.1, Andamento del valore di APD_{90} rispetto alla percentuale di capacità di membrana stimata. Dal 50% al 100% si tratta di sottostima del valore reale, mentre dal 100% al 150% è una sovrastima del suo valore. Il fattore di scala è stato calcolato escludendo il transitorio capacitivo iniziale (da 55 ms a 350 ms).

L'analisi, precedentemente descritta, dell'effetto della compensazione della capacità di membrana è stata fatta utilizzando un protocollo di stima del fattore di scala già perfezionato, dove la minimizzazione dell'errore quadratico medio tra la corrente acquisita e la corrente di riferimento è stata effettuata su un intervallo di tempo che va da 55 ms a 350 ms, considerando che il potenziale d'azione in *AP clamp* inizia a 50 ms e termina a 350 ms. In Figura 3.2 è mostrato l'andamento dell' APD_{90} rispetto alla percentuale di capacità di membrana compensata, dove, però, la stima del fattore di

scala è stata effettuata su intervallo di tempo da 50 ms a 300 ms, ovvero considerando l'intera durata del potenziale d'azione. Durante i primi 5 ms dall'inizio del potenziale d'azione, sulla corrente acquisita dal sistema di acquisizione sono presenti degli *spike* iniziali di corrente, dovuti proprio alla capacità di membrana, come si nota in Figura 3.3. Se nella corrente acquisita sono presenti dei picchi, durante la stima del fattore di scala essi avranno un peso rilevante, in quanto non presenti nella corrente di riferimento, facendo sì che il fattore di scala risultante sia minore di quello calcolato in assenza dei picchi iniziali. In particolar modo, si nota una differenza nel valore del fattore di scala per la corrente I_{K1} in quanto i picchi iniziali hanno un'ampiezza che è molto maggiore dell'ampiezza della corrente stessa. Osservando Figura 3.2 si nota che per valori di capacità di membrana sotto compensati, che presentano un picco di corrente uscente come la curva viola in Figura 3.3, la durata dell' APD_{90} rimane maggiore rispetto al caso con capacità di membrana perfettamente compensata, come già visto in Figura 3.1, con l'unica differenza che i valori del fattore di scala risultano minori, perciò i valori di APD_{90} risultano leggermente maggiori rispetto a quelli in Figura 3.1. Diverso è il comportamento per valori di capacità di membrana sovrastimati, dove la corrente acquisita presenta un picco di corrente entrante come la curva verde di Figura 3.3. Infatti, da una certa percentuale di sovrastima in poi si nota un aumento del valore di APD_{90} , contrariamente a quanto succedeva in Figura 3.1. Questo proprio perché il valore del fattore di scala stimato tenendo conto anche dei primi 5 ms risulta minore. Per cui, anche se durante la fase di plateau è sempre presente una piccola quantità di corrente I_{K1} uscente come descritto per Figura 3.1, la corrente acquisita viene moltiplicata per un fattore più piccolo, per cui la forza ripolarizzante complessiva è minore, e conseguentemente l' APD_{90} si allunga. Tenendo conto di questo errore sulla stima del fattore di scala dovuto alla presenza di picchi iniziali a causa di una compensazione errata della capacità di membrana, è utile effettuare la stima del fattore di scala eliminando questi picchi, ad esempio trascurando i primi 5 ms dall'inizio del potenziale d'azione, assumendo che in questo intervallo di tempo il transitorio capacitivo si sia esaurito. È anche interessante notare come la presenza dei picchi iniziali non influisca sulla stima del fattore di scala per la corrente I_{Kr} , la cui ampiezza, maggiore della corrente I_{K1} sin dall'inizio del potenziale d'azione, fa sì che il peso attribuito agli *spike* iniziali risulti complessivamente minore.

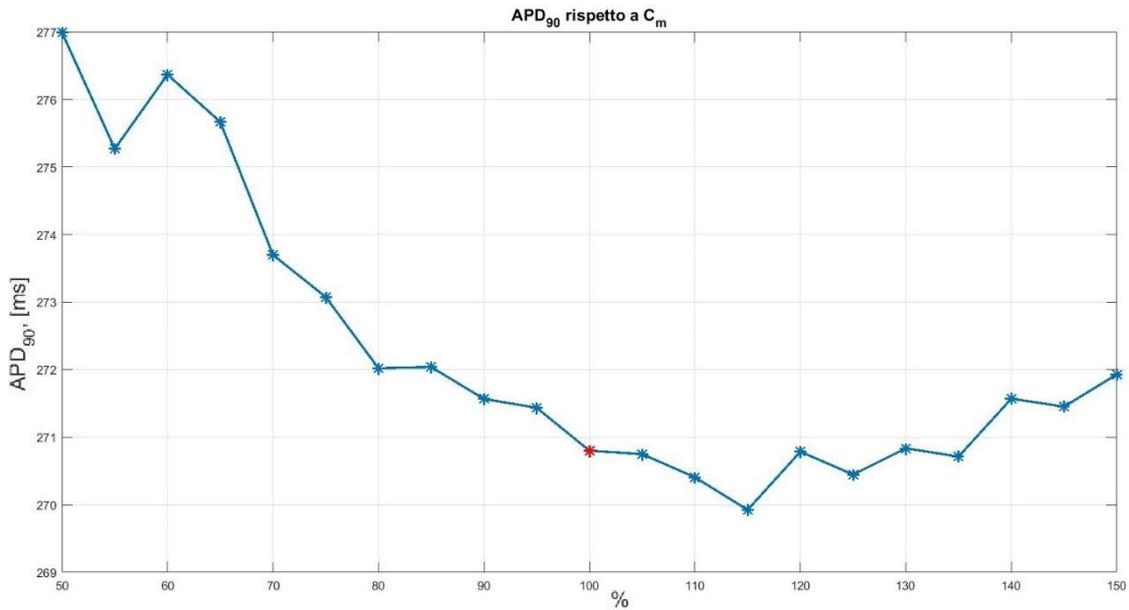


Figura 3.2, Andamento del valore di APD_{90} rispetto alla percentuale di capacità di membrana stimata, con fattore di scala calcolato sull'intera durata della sistole (da 50 ms a 350 ms).

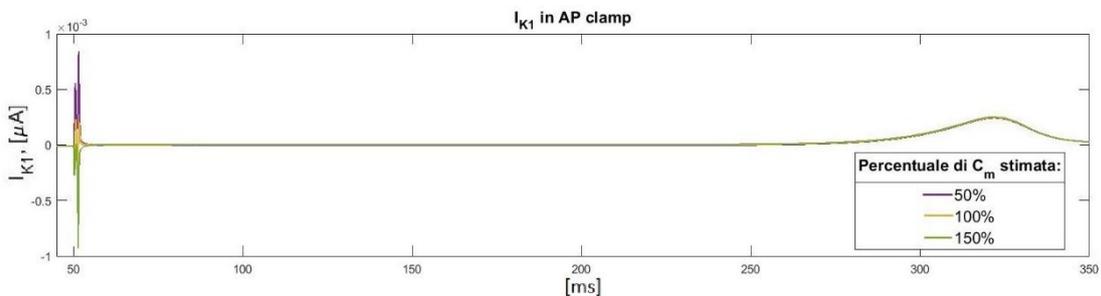


Figura 3.3, Andamento della corrente I_{K1} con diversi valori di capacità di membrana compensata.

- **La compensazione della resistenza serie**

La presenza della resistenza serie provoca una caduta di potenziale sulla micropipetta che risulta in una diminuzione del valore di potenziale effettivamente percepito dalla cellula. Perciò, in un esperimento in *voltage clamp* quando si impone un dato potenziale per prelevare una corrente, in realtà la cellula si trova ad un potenziale minore di quello previsto. Questo è quello che accade durante la simulazione in *dynamic clamp*. Se la resistenza non è stata adeguatamente compensata, il potenziale d'azione che la cellula percepisce sarà diverso da quello generato dal modello in silico e la risposta in corrente della cellula sarà perciò adeguata a quel potenziale, ma diversa dalla corrente che ci si aspetterebbe con il potenziale d'azione originariamente

prodotto dal modello in silico. Osservando il grafico, in Figura 3.4, della corrente I_{Kr} ottenuta in *dynamic clamp* si nota come non solo l'ampiezza della corrente sia diverso, ma lo stesso andamento sia differente, curva verde e blu, rispetto alla corrente di riferimento, curva rossa.

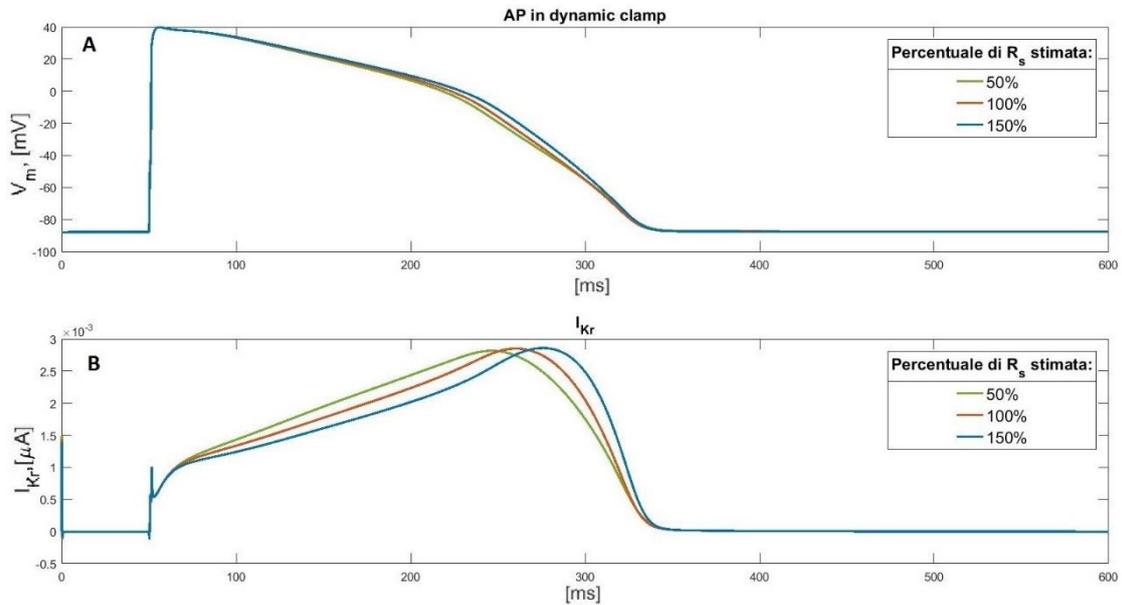


Figura 3.4, A) Il potenziale d'azione ottenuto in *dynamic clamp* per tre diverse percentuali di compensazioni della resistenza serie. B) Le correnti I_{Kr} corrispondenti ai potenziali d'azione in Fig. 3.3A.

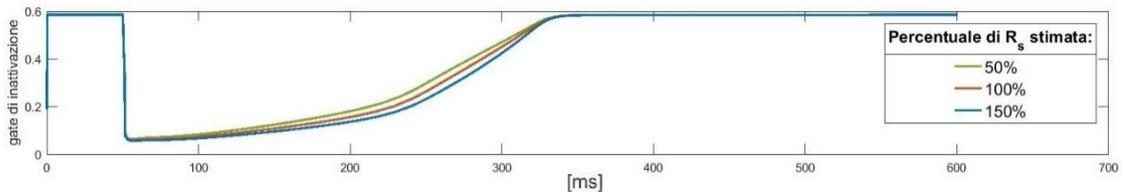


Figura 3.5, Andamento del gate di inattivazione di I_{Kr} in AP clamp.

Nel caso di resistenza sottostimata si nota una maggior quantità di corrente durante la fase di plateau. Questo è dovuto al fatto che il gate di inattivazione della corrente I_{Kr} è molto veloce, (istantaneo nel modello di O'Hara-Rudy dove è descritto come una funzione algebrica in funzione del potenziale di membrana) per cui il recupero dell'inattivazione è maggiore nel caso in cui la cellula percepisca valori di potenziale d'azione minori, come si nota in Figura 3.5. Una sotto compensazione della resistenza serie provoca, infatti, un potenziale d'azione con ampiezza minore di quello originario in fase di plateau, curva verde in Figura 3.4A, facendo sì che il gate di inattivazione si trovi a valori maggiori. Durante il protocollo di stima del fattore di scala, dato che la

corrente acquisita risulta anticipata rispetto alla corrente di riferimento, curva verde in Fig. 3.4B, il fattore di scala risulta essere più piccolo del previsto. L'andamento della corrente contribuirebbe quindi a ripolarizzare più velocemente la cellula diminuendo così la durata del potenziale d'azione, data la maggior ampiezza durante la fase di plateau. Ma, essendo moltiplicata per un fattore di scala minore, l'effetto complessivo è quello di un aumento del potenziale d'azione a causa di una minore densità di corrente iniettata nel modello in silico.

Viceversa, se avviene un'ipercompensazione, il potenziale d'azione percepito dalla cellula sarà maggiore di quello reale in fase di plateau. Anche in questo caso si può vedere come l'andamento della corrente I_{Kr} di Figura 3.4B, curva blu, sia differente, in particolare come sia minore la quantità di corrente durante la fase di plateau, che comporta un prolungamento di questa fase e un conseguente prolungamento della durata del potenziale d'azione. Da Figura 3.4 si nota come la curva blu, che rappresenta l'andamento del gate di inattivazione, in questo caso rimanga a valori bassi per più tempo, in quanto risente di un valore di potenziale maggiore, facendo sì che più canali rimangano chiusi durante la fase di plateau. D'altra parte, il fattore di scala che viene stimato è maggiore, per cui la corrente in input al modello in silico risulta maggiore, ma l'effetto risultante è comunque un allungamento della durata del potenziale d'azione.

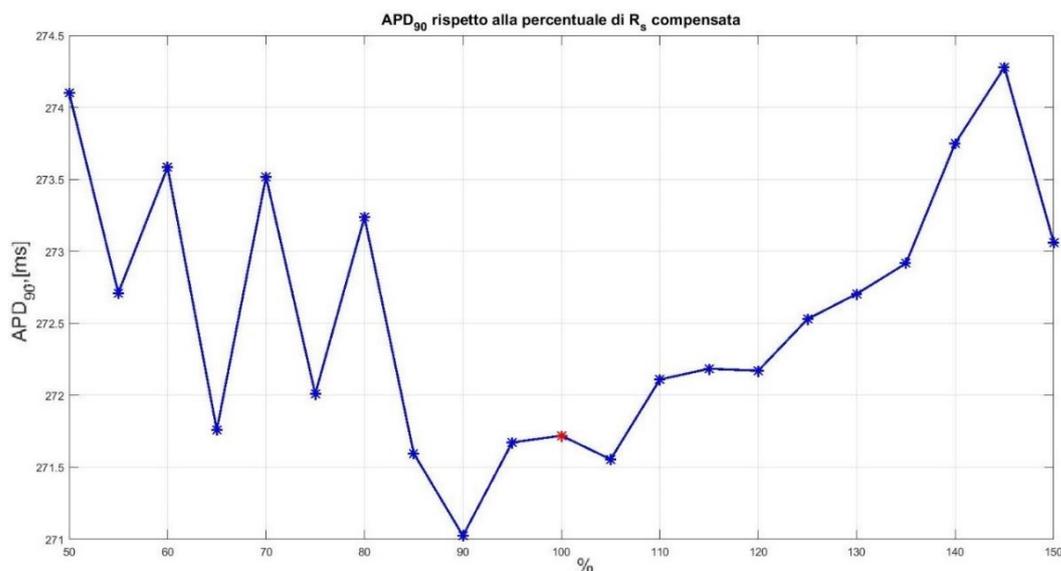


Figura 3.6, Andamento del valore di APD₉₀ rispetto alla percentuale di resistenza serie compensata. Dal 50% al 100% si tratta di sottostima del valore reale, mentre dal 100% al 150% è una sovrastima del suo valore.

In Figura 3.6 è riportata la dipendenza dell'APD₉₀ dalla percentuale di resistenza serie compensata da cui si nota come sia una ipercompensazione che una sotto compensazione del valore della resistenza serie produca un allungamento del potenziale d'azione. Solitamente, negli esperimenti in *patch clamp* si cerca di compensare solo una percentuale (70% ÷ 90%) del valore della resistenza serie [24].

- **Il potenziale di offset residuo**

Il potenziale di offset residuo è quella caduta di tensione sulla resistenza serie che rimane comunque dopo la compensazione. L'effetto di un offset residuo è quindi quello di sovrapporre al potenziale d'azione che viene imposto alla cellula un offset in tensione, come in Figura 3.7. La conseguenza più rilevante è sul calcolo del fattore di scala. In Figura 3.7 si può vedere la differenza delle correnti I_{Kr} e I_{K1} acquisite in *AP clamp*, con offset nullo, curva blu, o in presenza di offset, curva rossa. Se è presente un offset in tensione, infatti, il potenziale d'azione percepito dalla cellula non ritorna al valore di riposo durante la fase di diastole, per cui non viene completata la deattivazione del gate di attivazione, ma alcuni canali ionici rimangono aperti anche in diastole, facendo sì che, anche in questa fase, ci sia una corrente ionica, che può assumere un'ampiezza rilevante per la corrente I_{K1} , come in Figura 3.7C. Le correnti così acquisite vengono confrontate con le correnti di riferimento calcolate con il modello di O'Hara-Rudy, che in fase diastolica risultano quasi nulle. Essendo il calcolo del fattore di scala basato sulla minimizzazione dell'errore quadratico medio, ed essendoci una differenza considerevole tra le due correnti in fase diastolica, con la corrente acquisita che risulta assai maggiore di quella di riferimento, il fattore di scala ottenuto risulta decisamente minore rispetto a quello calcolato in assenza di un offset in tensione, in quanto viene pesata maggiormente la differenza tra le due correnti in fase diastolica. Andando poi a effettuare l'esperimento in *dynamic clamp* con un fattore di scala piccolo, le correnti ripolarizzanti non riescono ad avere un'efficacia tale da ripolarizzare correttamente il potenziale d'azione, causandone un suo prolungamento, come riportato in Figura 3.8A.

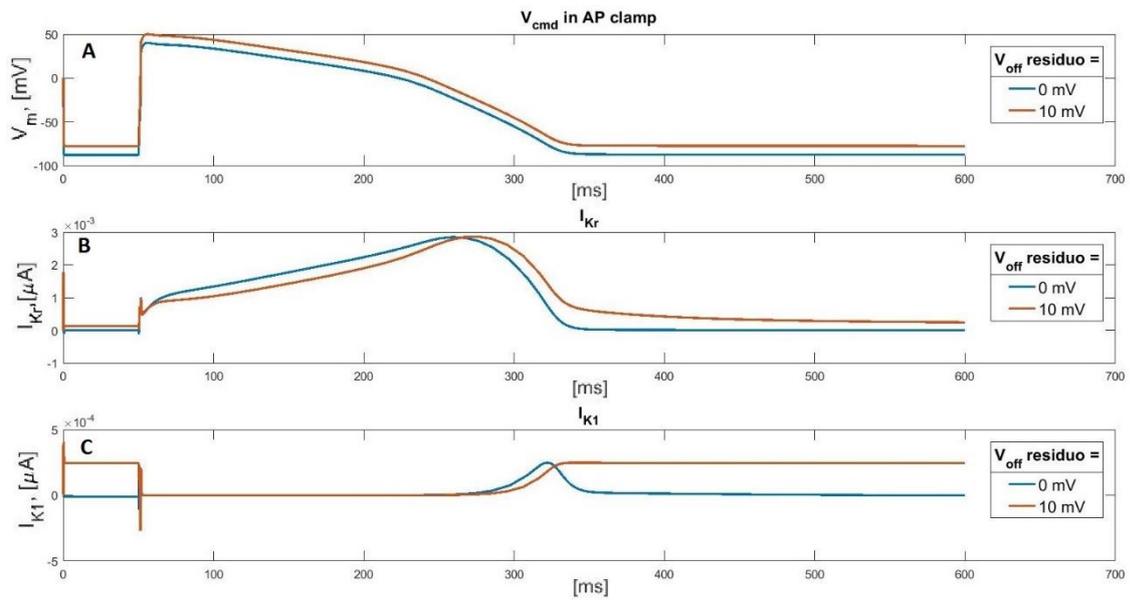


Figura 3.7, A) Potenziale d'azione percepito dalla cellula in AP clamp, con offset in tensione nullo per la curva blu, e offset in tensione pari a 10 mV per la curva rossa. B) Corrente I_{Kr} acquisita in AP clamp con i potenziali d'azione corrispondenti in Fig. 3.7A. C) Corrente I_{K1} acquisita in AP clamp con i potenziali d'azione corrispondenti in Fig. 3.7A

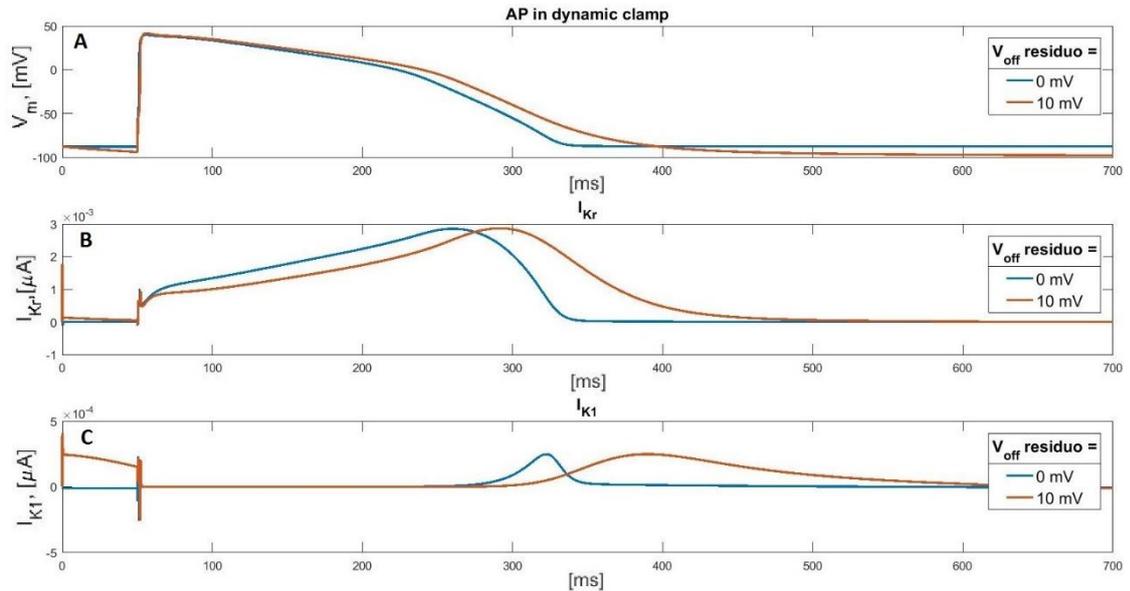


Figura 3.8, A) Potenziale d'azione percepito dalla cellula durante l'esperimento in dynamic clamp, con offset in tensione nullo per la curva blu, e offset in tensione pari a 10 mV per la curva rossa. B) Le correnti I_{Kr} corrispondenti ai potenziali d'azione in Fig. 3.8A. C) Le correnti I_{K1} corrispondenti ai potenziali d'azione in Fig. 3.8A.

La criticità sta perciò nella fase di stima del fattore di scala, e in particolare nella scelta della durata della corrente da confrontare. Andando ad acquisire la corrente in *AP clamp* per la durata di 1 secondo, si ha all'incirca un terzo della durata in cui è presente il potenziale d'azione, mentre per il tempo rimanente il potenziale imposto alla cellula rimane al suo valore di riposo. Questo causa uno squilibrio tra il peso dato allo scalare la corrente in fase di sistole rispetto alla fase di diastole, in quanto la fase di diastole, essendo due volte più lunga, contribuisce maggiormente, con il risultato che il fattore di scala risulta molto piccolo.

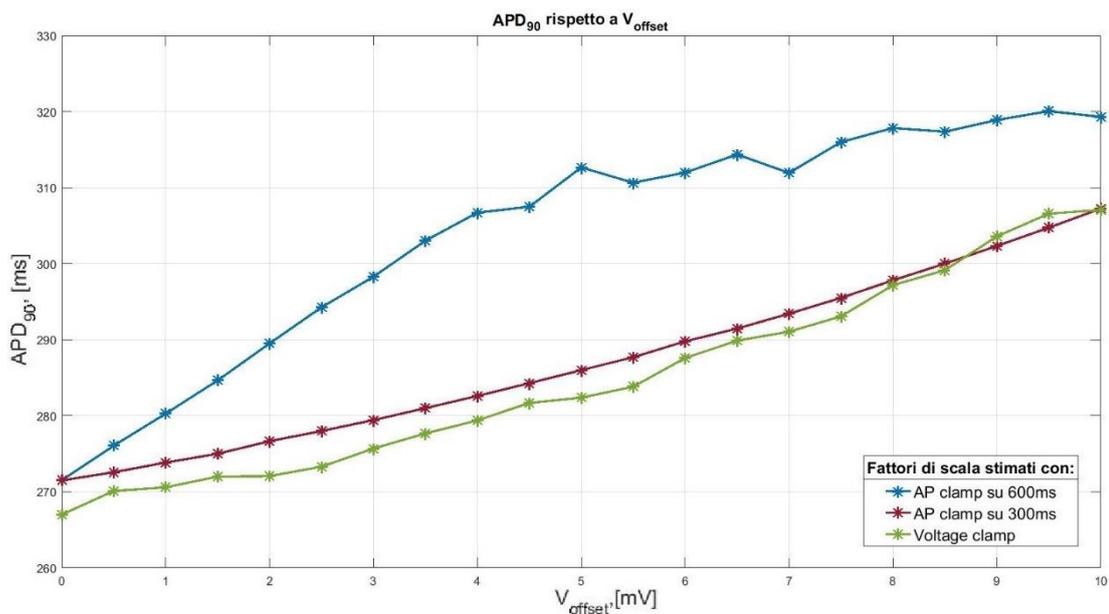


Figura 3.9, Dipendenza della durata del potenziale d'azione dall'offset in tensione residuo (in ascissa), e dal tipo di protocollo utilizzato per il fattore di scala.

In Figura 3.9 è mostrato un grafico che lega la durata del potenziale d'azione al valore di offset residuo, sia nel caso in cui il fattore di scala sia stimato su 600 ms sia su 300 ms. Si noti come nel primo caso, curva blu, sebbene la durata della sistole e della diastole siano quasi uguali (il valore di APD₉₀ in *AP clamp* è fissato a 270 ms), l'effetto sull'allungamento dell'APD₉₀ è comunque significativo rispetto al considerare solo 300 ms, curva rossa (in cui il confronto avviene quasi solo in fase di sistole). La scelta della durata della fase di diastole nella stima del fattore di scala non ha effetti significativi sulla durata dell'APD₉₀ se si va a valutare gli effetti della capacità di membrana o della resistenza serie, quindi una minor durata della diastole può essere utile per minimizzare gli effetti di un potenziale di offset residuo. Essendo

il potenziale di offset residuo uno dei fattori che più incide sulla durata del potenziale d'azione, la scelta del protocollo di stima del fattore di scala risulta determinante. Si vede, inoltre, in Figura 3.9, come un protocollo in *voltage clamp*, curva verde, che non risente della differenza tra fase di diastole e sistole, riesca a contenere meglio l'effetto di un allungamento dell'APD₉₀, causato dall'offset residuo, rispetto a un protocollo in *AP clamp*. A seguito di queste considerazioni si è deciso di utilizzare per questa simulazione un protocollo di stima del fattore di scala di 300 ms. Da Figura 3.9 risulta evidente come la compensazione, effettuata prima dell'inizio dell'esperimento, di un eventuale offset in tensione sia decisivo sul risultato dell'esperimento in *dynamic clamp*. Infatti, un offset residuo di 3 mV è responsabile di un allungamento del potenziale di quasi 10 ms, nel caso in cui il protocollo usato per il fattore di scala sia un *AP clamp* lungo 300 ms, mentre se l'ampiezza dell'offset in tensione è maggiore si ottiene un APD₉₀ molto distante dalla lunghezza dell'APD₉₀ calcolata sul potenziale d'azione nel modello ORd, che in questa analisi è stato preso come riferimento. Il grafico in Figura 3.10 mostra invece l'effetto congiunto dell'offset in tensione e della capacità di membrana. La compensazione della capacità di membrana ha un effetto meno rilevante sulla durata del potenziale d'azione rispetto alla presenza di un offset residuo, ma si può comunque notare come una sottostima o una sovrastima del valore di C_m influisca sulla misura dell'APD₉₀.

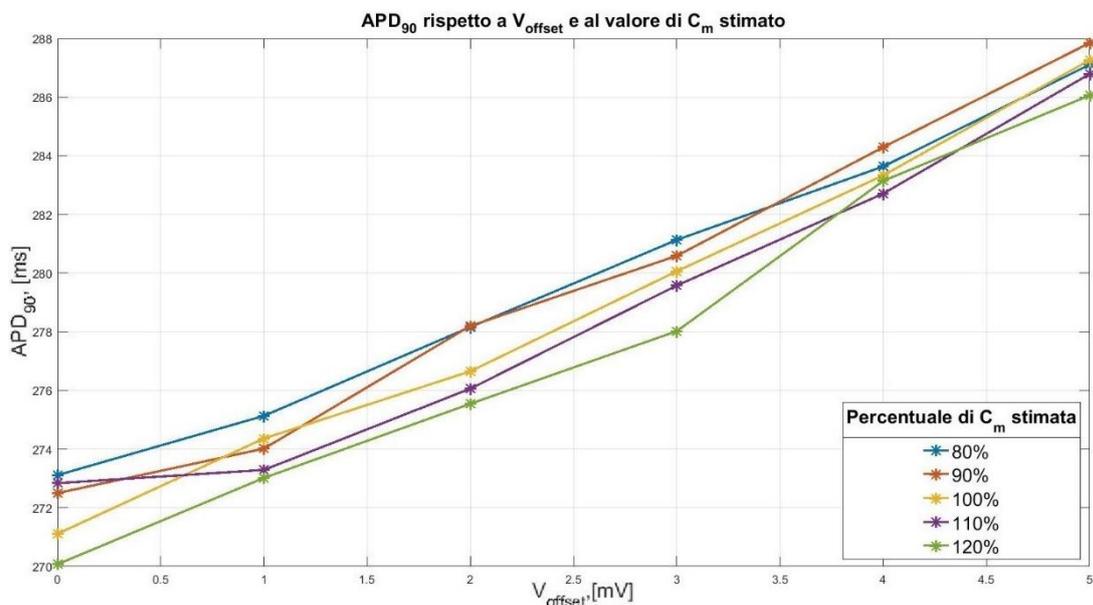


Figura 3.10, Dipendenza della durata del potenziale d'azione rispetto a un offset in tensione residuo, in ascissa, e rispetto a diversi valori di compensazione della capacità di membrana

- **La compensazione della corrente di leakage**

La corrente di leakage è quella corrente che scorre tra il compartimento extracellulare e l'interno della micropipetta a causa di un sigillo imperfetto tra pipetta e membrana cellulare, e che si va a sovrapporre alla corrente di interesse che si sta misurando. La prima accortezza che è necessario avere, in un esperimento in *patch clamp*, è quella di assicurarsi che il sigillo che si è formato soddisfi certi requisiti che ne assicurano la bontà. Per verificare questo si va a misurare la resistenza che si forma tra la membrana cellulare e la pipetta. Se questa resistenza supera il valore di 1 GΩ, allora il sigillo è sufficientemente adeguato, e sigilli con un valore di resistenza superiori saranno sicuramente migliori. In questa analisi si sono confrontati due casi: il caso peggiore in cui la resistenza di sigillo è esattamente pari al minimo accettabile, 1 GΩ, e il caso in cui la resistenza di sigillo sia invece pari a 10 GΩ, che rappresenta il caso di un sigillo ottimale e in cui la corrente di leakage è già molto contenuta. La corrente di leakage è stata modellata come una corrente sovrapposta a quella di interesse, rappresentata da una formula del tipo $g_{leak} \cdot (V - E_{leak})$, dove g_{leak} può essere considerata all'incirca come l'inverso di R_{seal} , mentre E_{leak} è stato considerato nullo, ovvero si è supposto un bagno extracellulare perfettamente conduttivo. Quindi la corrente di leakage ha un comportamento lineare rispetto al potenziale imposto alla cellula, e la sua compensazione può avvenire stimandone la pendenza g_{leak} e il valore di E_{leak} .

Andando a osservare il caso in cui R_{seal} è pari a 1 GΩ, in modo che gli effetti della corrente di leakage sovrapposta siano più evidenti, si nota come la corrente I_{K1} che viene acquisita in fase di stima del fattore di scala abbia un comportamento decisamente diverso nel caso in cui sia presente del leakage sovrapposto, curva rossa, o meno, curva blu, in Figura 3.11B. In particolare, durante il plateau I_{K1} è uscente e presenta un'ampiezza maggiore rispetto alla corrente in assenza di leakage, mentre in fase di diastole diventa entrante. Il protocollo di stima del fattore di scala si basa sulla minimizzazione dell'errore quadratico medio, ed essendo la corrente acquisita maggiore della corrente di riferimento sia in fase diastolica sia durante il plateau (andandole a considerare in valore assoluto), il fattore di scala risultante risulta minore rispetto a quello calcolato in assenza di leakage.

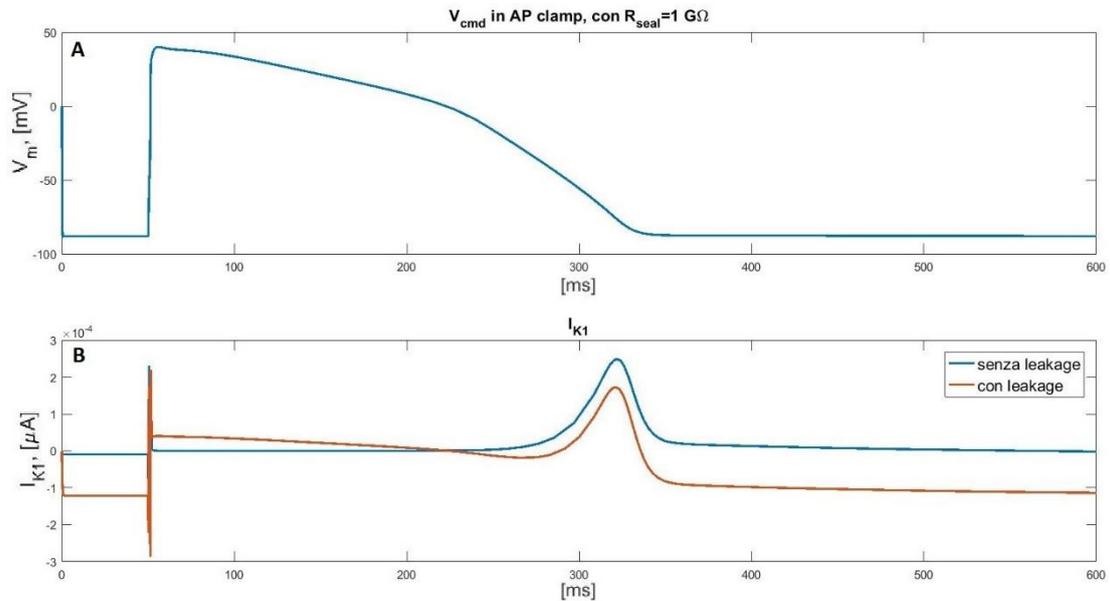


Figura 3.11, A) Potenziale d'azione percepito dalla cellula in AP clamp. B) Le correnti I_{K1} corrispondenti al potenziale d'azione in Fig. 3.11A.

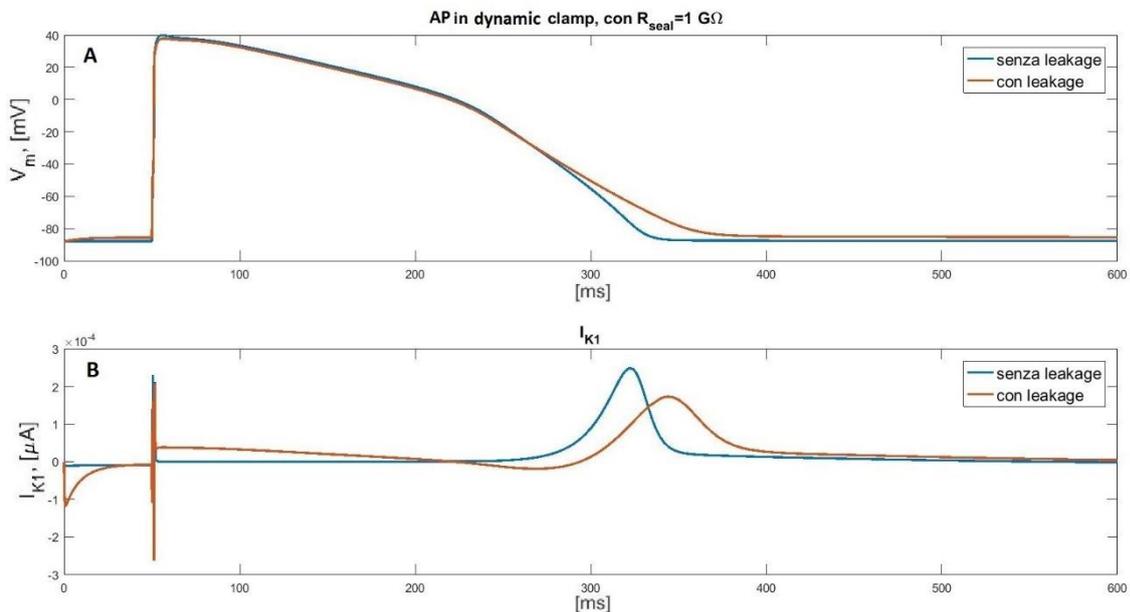


Figura 3.12, A) Potenziali d'azione durante l'esperimento in dynamic clamp (senza leakage o con leakage, traccia blu e traccia rossa rispettivamente). B) Andamento della corrente I_{K1} durante l'esperimento in dynamic clamp corrispondente al potenziale d'azione in Fig. 3.12A, acquisita in assenza di leakage o con una corrente di leakage sovrapposta.

L'effetto della corrente di leakage sovrapposta è decisamente meno rilevante se si considera l'andamento della corrente I_{K1} , che avendo un'ampiezza maggiore risente meno degli effetti di una corrente sovrapposta. È stato poi effettuato l'esperimento in

dynamic clamp, Figura 3.12A, dove si si nota come un fattore di scala diverso si ripercuota sul potenziale d'azione. In presenza di leakage, infatti, e con un fattore di scala minore, la corrente I_{K1} non riesce ad avere un'efficacia tale da ripolarizzare correttamente il potenziale d'azione, causandone un suo prolungamento. In particolar modo si nota come nel caso in cui sia presente una corrente di leakage, venga meno l'effetto della corrente I_{K1} , che essendo attenuata dal fattore di scala non riesce ad avere un'incidenza significativa sull'ultimo tratto del potenziale d'azione, che, in questo caso, torna al suo valore di potenziale a riposo con una pendenza molto minore rispetto al caso in cui non è presente la corrente di leakage.

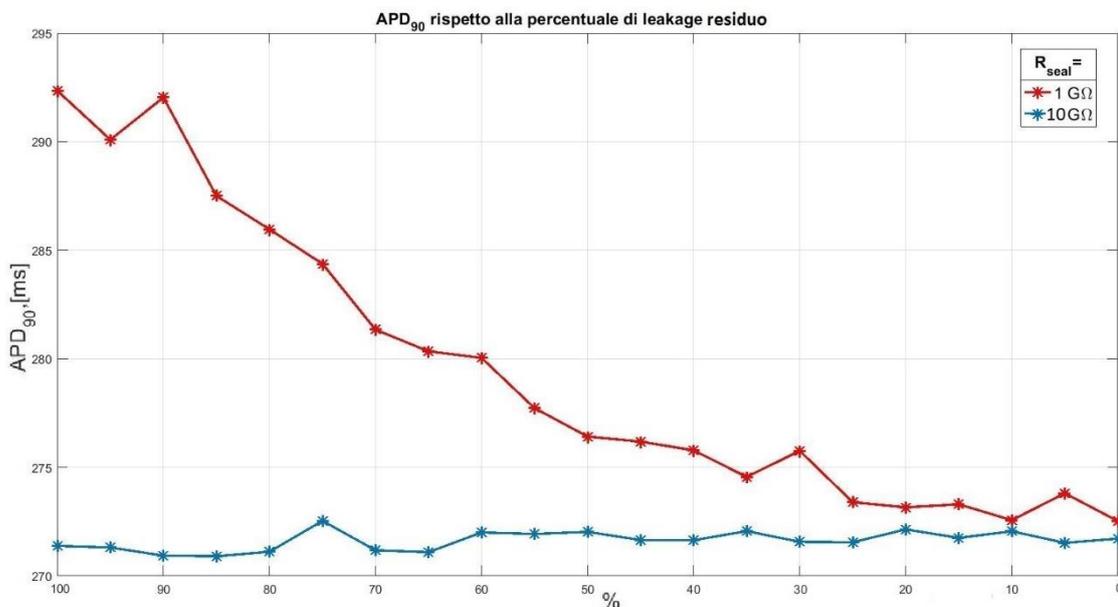


Figura 3.13, Andamento del valore di APD_{90} rispetto alla percentuale di corrente di leakage residuo.

La Figura 3.13, invece, mostra come varia la durata del potenziale d'azione rispetto ad una certa percentuale di corrente di leakage residuo. L'effetto di una corrente di leakage sovrapposta nell'allungare il potenziale d'azione è evidente nel caso in cui R_{seal} sia pari a $1\text{ G}\Omega$, mentre l'effetto è minimo nel caso in cui R_{seal} sia pari a $10\text{ G}\Omega$ e quindi la corrente di leakage sia già di per sé molto piccola rispetto alla corrente di interesse.

Dato che anche la compensazione del leakage avviene andando a stimare dei parametri, non solo è importante valutare cosa succede nel caso di una sotto

compensazione, in cui permane una parte di corrente di leakage sovrapposta, ma è utile osservare anche cosa succede nel caso di una corrente di leakage sovrastimata. Gli errori di sovrastima possono essere sia su g_{leak} che su E_{leak} . Un errore di stima su E_{leak} ha un effetto molto più evidente sulla corrente I_{K1} , essendo una corrente con un'ampiezza piccola, e quindi più sensibile alla presenza di correnti sovrapposte, per quanto piccole possano essere. Se si va a stimare un valore di E_{leak} maggiore di quello reale, si va a sottrarre alla corrente acquisita non solo tutta la corrente di leakage effettivamente presente, ma addirittura una porzione in più. Essendo la corrente I_{K1} quasi nulla durante il plateau, sottraendogli una corrente di leakage sovrastimata si ottiene una corrente I_{K1} che diventa entrante in questa fase. In questo modo si dà in input al modello in silico un'ulteriore corrente entrante che va a sostenere il plateau aumentando la durata del potenziale d'azione.

Un effetto ancora maggiore si ottiene andando a sovrastimare il parametro g_{leak} che rappresenta la pendenza con cui viene descritta la corrente di leakage. In Figura 3.14, sono stati messi a confronto due esperimenti in *dynamic clamp*, uno dove il leakage è perfettamente compensato, curva rossa, il secondo dove g_{leak} è stato ampiamente sovrastimato, curva blu. Si nota come lo stesso andamento della corrente I_{Kr} viene modificato andandogli a sottrarre una porzione di leakage sovrastimata. Durante i primi 50 ms del potenziale d'azione la corrente è addirittura entrante, e questo si riflette nell'andamento del potenziale d'azione corrispondente in Figura 3.14A. È utile considerare come i parametri relativi alla corrente di leakage vengano stimati prima del protocollo di stima del fattore di scala, per cui durante l'*AP clamp*, in cui si vanno ad acquisire le correnti per stimare il fattore di scala, viene già effettuata la compensazione della corrente di leakage. Il fattore di scala stimato risulta maggiore nel caso in cui la corrente di leakage sia stata ipercompensata, ma nonostante questo, la corrente I_{Kr} non riesce a ripolarizzare adeguatamente il potenziale d'azione dopo averlo depolarizzato eccessivamente durante i primi 50 ms. In Figura 3.15 sono indicati con una freccia i valori di g_{leak} stimati, rispetto a un valore reale pari a $1 \cdot 10^{-7}$ mS. È interessante notare come varia la durata del potenziale d'azione rispetto a g_{leak} .

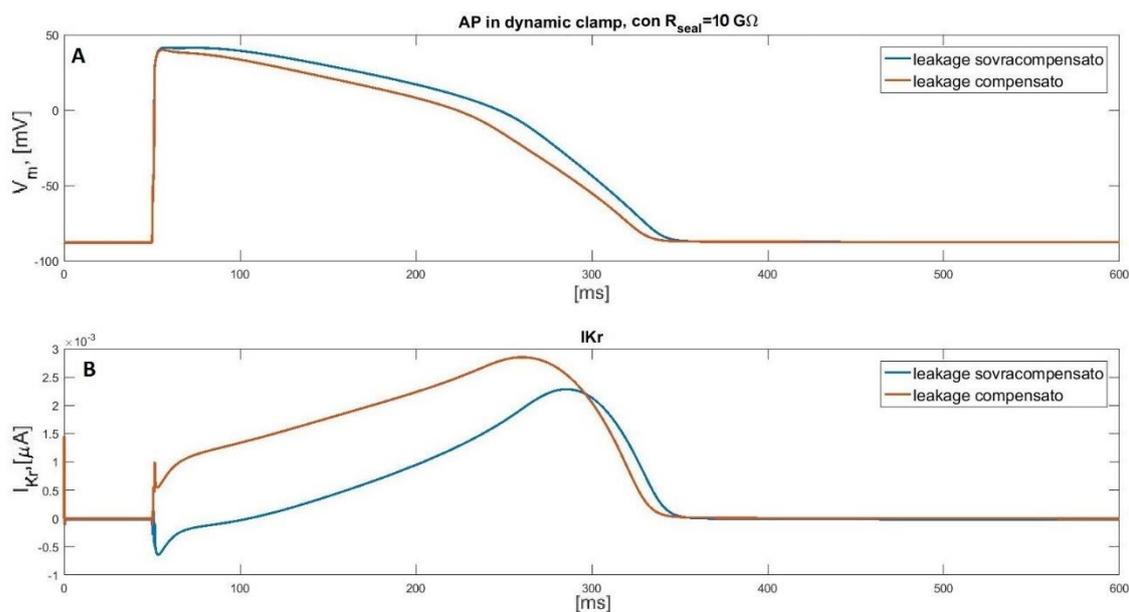


Figura 3.14, A) Potenziali d'azione durante l'esperimento in dynamic clamp (con una corrente di leakage ben compensata o una corrente di leakage sovracompensata). B) Andamento della corrente I_{K_r} durante l'esperimento in dynamic clamp corrispondente al potenziale d'azione in Fig. 3.14A, acquisita con una corrente di leakage ben compensata o con una corrente di leakage sovracompensata.

Nel caso infatti in cui g_{leak} sia eccessivamente sovrastimata, come nel caso in cui il suo valore sia stato stimato pari a $9,4 \cdot 10^{-6} \text{ mS}$, la durata del potenziale d'azione aumenta considerevolmente per le cause sopra descritte e illustrate in Figura 3.13. Nel caso però, in cui g_{leak} sia, sì sovrastimata, ma non eccessivamente (ad esempio $1,8 \cdot 10^{-6} \text{ mS}$), l'effetto che si ottiene sul potenziale d'azione è invece opposto. Infatti, si va a togliere dalla corrente acquisita una corrente di leakage stimata maggiore di quella effettiva, riducendo l'ampiezza della corrente acquisita, ma senza cambiarne il segno. Perciò, in fase di stima del fattore di scala, quest'ultimo sarà maggiore, e questo si riflette in una diminuzione della durata del potenziale d'azione. Confrontando questi due effetti, in Figura 3.15, si nota come l'accorciamento del potenziale d'azione sia un effetto molto più ridotto rispetto ad un suo allungamento, anche se si tratta comunque di un'alterazione del potenziale d'azione che non ha una causa fisiologica.

Il valore di g_{leak} dipende fortemente dal protocollo di stima della corrente di leakage che viene utilizzato, come mostrato in Figura 3.15, in cui sono stati utilizzati due diversi protocolli di stima dei parametri del leakage in un sistema eterologo dove sono stati sovra espressi i canali per I_{K_r} . La curva rossa rappresenta un protocollo in *voltage*

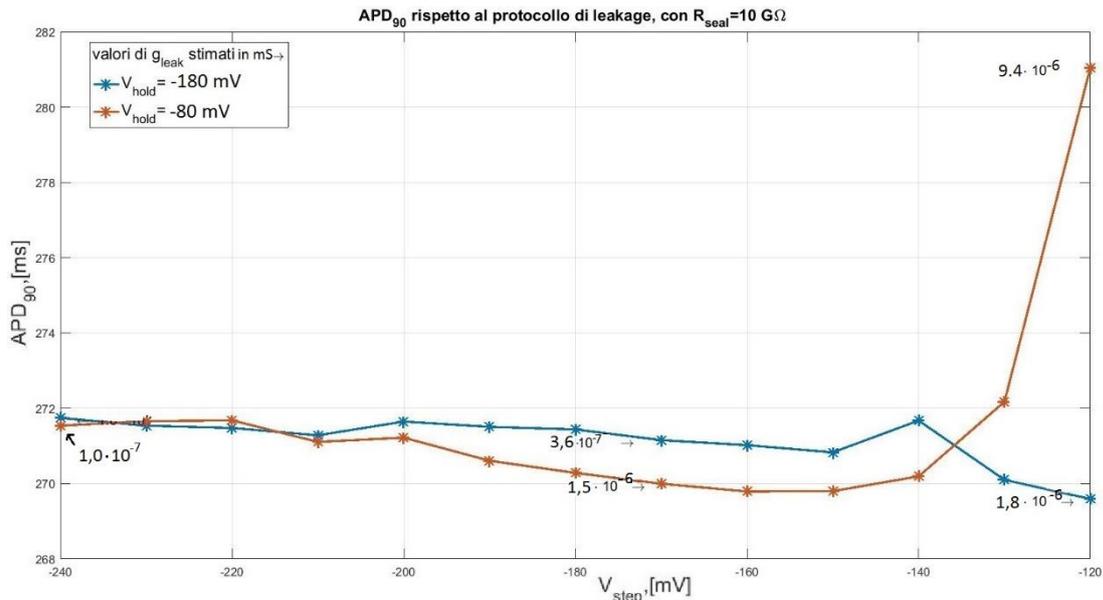


Figura 3.15, Andamento del valore di APD₉₀ rispetto a diversi protocolli di leakage dove sono stati variati i valori di V_{hold} e V_{step} (mostrati in ascissa), e alcune stime di g_{leak}

clamp in cui la cellula viene posta a una tensione vicina al valore del potenziale di membrana a riposo (V_{hold} = -80 mV), poi portata a un certo V_{step} corrispondente al valore in ascissa. Da questo valore parte poi una rampa in tensione, con una pendenza minore di 1, per 100 ms in cui si registra la corrente e su cui vengono stimati i parametri della corrente di leakage. Si può notare che all'aumentare del valore di V_{step} aumenta il valore di g_{leak} stimato. Questo perché aumentando V_{step} aumenta anche la percentuale di canali aperti, per cui, durante la rampa, la corrente che si registra non è solo la corrente di leakage, ma vi si sovrappone anche una componente non lineare che deriva dalla corrente attraverso i canali ionici. La curva blu, invece, rappresenta un protocollo in *voltage clamp* in cui la cellula viene portata a un valore di V_{hold} = -180 mV. Questo fa sì che quando parte il protocollo di stima, i canali siano chiusi perché erano stati portati a un valore di potenziale molto negativo, per cui anche riportando la cellula a valori più positivi, ad esempio -120 mV, il numero di canali aperti rimane limitato a causa della costante di tempo necessaria al gate di attivazione per portarsi al suo valore di equilibrio. In questo modo, quando si va a registrare la corrente, fornendo una rampa in tensione, si registra solo la corrente di leakage, o al massimo una parte molto ridotta della corrente attraverso i canali ionici.

- **Il filtraggio del rumore**

Il filtraggio, in particolare tramite un filtro di tipo passabasso, diventa importante quando il segnale acquisito viene quasi del tutto nascosto dal rumore sovrapposto, mentre grazie ad un filtro che riduce la larghezza di banda, il segnale diviene riconoscibile.

Da Figura 3.16A si nota come il rumore sovrapposto alla corrente acquisita incida sulla durata del potenziale d'azione. Diminuendo la potenza del rumore sovrapposto diminuisce significativamente la durata del potenziale d'azione, fino a stabilizzarsi a una durata simile a quella del modello di O'Hara-Rudy originale. In Figura 3.16, sono riportati gli andamenti della corrente I_{K1} con diversi livelli di rumore sovrapposti. Si nota che quando la potenza di rumore sovrapposta è troppo elevata rispetto all'ampiezza del segnale, l'andamento della corrente diventa irriconoscibile, Figura 3.16B. Questo ha un impatto notevole sulla stima del fattore di scala, che si basa sull'idea che la corrente acquisita sia simile a quella di riferimento a meno di un fattore moltiplicativo. Nel caso in cui la corrente acquisita sia eccessivamente rumorosa, il fattore di scala stimato è minore rispetto a quello ottenuto nel caso di corrente priva di rumore, e questo incide sull'allungamento del potenziale d'azione, in quanto una quantità minore di corrente ripolarizzante viene data in input al modello in silico.

È interessante però notare come il rumore presente sulla corrente I_{Kr} abbia in realtà un effetto minimo sulla durata del potenziale d'azione rispetto all'effetto causato dalla corrente I_{K1} con la stessa potenza di rumore sovrapposta. Ad esempio, tenendo conto che la lunghezza del potenziale d'azione nel modello originale di O'Hara-Rudy è di 270 ms, effettuando una simulazione con la corrente I_{Kr} di Figura 3.17A e la corrente I_{K1} priva di rumore, la lunghezza dell'APD₉₀ risultante è 276 ms. Al contrario, utilizzando la corrente I_{K1} di Figura 3.16B, con la stessa potenza di rumore sovrapposto, e la corrente I_{Kr} priva di rumore, la lunghezza dell'APD₉₀ risultante è 313 ms. Questo può essere spiegato tenendo conto che durante la fase di plateau, la corrente I_{K1} dovrebbe risultare pressoché nulla, mentre in presenza di rumore questo non è più vero, e, inoltre, all'aumentare della potenza di rumore, l'ampiezza della

corrente in questa fase aumenta considerevolmente fino ad arrivare ad essere paragonabile all'ampiezza della corrente I_{K1} a fine sistole, come in Figura 3.16B.

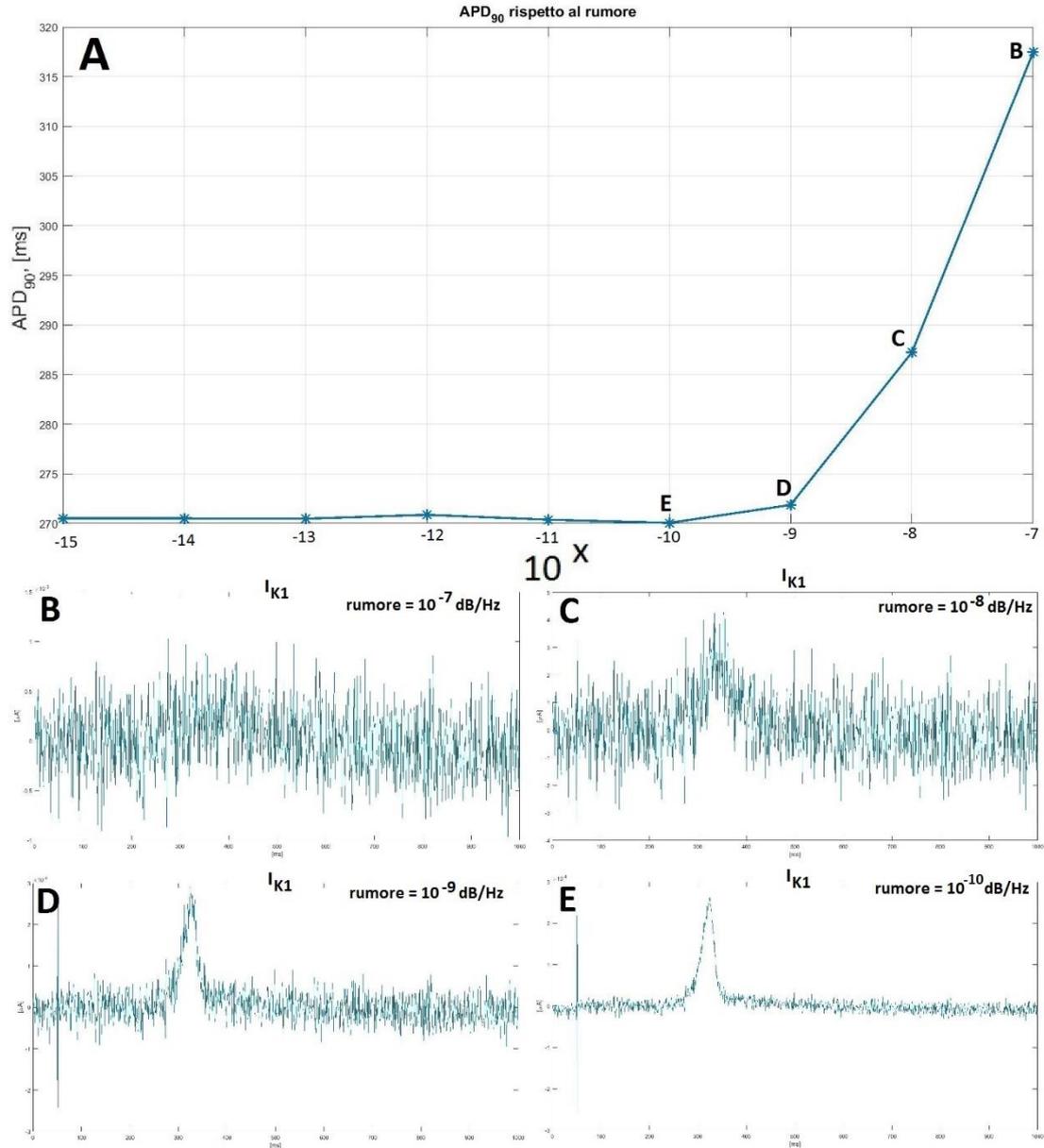


Figura 3.16, A) Andamento della durata del potenziale d'azione rispetto alla potenza del rumore sovrapposto, con riferimento alle correnti I_{K1} di Fig. 3.16 B-D corrispondenti. B) Corrente I_{K1} acquisita con una potenza di rumore sovrapposto pari a 10^{-7} dB/Hz. C) Corrente I_{K1} acquisita con una potenza di rumore sovrapposto pari a 10^{-8} dB/Hz. D) Corrente I_{K1} acquisita con una potenza di rumore sovrapposto pari a 10^{-9} dB/Hz. E) Corrente I_{K1} acquisita con una potenza di rumore sovrapposto pari a 10^{-10} dB/Hz.

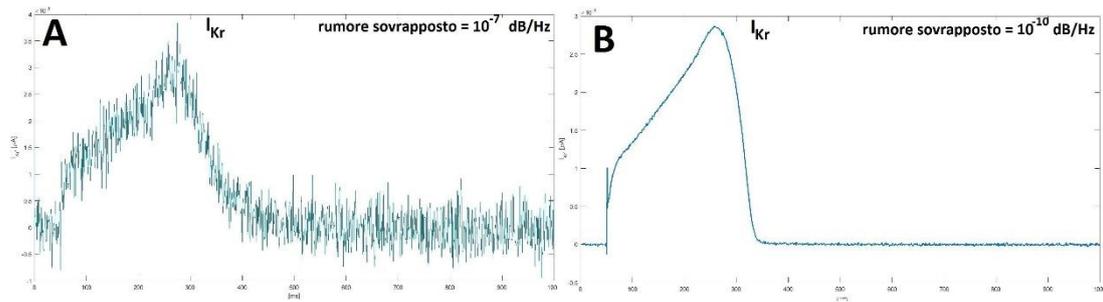


Figura 3.17, A) Corrente I_{Kr} acquisita con una potenza di rumore sovrapposto pari a 10^{-7} dB/Hz.

B) Corrente I_{Kr} acquisita con una potenza di rumore sovrapposto pari a 10^{-10} dB/Hz.

Proprio a causa del rumore sovrapposto, durante la fase di plateau si verificano dei picchi di corrente entrante, così come dei picchi di corrente uscente. Il rumore che si sovrappone al segnale durante l'acquisizione può essere considerato come rumore bianco a valore medio nullo. Questo porta a pensare che l'effetto depolarizzante di un picco di corrente entrante venga contrastato dalla ripolarizzazione da parte di un picco di corrente uscente, e, ai fini della genesi del potenziale d'azione, i due effetti si annullino a vicenda lasciando inalterato l'APD₉₀. In realtà, quello che si verifica è che un aumento della corrente entrante allunga il potenziale d'azione più di quanto un aumento della corrente uscente lo accorci, e, complessivamente, l'effetto è un aumento della durata del potenziale d'azione [30].

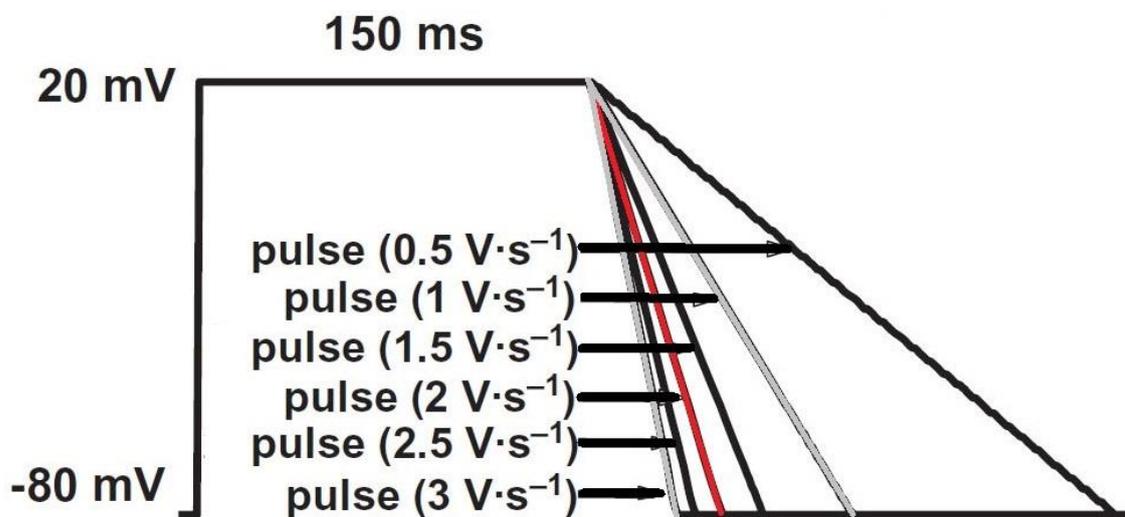


Figura 3.18, Potenziale d'azione triangolare. La retta rossa rappresenta la pendenza in fase di ripolarizzazione presa come riferimento. Le rette grigie rappresentano, rispettivamente, un aumento e una diminuzione della pendenza del 50%. Si nota come l'allungamento del potenziale d'azione è più pronunciato rispetto al suo accorciamento. Tratto da [31].

Il potenziale di membrana è legato alle correnti ioniche tramite un'espressione del tipo: $-I_m = C_m \cdot \frac{dV_m}{dt}$, come espressa in [30], [16]. Essendo il potenziale d'azione descritto come un cambiamento del potenziale di membrana nel tempo, il suo andamento dipende dalla velocità con cui cambia il potenziale di membrana, ovvero la sua derivata nel tempo, e dipende perciò dalla corrente I_m . Inoltre, la durata del potenziale d'azione può essere calcolata come: $APD = -\frac{\Delta V_m}{\frac{dV_m}{dt}}$, perciò, mentre la relazione tra I_m e $\frac{dV_m}{dt}$ è lineare, la relazione tra la durata del potenziale d'azione e $\frac{dV_m}{dt}$ non lo è. Le conseguenze di questa non linearità possono essere viste più facilmente considerando un potenziale d'azione triangolare, ovvero dove la fase di ripolarizzazione viene descritta con una retta a pendenza negativa. Quello che si nota è che una diminuzione percentuale di $\frac{dV_m}{dt}$ provoca un allungamento in valore assoluto dell'APD₉₀ maggiore rispetto a quanto un aumento, identico in percentuale, della pendenza del potenziale d'azione ne provochi un suo accorciamento, come si nota in Figura 3.18. Inoltre, minore è la pendenza del potenziale d'azione durante il *cycle length* maggiore sarà questo effetto: questo fa sì che la sensibilità del potenziale d'azione alle perturbazioni in ingresso sia maggiore a basse frequenze [30].

In un esperimento in *dynamic clamp*, dove è presente del rumore sovrapposto, il valore della corrente in input al modello in silico cambia la velocità di ripolarizzazione del potenziale di membrana e, essendo maggiore l'effetto di una diminuzione della velocità, il risultato finale sarà un allungamento del potenziale d'azione.

In Figura 3.19 si vede l'effetto del rumore sovrapposto nel calcolo dell'APD₉₀. Non solo quando è presente un rumore con una potenza elevata la durata del potenziale d'azione aumenta, ma aumenta anche la variabilità inter-battito. In Figura 3.19A si nota una variazione di circa 130 ms, rispetto a Figura 3.18B dove la potenza di rumore è minore e la variazione è di circa 30 ms, mentre in Figura 3.18C la variazione è di circa 2 ms.

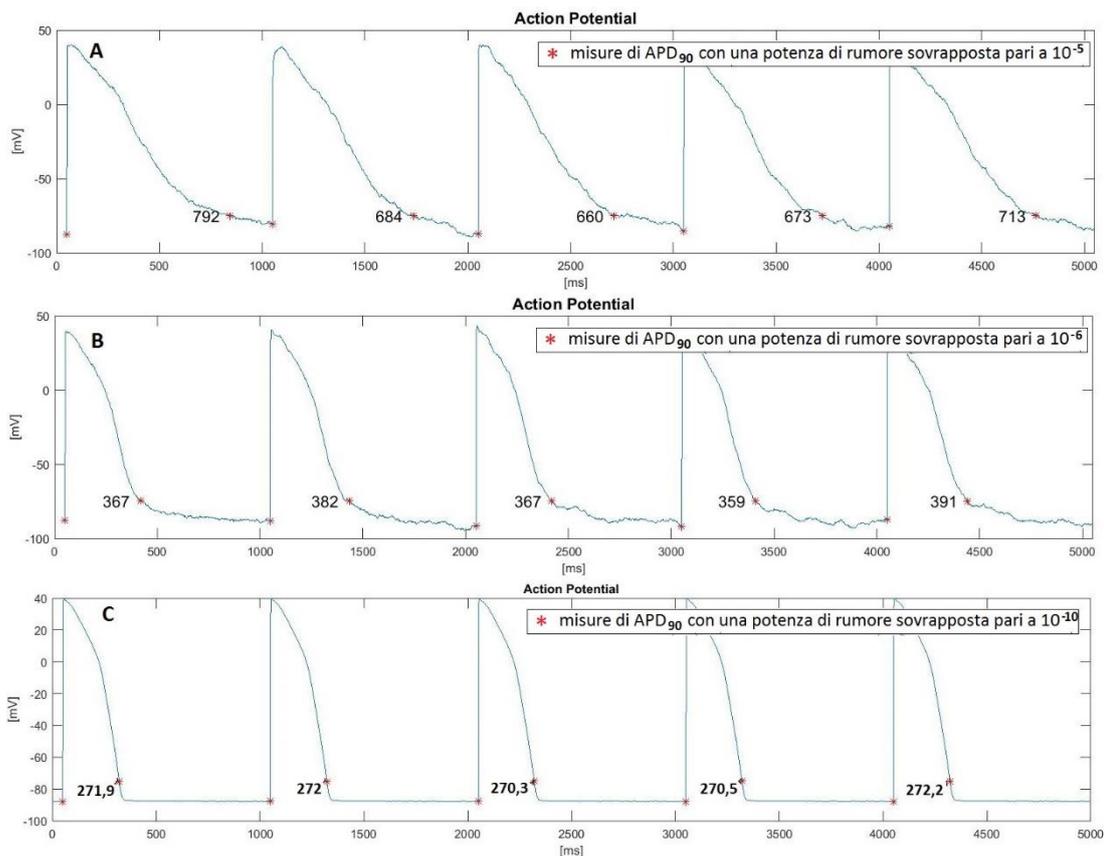


Figura 3.19, Misura dell'APD₉₀, espressa in millisecondi, con diverse potenze di rumore sovrapposte con un CL=1s. A) Potenziale d'azione con una potenza di rumore sovrapposta alle correnti acquisite pari a 10⁻⁵ dB/Hz. B) Potenziale d'azione con una potenza di rumore sovrapposta alle correnti acquisite pari a 10⁻⁶ dB/Hz. C) Potenziale d'azione con una potenza di rumore sovrapposta alle correnti acquisite pari a 10⁻¹⁰ dB/Hz.

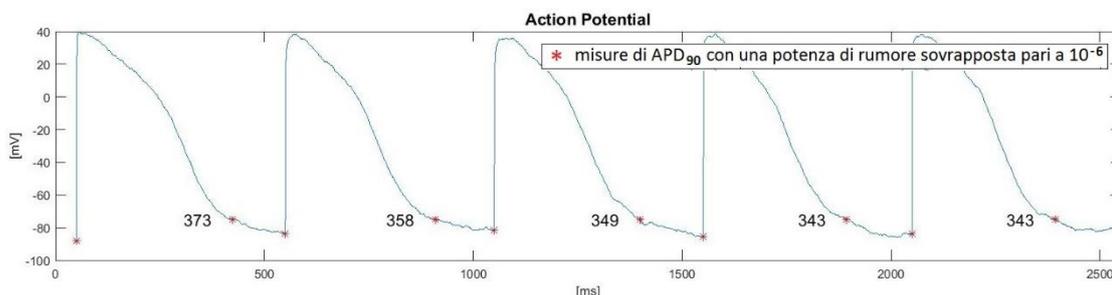


Figura 3.20, Misura dell'APD₉₀, espressa in millisecondi, con potenza di rumore sovrapposta pari a 10⁻⁶ dB/Hz e CL=500ms

In Figura 3.20, invece, la simulazione in *dynamic clamp* è stata eseguita ponendo il *cycle length* pari a 500 ms, quindi con una frequenza maggiore rispetto al valore di 1 Hz finora considerato. Confrontando i valori di APD₉₀ con quelli di Figura 3.19B, ottenuti con la stessa potenza di rumore sovrapposta, si nota come la durata del

potenziale sia minore a frequenza più alta, indice che il potenziale d'azione è più sensibile alle variazioni quando è a basse frequenze [30].

Essendo state prese in considerazione in questa analisi due correnti ripolarizzanti è interessante notare come per entrambe esista un feedback positivo con la velocità di ripolarizzazione del potenziale d'azione [31]. Ad esempio, I_{Kr} ha una costante di tempo di inattivazione molto più piccola rispetto a quella di attivazione, perciò, quando il potenziale di membrana si porta a valori molto positivi, il gate di inattivazione si porta rapidamente a 0. Quando poi il potenziale di membrana si ripolarizza, si ottiene un maggior recupero dall'inattivazione tanto più la pendenza è ripida, al contrario, il recupero dall'inattivazione sarà minore se il potenziale d'azione rimane a valori positivi per più tempo. Questo fa sì che, se la durata del potenziale d'azione aumenta, ovvero la pendenza in fase di ripolarizzazione diminuisce, per cause che in questa situazione non sono fisiopatologiche ma derivano dal rumore presente, allora l'ampiezza della corrente I_{Kr} diminuisce portando a una diminuzione della forza ripolarizzante che a sua volta causa un aumento della durata del potenziale d'azione [31].

Una seconda analisi è stata invece effettuata considerando solo l'acquisizione della corrente entrante I_{CaL} proveniente dal sistema eterologo a cui viene aggiunta la dipendenza dal calcio del gate di inattivazione come descritto nel capitolo precedente. Le osservazioni fatte nell'analisi sulle correnti di potassio rimangono valide anche per la corrente I_{CaL} .

- **La compensazione della capacità di membrana**

Come descritto precedentemente, anche per la corrente I_{CaL} la compensazione della capacità di membrana influisce sulla durata del potenziale d'azione. Data la rapida attivazione dei canali del calcio all'insorgere del potenziale d'azione, la corrente I_{CaL} si porta quasi istantaneamente a un picco negativo, contribuendo alla depolarizzazione con l'entrata di ioni calcio. A causa della presenza della capacità di membrana, però, la corrente acquisita presenta degli *spike* capacitivi che si vanno a sovrapporre proprio

all'andamento iniziale della corrente nascondendolo. Questo fa sì che la forma del potenziale d'azione nei primi millisecondi dipenda anche dalla percentuale di capacità di membrana che è stata compensata, come si vede in Figura 3.21.

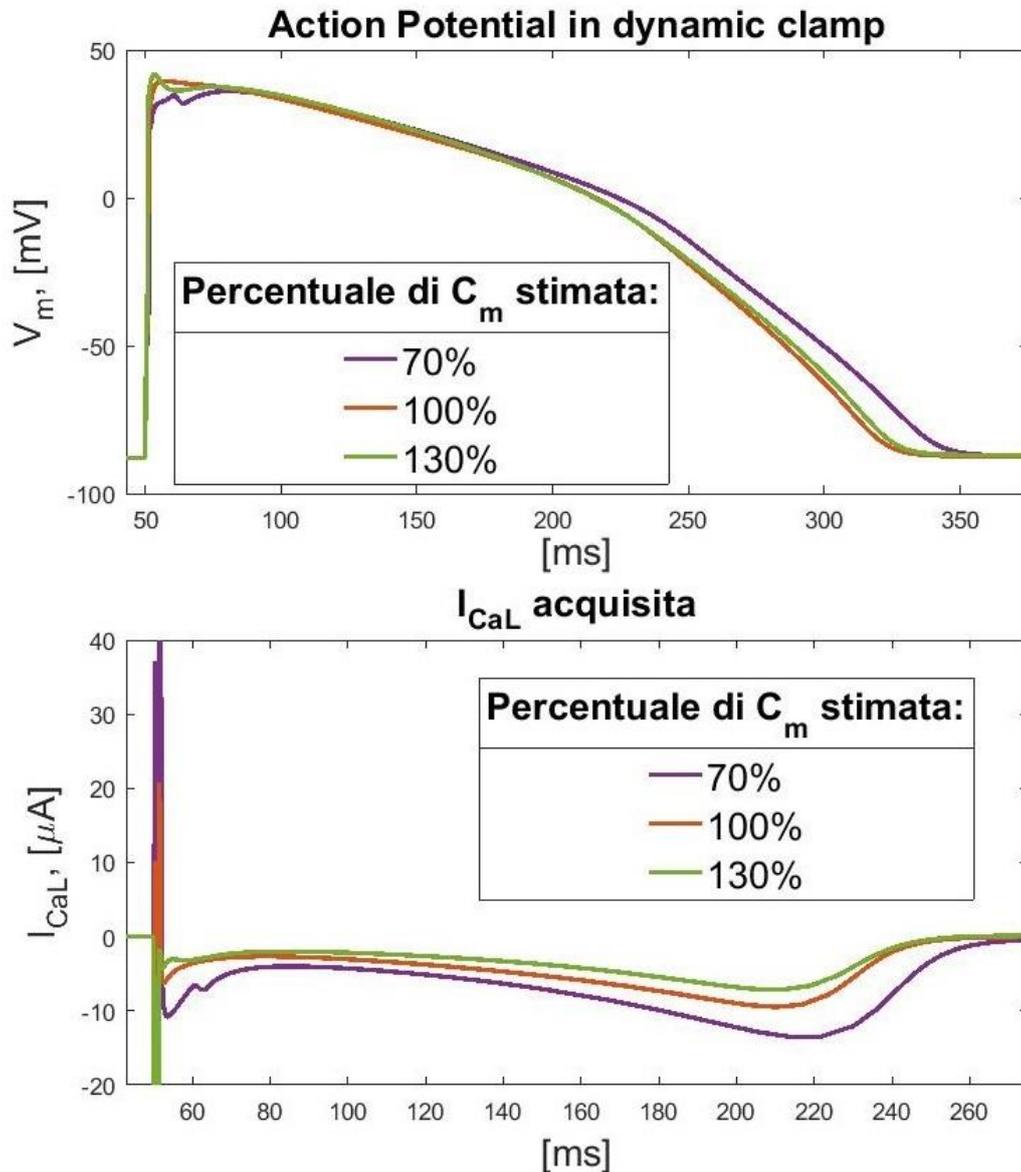


Figura 3.21, A) Potenziale d'azione in dynamic clamp con diversi valori di capacità di membrana compensata. B) Andamento della corrente I_{CaL} acquisita dal sistema eterologo con diversi valori di capacità di membrana compensata con riferimento al potenziale d'azione di Fig. 3.21A

Una sottostima del valore di C_m fa sì che permangano dei picchi capacitivi uscenti per cui il potenziale d'azione non riesce a raggiungere la stessa ampiezza prevista dal modello in silico di O'Hara-Rudy in quanto una parte della corrente di calcio in questo transitorio diventa uscente. Viceversa, se il valore di C_m viene sovrastimato, i picchi capacitivi uscenti vengono compensati totalmente, e in più si originano dei picchi

entranti proprio a causa della sovra compensazione. Una maggior quantità di ioni calcio uscente aumenta la depolarizzazione del potenziale d'azione che raggiunge un'ampiezza maggiore.

- **La compensazione del leakage in presenza di rumore sovrapposto**

Gli effetti della corrente di leakage e del rumore sovrapposto alle correnti acquisite è stato discusso nei paragrafi precedenti. È interessante però notare come non solo il tipo di protocollo utilizzato influenzi il valore dei parametri stimati, ma anche la presenza di un rumore sovrapposto. In Figura 3.22 sono presenti gli andamenti delle correnti I_{CaL} acquisite in *AP clamp* a cui è stata sottratta la corrente di leakage stimata.

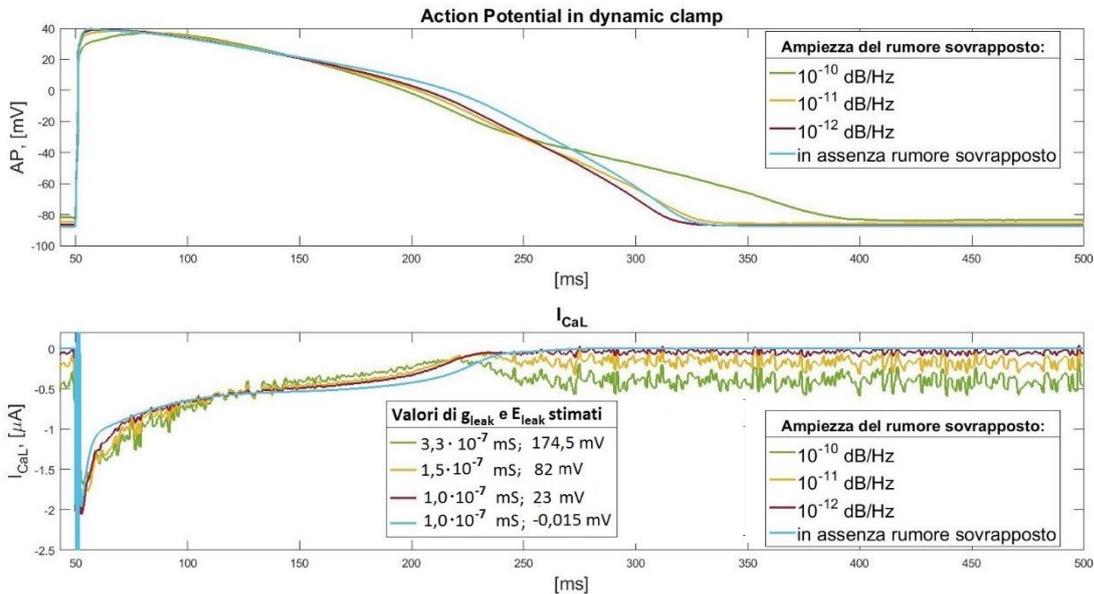


Figura 3.22, A) Potenziale d'azione in dynamic clamp con diversi valori di rumore sovrapposto. B) Andamento della corrente I_{CaL} con diversi valori di capacità e di rumore sovrapposto.

A parità di protocollo utilizzato i parametri con cui viene descritta la corrente di leakage stimata variano proprio a causa dell'ampiezza del rumore sovrapposto, seppure l'ampiezza del rumore utilizzato in questo confronto non sia eccessiva. In particolare, non solo viene sovrastimata la pendenza, ma anche E_{leak} . Questo fa sì che quando si va a sottrarre alla corrente acquisita la corrente di leakage stimata, si vada a sottrarre anche un offset che può essere anche molto maggiore rispetto al caso reale, come per la curva verde in Figura 3.22. Il risultato si vede in modo particolare

nell'ultima fase del potenziale d'azione in cui la corrente I_{CaL} rimane, in condizioni ideali, quasi nulla, mentre se E_{leak} viene sovrastimato la corrente diventa entrante provocando un allungamento del potenziale d'azione.

3.1.2 Fattori derivanti dal modello in silico

Uno degli obiettivi di questa analisi è esaminare le cause che portano il potenziale d'azione ottenuto in *dynamic clamp* a essere diverso da quello originario di O'Hara-Rudy, sebbene la formulazione delle correnti sia la stessa. In Tabella 3.1 sono presenti le misure dell'APD₉₀ ottenute durante simulazioni diverse.

Il primo valore rappresenta la durata del potenziale d'azione nel modello originario di O'Hara-Rudy, mentre il secondo rappresenta la durata del potenziale d'azione ottenuta in una simulazione in *dynamic clamp* dove il sistema è perfettamente compensato, e la concentrazione di K^+ intracellulare è stata posta ad un valore costante, e non variabile come previsto dal modello di O'Hara-Rudy, pari a quello presente nel sistema eterologo. Questo vuol dire che il potenziale di Nerst calcolato dal modello in silico coincide con quello percepito dal sistema eterologo. La stessa accortezza si può avere nel porre la concentrazione di K^+ extracellulare uguale a quella presente nel bagno extracellulare. In Tabella 3.1 sono riportati i valori della durata del potenziale d'azione ottenuti andando a variare le concentrazioni di $[K^+]_i$. (Nella simulazione in *dynamic clamp* sono stati presi $[K^+]_i=143,79$ mM, mentre per $[K^+]_o$ è stato sempre mantenuto costante e pari a 5,4 mM).

| <i>Tabella 3.1</i> | APD ₉₀ , [ms] |
|--|--------------------------|
| ORd | 270,6 |
| Simulazione in dynamic clamp | 271,5 |
| $[K^+]_i$ variabile | 271,8 |
| $[K^+]_i = 153,79$ mm | 275,6 |
| $[K^+]_i = 133,79$ mm | 268,6 |
| I_{kr} con modello di Beattie et al. 2018 [20] | 285,3 |

Un altro fattore rilevante sull' APD_{90} è la somiglianza tra le correnti del modello di O'Hara-Rudy e quelle prelevate dal sistema eterologo. È stata effettuata una simulazione in *dynamic clamp* con un sistema perfettamente compensato ma la corrente I_{Kr} del sistema eterologo è stata descritta con la formulazione tratta da Beattie et al. 2018 [20]. Si nota come l'allungamento del potenziale d'azione rispetto alla simulazione con I_{Kr} descritta come nel modello ORd sia significativo. Quindi, ha un impatto sul potenziale d'azione non solo la presenza del sistema di acquisizione per prelevare le correnti dal sistema eterologo, ma anche la formulazione usata per descrivere le correnti nel modello in silico considerato. Soprattutto considerando che la corrente in input al modello deve essere moltiplicata per un fattore di scala che viene calcolato tramite la minimizzazione dell'errore quadratico medio, confrontando la corrente acquisita con quella di riferimento del modello di O'Hara-Rudy. Se le due correnti sono simili, il fattore di scala risulterà semplicemente come un fattore moltiplicativo necessario a scalare la corrente, ma, se i due andamenti sono diversi, il fattore di scala tenderà a minimizzare le differenze. Ad esempio, in Figura 3.23, è riportato l'andamento della corrente I_{Kr} secondo due formulazioni differenti, dove la curva rossa è stata presa come riferimento, mentre la curva blu rappresenta la corrente acquisita moltiplicata per il fattore di scala calcolato. Si noti come la corrente acquisita abbia un picco di ampiezza maggiore a fine diastole, ma resti più piccola durante la fase di plateau rispetto alla corrente di riferimento. Il fattore di scala calcolato tende a minimizzare queste differenze, ma il risultato finale è comunque una corrente che ha un'ampiezza minore durante il plateau. Dato che nel modello in silico, la corrente I_{Kr} prevista ha un effetto ripolarizzante per tutta la durata del plateau, mentre la corrente proveniente dal sistema eterologo ha una minor ampiezza in questa fase, il risultato finale sarà un allungamento del potenziale d'azione come si nota in Figura 3.24.

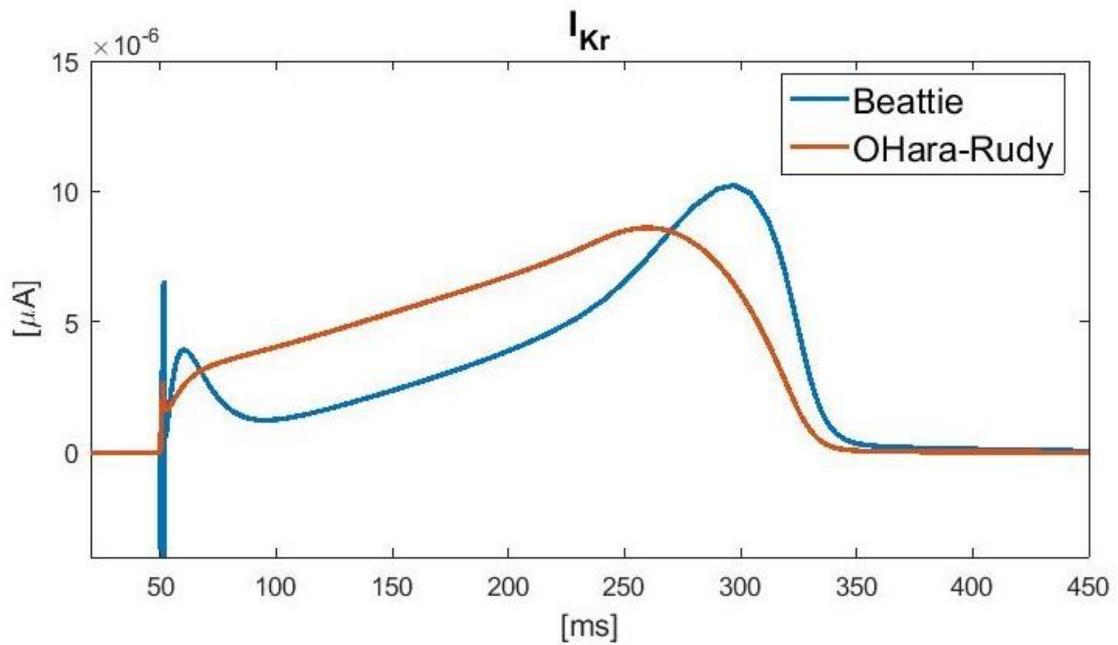


Figura 3.23, Confronto tra la corrente I_{Kr} descritta con la formulazione di Beattie et al. 2018 [20], curva blu, e O'Hara et al. 2011 [16], curva rossa, acquisite in AP clamp.

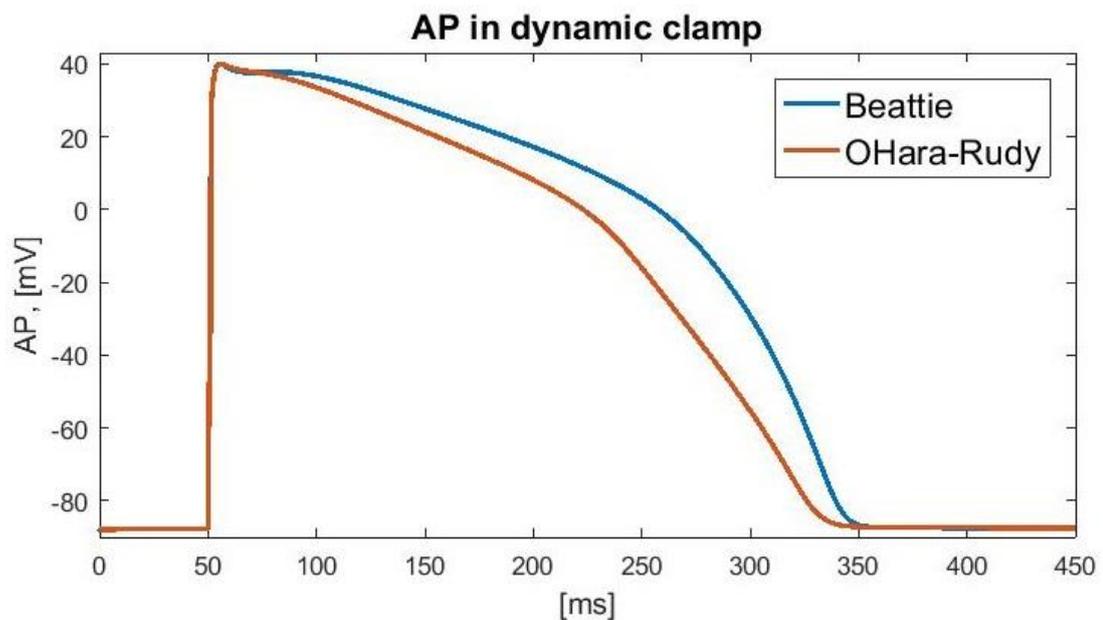


Figura 3.24, Confronto tra i potenziali d'azione prodotti in un esperimento in dynamic clamp con la corrente I_{Kr} descritta con la formulazione di Beattie et al. 2018 [20], curva blu, e con la formulazione di O'Hara et al. 2011 [16], curva rossa.

3.2 VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEI FARMACI

Dopo aver effettuato un'analisi dell'effetto delle compensazioni sul potenziale d'azione prodotto dal sistema in *dynamic clamp* descritto in questo elaborato, è stata fatta un'analisi sul potenziale d'azione prodotto dal sistema simulando la somministrazione di alcuni farmaci nei vari sistemi eterologhi.

Sono stati analizzati gli effetti di quattro farmaci simulati tramite i loro valori di IC_{50} presenti in letteratura [29], e scelti in base alla loro differente capacità di bloccaggio di diversi canali ionici, relativa alla concentrazione terapeutica consigliata, come descritto in Tabella 3.2.

Tabella 3.2

| Farmaco: | Percentuale di canali I_{Kr} bloccati | Percentuale di canali I_{K1} bloccati | Percentuale di canali I_{CaL} bloccati |
|----------------|---|---|--|
| Ceftriaxone | 4.94% | - | 13.09% |
| Chlorpromazine | 4.54% | 2.08% | 1.34% |
| Thioridazine | 65.91% | - | 15.20% |
| Verapamil | 6.75% | 0.96% | 47.76% |

Per ognuna delle analisi successive si sono considerati tre diversi esperimenti in *dynamic clamp*: il primo in un sistema perfettamente compensato, il secondo in un sistema dove si sono valutati anche gli effetti di alcune compensazioni poste a un valore noto e deciso a priori ($V_{off} = 2$ mV, C_m e R_s compensate al 90% del loro valore reale) e il terzo in cui sono stati presi in considerazione 11 esperimenti diversi per tenere conto della variabilità intercellulare e della variabilità del set up del sistema di acquisizione, per cui i parametri del sistema sono stati generati casualmente secondo una distribuzione normale. I parametri, che, in ogni esperimento e per ognuno dei sistemi eterologhi considerati, sono stati fatti variare nell'intorno del loro valore di riferimento, sono: la conduttanza massima del canale ionico, il valore di tensione di offset residuo, il valore della resistenza serie, il valore della capacità di membrana e la

sua percentuale compensata, il valore della resistenza del sigillo e il potenziale di leakage. Ognuno di questi valori è stato memorizzato in una matrice in modo da riuscire ad effettuare più esperimenti diversi sulle stesse undici cellule poste nei medesimi pozzetti, Tabella 3.3. Dopo aver generato i parametri casuali, è stato fatto un controllo affinché rientrassero comunque in un range accettabile, ad esempio, R_{seal} deve essere maggiore di 1 G Ω per ottenere un *patch clamp* soddisfacente.

Tabella 3.3

Per ognuno degli undici esperimenti è stato indicato il valore dei parametri utilizzato.

(I valori presi come riferimento sono: $R_s=5 \text{ M}\Omega$, $C_m=10 \text{ pF}$, $E_{\text{leak}} = 0 \text{ V}$)

| # Combinazione: | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | |
|------------------|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|
| I_{Kr} | G_{max} [nS] | 150 | 104 | 185 | 173 | 202 | 121 | 137 | 162 | 154 | 233 | 162 |
| | V_{offset} [mV] | 0,7 | 1,15 | 1,86 | 2,37 | 0,38 | 1,58 | 0,09 | 0,67 | 0,2 | 0,81 | 1,6 |
| | R_s [M Ω] | 6,5 | 3,3 | 5,2 | 4,8 | 6,2 | 3,9 | 7,5 | 5,3 | 6,5 | 5,7 | 1,9 |
| | C_m [pF] | 10,1 | 10,2 | 8,2 | 9,8 | 10,6 | 10 | 9,1 | 9,9 | 9,4 | 9,9 | 10,8 |
| | C_m stimata [pF] | 9,7 | 10,1 | 9,4 | 11,5 | 10,7 | 10 | 11,4 | 8,9 | 9,9 | 8,8 | 8,6 |
| | R_{seal} [G Ω] | 9 | 11,6 | 8,8 | 9,8 | 10 | 3,5 | 3,7 | 11,6 | 5,1 | 8,9 | 8,5 |
| | E_{leak} [nV] | -3 | -0,07 | -0,04 | -0,16 | -0,14 | -0,06 | -0,01 | 0,08 | -0,04 | -0,001 | 0,05 |
| | G_{max} [nS] | 61 | 68 | 62 | 49 | 57 | 70 | 62 | 61 | 42 | 38 | 70 |
| I_{K1} | V_{offset} [mV] | 0,87 | 1,51 | 0,85 | 0,5 | 0,77 | 0,55 | 0,09 | 0,04 | 0,61 | 1,2 | 0,54 |
| | R_s [M Ω] | 5,3 | 4,9 | 2,7 | 5,7 | 5,6 | 4,4 | 4 | 3,2 | 6,2 | 7,3 | 3,6 |
| | C_m [pF] | 11,2 | 8,2 | 9,6 | 9,6 | 9,2 | 9,3 | 10 | 11,4 | 10,7 | 8,3 | 10,6 |
| | C_m stimata [pF] | 10,4 | 9,1 | 10 | 9,6 | 9,9 | 7,8 | 9,9 | 11,3 | 10 | 10,9 | 11,5 |
| | R_{seal} [G Ω] | 6,2 | 10,8 | 8,1 | 8,1 | 1,9 | 10,7 | 3,4 | 8,1 | 13 | 10,7 | 6,9 |
| | E_{leak} [nV] | 0,01 | -0,04 | 0,003 | -0,01 | 0,1 | -0,09 | 0,1 | 0,04 | 0,1 | -0,08 | 0,07 |
| | Permeabilità [$\mu\text{F}\cdot\text{cm/s}$] | 0,0029 | 0,0035 | 0,0045 | 0,0035 | 0,004 | 0,0041 | 0,0032 | 0,0024 | 0,004 | 0,0035 | 0,0034 |
| | V_{offset} [mV] | 0,72 | 1,29 | 2,29 | 0,15 | 0,29 | 1,25 | 2,02 | 0,04 | 0,59 | 1,31 | 0,7 |
| I_{CaL} | R_s [M Ω] | 4,5 | 1,5 | 4,8 | 5,3 | 4,5 | 5,1 | 4,6 | 4,9 | 7,5 | 4,8 | 6,2 |
| | C_m [pF] | 11,2 | 10 | 9,9 | 9,3 | 9,4 | 9,8 | 8,4 | 8,9 | 8,5 | 10,5 | 8,8 |
| | C_m stimata [pF] | 10,1 | 10,3 | 11,6 | 11,3 | 8,8 | 11,2 | 8,2 | 10,4 | 9,8 | 10 | 9,6 |
| | R_{seal} [G Ω] | 4,8 | 16 | 8,6 | 6,6 | 1,5 | 9,9 | 9,9 | 6 | 4 | 7,6 | 6,3 |
| | E_{leak} [nV] | 0,15 | -0,04 | -0,04 | -0,13 | -0,12 | -0,007 | 0,06 | 0,06 | 0,12 | 0,16 | 0,07 |

Per i primi due esperimenti in *dynamic clamp* non essendoci variabilità inter-battito, se non una variabilità trascurabile dovuta al passo di integrazione, è stata calcolata semplicemente la differenza tra l'APD₉₀ ottenuto senza farmaco e l'APD₉₀ dopo la somministrazione del farmaco. Nel terzo esperimento, dove invece è presente una variabilità tra i battiti, in particolare a causa del rumore, ogni simulazione è stata fatta durare 10 secondi, ottenendo così, con frequenza 1 Hz, 10 battiti per simulazione. Per prima cosa, per ognuno degli undici esperimenti considerati, è stato determinato l'APD₉₀ medio in una simulazione senza farmaco. Poi, per ognuno dei dieci battiti è stato fatto il calcolo della differenza tra la durata del battito considerato e dell'APD₉₀

medio corrispondente, in modo da avere un'indicazione di quanto gli APD_{90} differiscono da quello di riferimento, ottenuto in presenza delle stesse variabilità. Avendo così predisposto una matrice di misure di ΔAPD_{90} che però non dipendono più dalla variabilità dell'esperimento in cui sono stati ottenuti, dato che sono tutti rapportati a un valore di riferimento, è stato calcolato il valore medio di ΔAPD_{90} e la deviazione standard di questi valori.

In particolare, sono state effettuate tre tipologie di analisi per valutare sia la capacità di un sistema in *dynamic clamp* così descritto di prevedere l'effetto di un farmaco, sia per valutare le conseguenze di un eventuale andamento della corrente nel sistema eterologo diverso da quello considerato nel modello in silico di O'Hara-Rudy, come nel caso della corrente I_{Kr} .

La prima analisi è stata effettuata sul modello di O'Hara-Rudy originale e considerando la corrente I_{Kr} nella formulazione di O'Hara-Rudy anche nel sistema eterologo. In questo modo si è potuto confrontare gli effetti del farmaco valutati nel sistema di *dynamic clamp* con quelli ottenuti andando a bloccare le correnti direttamente nel modello in silico di O'Hara-Rudy. In Figura 3.25A si possono vedere gli andamenti dei potenziali d'azione ottenuti andando a simulare nel modello in silico gli effetti dei farmaci, e la corrispondente differenza tra l' APD_{90} del modello originale e l' APD_{90} dopo la somministrazione del farmaco. Guardando le percentuali di canali bloccati per ogni corrente in Tabella 3.2 e confrontandole con i risultati in Figura 3.25A, si vede come per il chlorpromazine si ha un allungamento di circa 10 ms sulla durata del potenziale d'azione causata dalla percentuale di correnti ripolarizzanti bloccate, mentre con il ceftriaxone, che presenta un bloccaggio simile sulla corrente I_{Kr} ma blocca una percentuale maggiore di corrente I_{CaL} , si ottiene una variazione trascurabile. Effetti più evidenti si hanno sugli altri due farmaci, il thioridazine blocca il 65% dei canali della corrente I_{Kr} per cui si ha un allungamento evidente del potenziale d'azione, mentre per il verapamil, che blocca quasi la metà della corrente I_{CaL} , si nota un accorciamento.

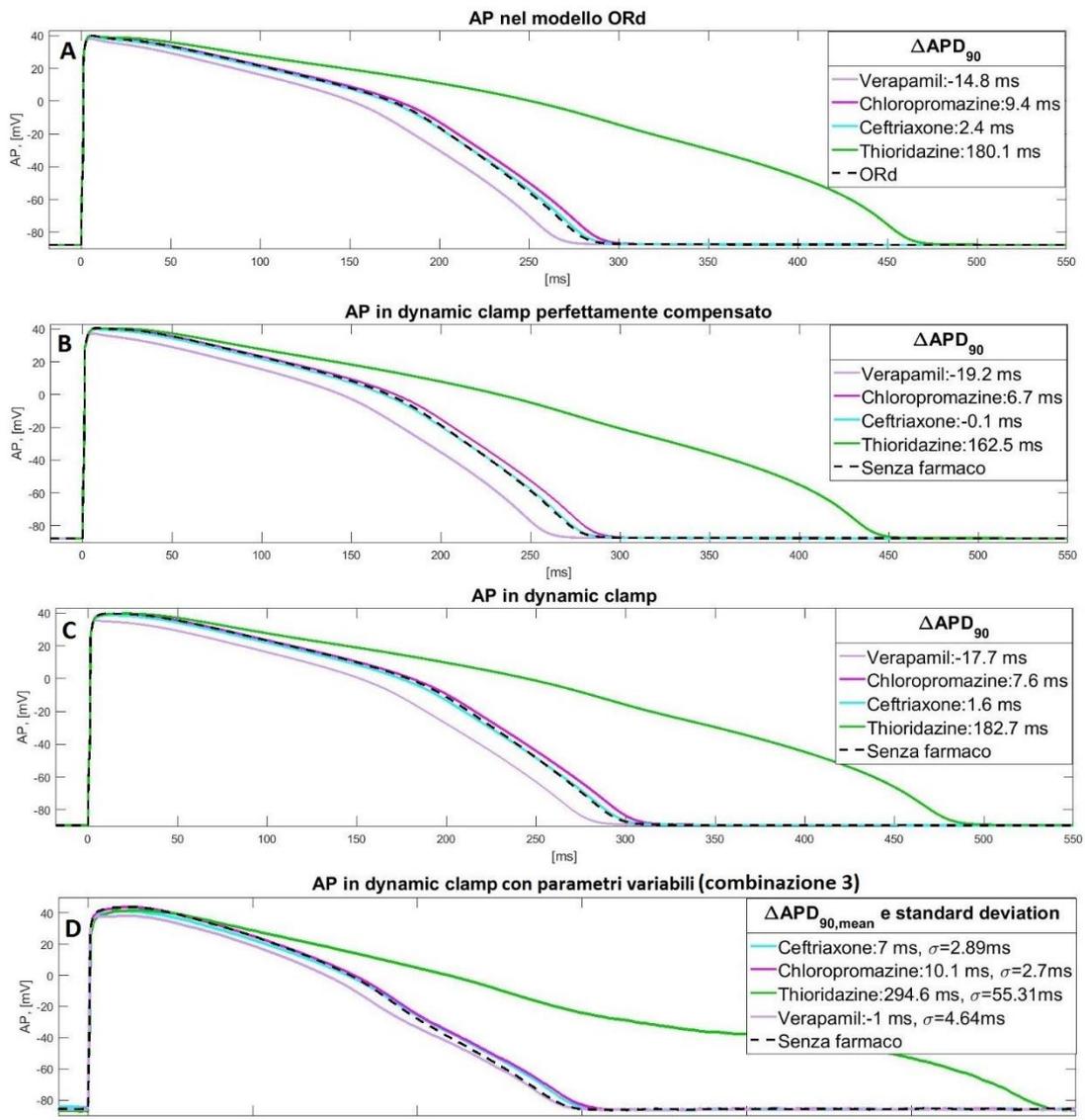


Figura 3.25, Potenziale d'azione ottenuto considerando I_{Kr} nella formulazione di O'Hara-Rudy, sotto l'effetto di alcuni farmaci. A) Potenziale d'azione nel modello di O'Hara-Rudy. B) Potenziale d'azione ottenuto da un sistema in dynamic clamp perfettamente compensato. C) Potenziale d'azione ottenuto da un sistema in dynamic clamp dove sono state previste alcune sotto compensazioni. D) Esempio di potenziale d'azione, ottenuto da un sistema in dynamic clamp dove è stata simulata una variabilità intercellulare e del set up del sistema di acquisizione.

I primi due esperimenti in *dynamic clamp* mostrano come questo andamento si mantenga anche in un sistema di *dynamic clamp*, sia nel caso in cui il sistema sia perfettamente compensato, sia nel caso in cui ci siano delle sotto compensazioni (Figura 3.25B-C). Passando poi all'esperimento in cui si è simulato il *dynamic clamp*

su undici cellule con parametri variabili, si nota un allungamento complessivo di tutti i potenziali d'azione generati, Figura 3.25D. Un allungamento della durata del potenziale d'azione in un sistema di *dynamic clamp* è prevedibile tenendo conto innanzitutto del ritardo introdotto dal sistema di acquisizione, ma anche degli effetti delle eventuali sotto compensazioni analizzate precedentemente. L'allungamento più evidente si nota per il verapamil, che arriva a un valore di APD_{90} paragonabile a quello di riferimento senza farmaco. Osservando, però, l'intero andamento del potenziale d'azione si vede come il potenziale d'azione in presenza di verapamil non raggiunga l'altezza del picco massimo iniziale in assenza di farmaco e come il potenziale rimanga sempre minore di quello di riferimento proprio a causa di una minor corrente di calcio depolarizzante. In generale, si può dedurre che il sistema in *dynamic clamp* così simulato può fornire risultati soddisfacenti per la valutazione dell'effetto dei farmaci siccome i valori di ΔAPD_{90} risultano compatibili con quelli ottenuti nel modello in silico di O'Hara-Rudy. Osservando poi le deviazioni standard ottenute, si nota come i diversi valori di ΔAPD_{90} ottenuti non si discostino eccessivamente dai valori medi, dimostrando che il sistema in *dynamic clamp* può essere adeguato a dare un'indicazione oggettiva dell'effetto dei farmaci senza che il risultato sia inficiato eccessivamente dalla variabilità del sistema fisico di acquisizione, dai protocolli di compensazione o dagli errori del sistema. Solo per il thioridazine si nota una deviazione standard di oltre 50 ms, ma considerando l'allungamento provocato dal farmaco, un così alto valore di deviazione standard può essere spiegato considerando anche un aumento della variabilità inter-battito proporzionale all'aumentare della durata del potenziale d'azione a causa del rumore in ingresso al sistema.

La seconda analisi è stata effettuata andando a sostituire nel modello di O'Hara-Rudy la formulazione della corrente I_{Kr} con quella fornita da Beattie et al. 2018 [20]. Dato che la corrente I_{Kr} descritta con la formulazione di Beattie et al. 2018 è stata modellata a partire proprio da un sistema eterologo in cui è stato sovra espresso il gene hERG [20], facendo questa sostituzione si sono potuti valutare direttamente in silico gli effetti sul potenziale d'azione causati da una corrente diversa da quella prevista da O'Hara-Rudy, sia senza la somministrazione di farmaci che per ognuno dei farmaci analizzati.

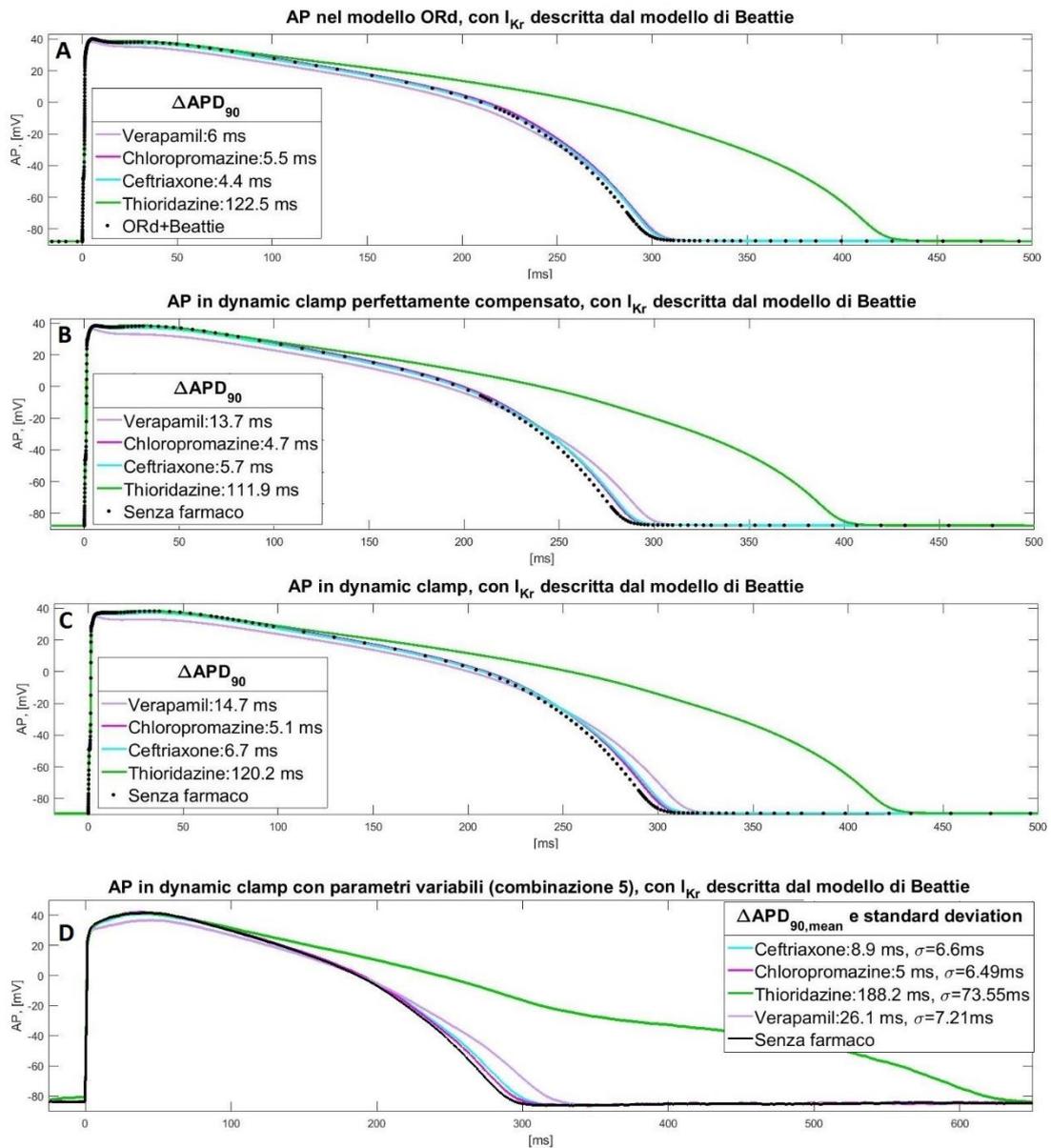


Figura 3.26, Potenziale d'azione ottenuto sostituendo al modello in silico di O'Hara-Rudy la formulazione di I_{Kr} di Beattie et al. 2018, sotto l'effetto di alcuni farmaci. A) Potenziale d'azione nel modello di O'Hara-Rudy. B) Potenziale d'azione ottenuto da un sistema in dynamic clamp perfettamente compensato. C) Potenziale d'azione ottenuto da un sistema in dynamic clamp dove sono state previste alcune sotto compensazioni. D) Esempio di potenziale d'azione, ottenuto da un sistema in dynamic clamp dove è stata simulata una variabilità intercellulare e del set up del sistema di acquisizione.

È interessante notare come ci sia un allungamento maggiore in Figura 3.26A per quanto riguarda la somministrazione di ceftriaxone rispetto all'allungamento sul modello in silico originale di O'Hara-Rudy in Figura 3.25A. A questo proposito è utile un'analisi della forma del potenziale d'azione cardiaco, in particolar modo nei cardiomiociti ventricolari. Infatti, la pendenza, ovvero la velocità di ripolarizzazione espressa da $\frac{dV_m}{dt}$, durante il plateau è decisamente minore rispetto alla pendenza nella fase finale. Questo fa sì che una minor quantità di corrente uscente durante la fase di plateau, come avviene nella formulazione di Beattie et al. 2018, abbia un impatto significativo in quanto diminuisce ulteriormente la pendenza in questa fase, che si riflette in un allungamento del potenziale d'azione. A questo effetto ci si aggiunge anche un bloccante della corrente I_{K_r} . Questo effetto è maggiormente visibile per la somministrazione di verapamil, in cui sebbene quasi il 50% della corrente I_{CaL} sia bloccato, per cui c'è una minor corrente depolarizzante che tende a diminuire la durata del potenziale d'azione, la percentuale di I_{K_r} bloccata, anche se in percentuale minore, è tale da allungare comunque il potenziale d'azione. In Figura 3.27 sono stati riportati i potenziali d'azione prodotti dal modello in silico andando a bloccare correnti diverse. Si vede come lasciando immutata la corrente I_{K_r} e bloccando solo la corrente I_{CaL} si ha un leggero accorciamento del potenziale d'azione a causa di una minor corrente ripolarizzante. Nel caso però, in cui a una minor depolarizzazione si aggiunga anche una minor ripolarizzazione, come nel caso del verapamil, l'effetto di una minore I_{K_r} prevale e il potenziale d'azione si allunga.

Tenendo conto di questa sostituzione sono stati poi eseguiti due esperimenti in *dynamic clamp* dove la corrente I_{K_r} del sistema eterologo è stata espressa nella formulazione di Beattie 2018. Volendo confrontare gli esperimenti in *dynamic clamp* con i risultati ottenuti in Figura 3.26A, il fattore di scala per le correnti è stato calcolato andando ad eseguire un protocollo in *AP clamp* con il potenziale d'azione ottenuto dal modello di O'Hara-Rudy sostituendo la corrente I_{K_r} con la formulazione di Beattie et al. 2018, curva nera in Figura 3.26A. Le correnti acquisite sono state poi confrontate con le correnti di riferimento prelevate dal modello in silico così costruito. In questo modo si è voluto eliminare eventuali errori nella stima del fattore di scala che possono insorgere andando a confrontare correnti con andamenti diversi. Andando ad osservare

i valori di ΔAPD_{90} ottenuti da un esperimento in *dynamic clamp* perfettamente compensato e con alcune sotto compensazioni, Figura 3.26B-C, si nota come questi siano simili a quelli ottenuti in Figura 3.26A. Gli stessi andamenti si mantengono anche in Figura 3.26D dove sono stati effettuati gli esperimenti con cellule diverse.

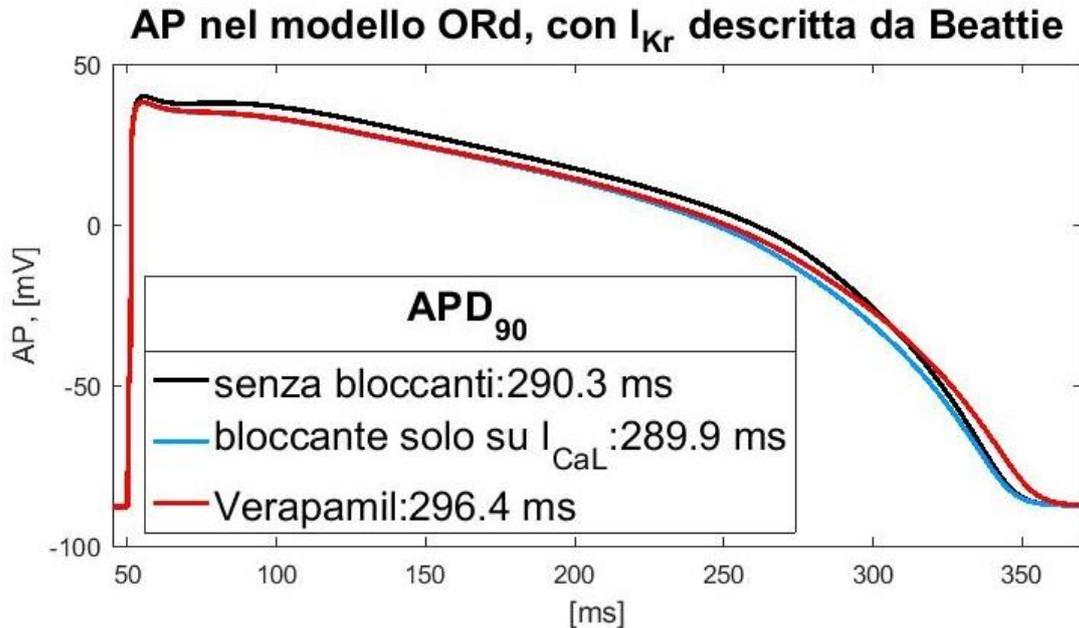


Figura 3.27, Potenziale d'azione ottenuto sostituendo al modello in silico di O'Hara-Rudy la formulazione di I_{Kr} di Beattie et al. 2018 e bloccando correnti differenti.

L'ultima analisi è stata realizzata andando ad effettuare un esperimento in *dynamic clamp* prendendo come modello in silico e di riferimento il modello di O'Hara-Rudy originale e la formulazione della corrente I_{Kr} fornita da Beattie et al. 2018 per il sistema eterologo. Il protocollo di stima del fattore di scala è stato perciò effettuato con il potenziale d'azione prodotto dal modello di O'Hara-Rudy e le correnti acquisite sono state confrontate con le correnti prodotte da quest'ultimo. In questo caso non si ha un modello in silico di riferimento per valutare se gli effetti del farmaco corrispondano, ma si può fare comunque un confronto con gli andamenti ottenuti in Figura 3.26.

In particolare, la somministrazione di verapamil in Figura 3.28A produce un allungamento del potenziale d'azione rispetto all'esperimento in assenza di farmaco, come in Figura 3.26B, ma opposto all'andamento che si ottiene osservando Figura 3.25B. Anche per quest'ultimo esperimento in *dynamic clamp* si può osservare come gli andamenti del potenziale d'azione in un sistema in cui sono state effettuate alcune

compensazioni, Figura 3.28B, e in un sistema dove invece sono presenti delle variabilità anche nelle compensazioni, Figura 3.28C, danno comunque risultati confrontabili.

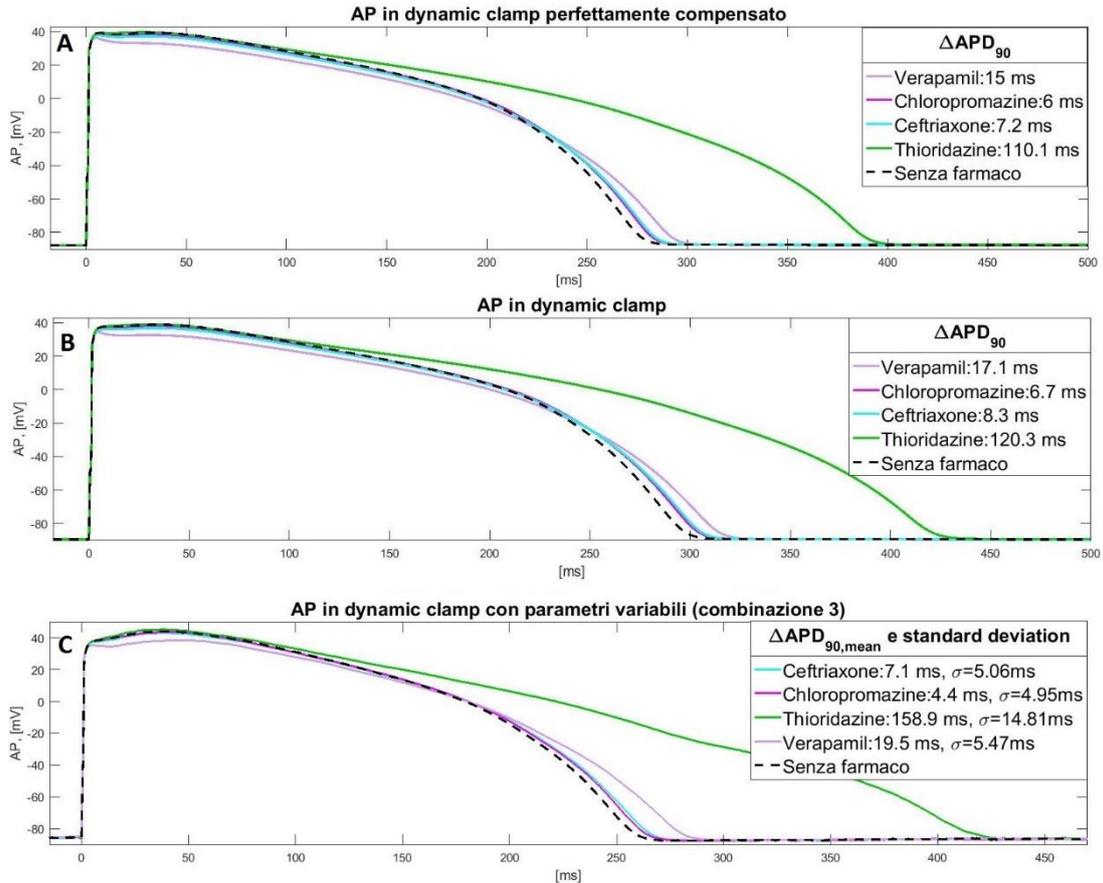


Figura 3.28, Potenziale d'azione ottenuto utilizzando la formulazione di I_{K_r} di Beattie et al. 2018, sotto l'effetto di alcuni farmaci. A) Potenziale d'azione ottenuto da un sistema in dynamic clamp perfettamente compensato. B) Potenziale d'azione ottenuto da un sistema in dynamic clamp dove sono state previste alcune sotto compensazioni. C) Esempio di potenziale d'azione ottenuto da un sistema in dynamic clamp dove è stata simulata una variabilità intercellulare e del set up del sistema di acquisizione.

In Figura 3.29 e Figura 3.30 sono mostrati i potenziali d'azione registrati in ognuno degli undici esperimenti, utilizzando per I_{K_r} nel sistema eterologo la formulazione di O'Hara-Rudy e di Beattie 2018 rispettivamente.

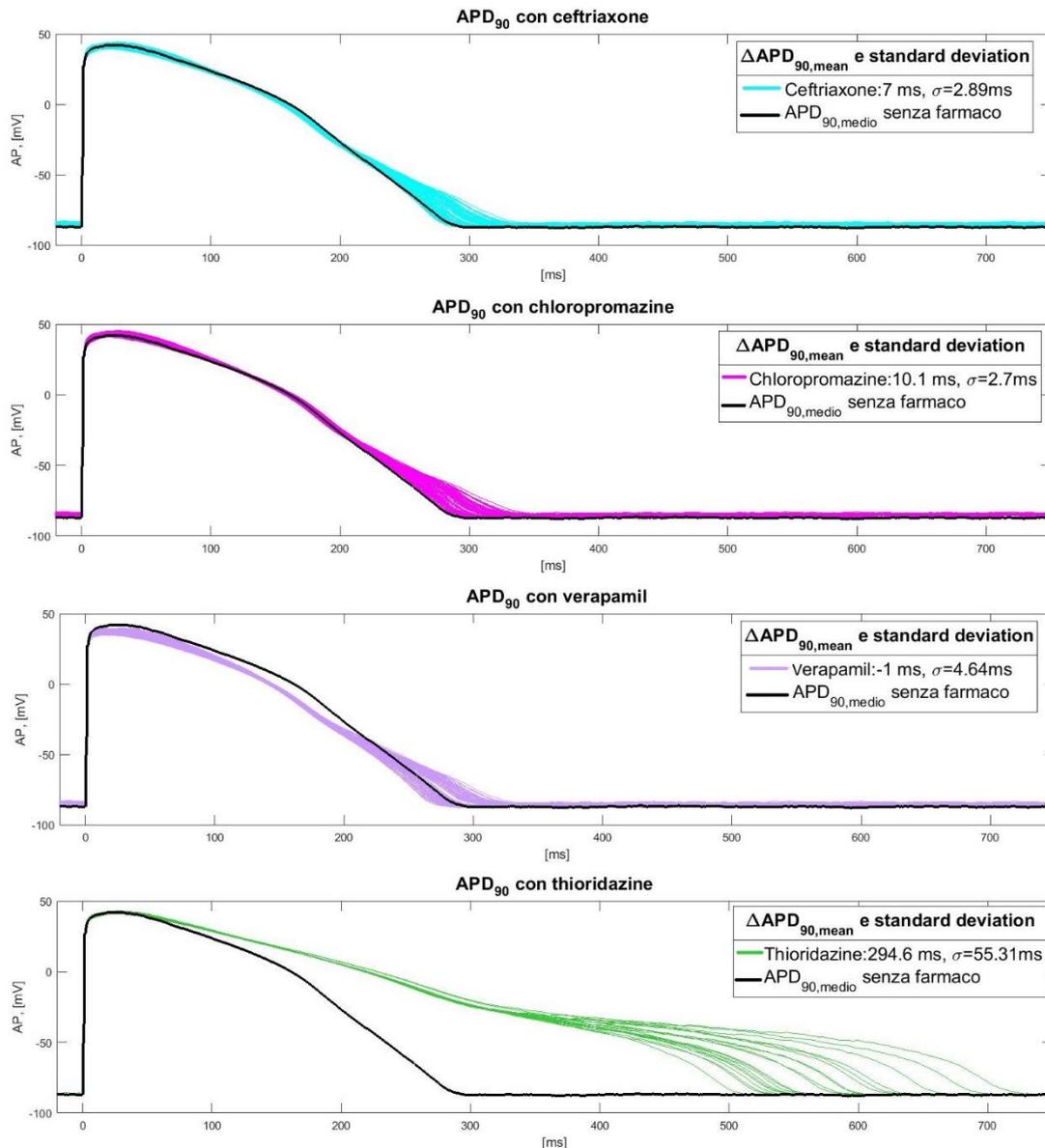


Figura 3.29, Confronto tra l'andamento di un potenziale d'azione rappresentativo del comportamento medio del sistema in dynamic clamp senza la somministrazione del farmaco e dei potenziali d'azione ottenuti simulando l'effetto del farmaco in 11 simulazioni diverse, ottenute tenendo conto della variabilità intercellulare e del set up del sistema di acquisizione. Il valore medio e la deviazione standard della differenza tra l'APD₉₀ senza farmaco e dopo la somministrazione del farmaco sono indicati.

Come si vede, la deviazione standard dei valori di ΔAPD_{90} ottenuti in esperimenti fra loro diversi è ragionevole in relazione all'allungamento che il farmaco produce, suggerendo quindi che esperimenti diversi diano comunque risultati consistenti tra loro. È importante però che i potenziali d'azione ottenuti in presenza di un farmaco siano confrontati con i potenziali d'azione ottenuti senza farmaco ma nelle medesime

condizioni, in quanto il valore di APD_{90} non può essere significativo di per sé, ma solo se confrontato con una situazione di riferimento.

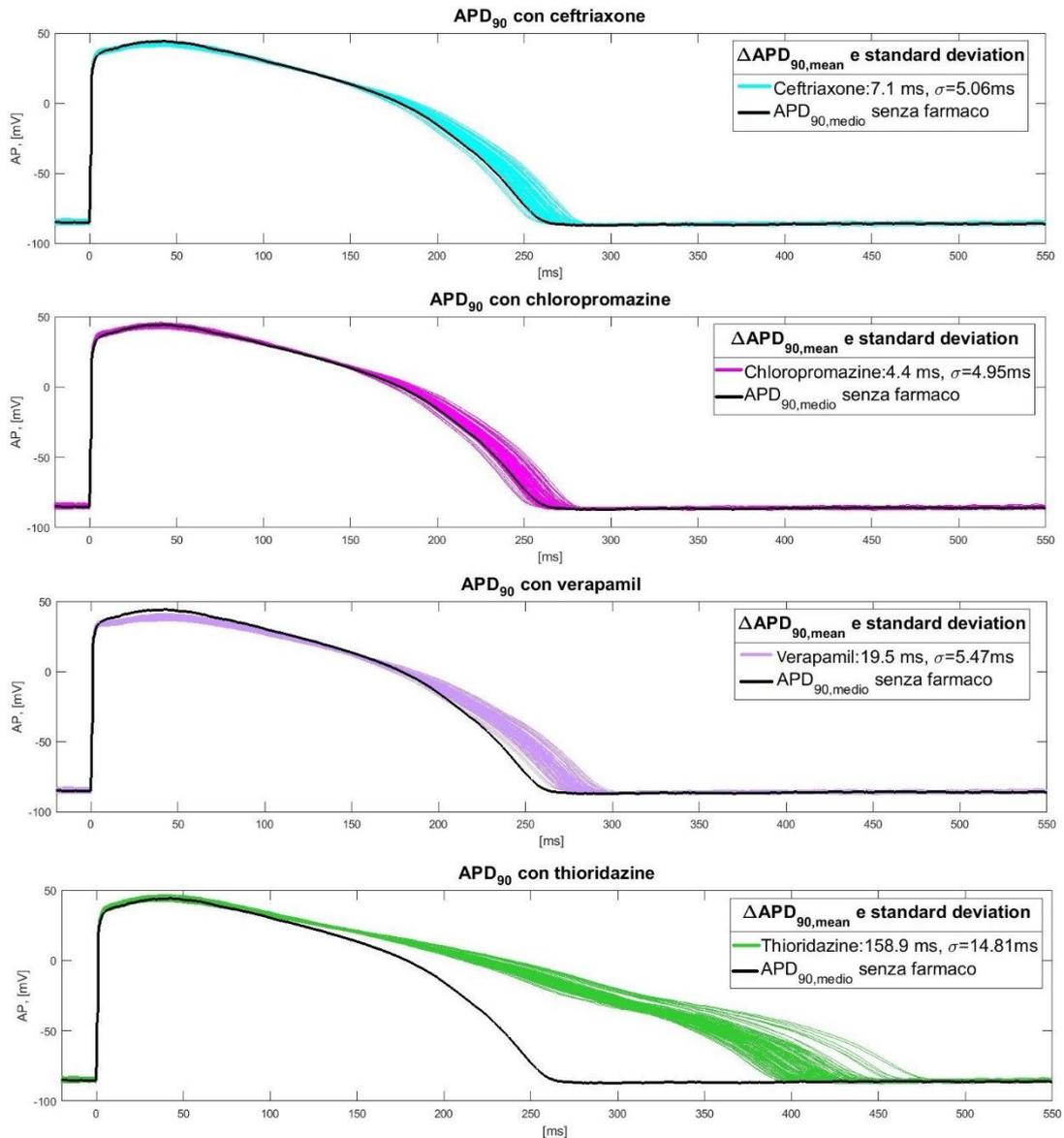


Figura 3.30, Potenziali d'azione ottenuti considerando la corrente I_{Kr} nella formulazione di Beattie 2018. Sono messi a confronto l'andamento di un potenziale d'azione rappresentativo del comportamento medio del sistema in dynamic clamp senza la somministrazione del farmaco e i potenziali d'azione ottenuti simulando l'effetto del farmaco in undici simulazioni diverse, ottenute tenendo conto della variabilità intercellulare e del set up del sistema di acquisizione. Il valore medio e la deviazione standard della differenza tra l' APD_{90} senza farmaco e dopo la somministrazione del farmaco sono indicati.

CONCLUSIONI

Con questo elaborato si è voluto descrivere una possibile implementazione di un sistema in *dynamic clamp* per valutare gli effetti di più correnti sulla durata del potenziale d'azione, andando a simulare le varie parti che compongono il sistema in ambiente Simulink®. Una componente importante della simulazione sono i protocolli adottati per il corretto funzionamento del sistema. In particolare, il protocollo di stima del fattore di scala risulta una procedura indispensabile in quanto consente di scalare il valore di corrente prelevato dal sistema eterologo e renderlo consistente con i valori attesi dal modello in silico. In questo elaborato sono stati presentati diversi procedimenti per effettuare la stima del fattore di scala e sono state presentate le motivazioni che hanno portato alla scelta del protocollo.

In seguito, è stata effettuata un'analisi di sensitività sul sistema simulato in modo da poter descrivere come la durata del potenziale d'azione, prodotto dal modello in silico, viene influenzato dai singoli componenti circuitali nella situazione in cui non vi sia stato somministrato alcun farmaco. In particolare, è stato osservato che:

- la compensazione della capacità di membrana è responsabile sia dell'allungamento che dell'accorciamento del potenziale d'azione a seconda che il valore stimato sia maggiore o minore del valore reale della capacità di membrana. Inoltre, a causa della presenza di una componente capacitiva, le correnti acquisite presentano degli spike nei primi secondi dall'insorgere del potenziale d'azione che possono influenzare sia la stima del fattore di scala sia la forma del potenziale d'azione stesso.
- Il valore della tensione di offset residua è il fattore che maggiormente incide sulla durata in quanto il valore di potenziale a cui viene portato il sistema eterologo è diverso dal valore di potenziale effettivamente in input al sistema di acquisizione. Questo fa sì che anche pochi millivolt di potenziale di offset residuo allontanino la durata del potenziale d'azione dal suo valore di riferimento in assenza di offset.
- La presenza di rumore influenza molto la durata del potenziale d'azione e la variabilità inter-battito, soprattutto se sovrapposto a correnti di ampiezza

comparabile all'altezza dei picchi rumorosi, rendendo necessario un adeguato filtraggio.

- La corrente di leakage necessita di una compensazione soprattutto se la resistenza di sigillo non è particolarmente elevata. Tuttavia, la sottrazione di una corrente di leakage sovrastimata rispetto al valore di corrente di leakage reale comporta un'alterazione indesiderata degli andamenti delle correnti che va a riflettersi poi sul potenziale d'azione.

L'ultima analisi riguarda la somministrazione virtuale di alcuni farmaci nei sistemi eterologhi per osservare come varia il potenziale d'azione in un sistema reale, quindi in presenza di rumore, compensazioni errate e variabilità cellulare, rispetto al potenziale d'azione prodotto dal modello in silico. Da questa simulazione si è potuto notare come gli effetti dei farmaci si mantengano simili tra loro anche in presenza delle variabilità introdotte. Tuttavia, non è possibile dedurre l'effetto di un farmaco osservando solamente il potenziale d'azione rispetto al potenziale d'azione del modello in silico considerato, ma è necessario fare riferimento all'andamento del potenziale d'azione precedentemente registrato da quel particolare sistema eterologo in assenza di farmaco.

Questo studio vuole essere un punto di partenza per la realizzazione di un sistema in *dynamic clamp* basato su un macchinario di *patch clamp* automatico in parallelo per la valutazione della proaritmicità dei farmaci. Le osservazioni descritte in questo elaborato possono essere di supporto per l'implementazione dei protocolli necessari all'esperimento in *dynamic clamp* e per prevedere le alterazioni introdotte dal sistema di acquisizione in un esperimento reale.

BIBLIOGRAFIA

- [1] D. M. Bers, «Cardiac excitation–contraction coupling,» *Nature*, vol. 415, pp. 198-205, 2002.
- [2] J. M. Nerbonne e R. S. Kass, «Molecular Physiology of Cardiac Repolarization,» *Physiological Reviews*, pp. 1205-1253, Ottobre 2005.
- [3] Molecular Devices, «The Axon Guide a guide to Electrophysiology and Biophysics Laboratory Techniques,» febbraio 2012. [Online]. Available: <https://mdc.custhelp.com/euf/assets/content/Axon%20Guide%203rd%20edition.pdf>. [Consultato il giorno 24 Febbraio 2020].
- [4] R. Wilders, E. E. Verheigck, R. Kumar, W. N. Goolsby, A. C. van Ginneken, R. W. Joyner e H. J. Jongsma, «Model Clamp and its Application to Synchronization of Rabbit Sinoatrial Node,» *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 217, n. 5, pp. H2168-H2182, 1996.
- [5] H. P. Robinson e N. Kawai, «Injection of Digitally Synthesized Synaptic Conductance Transients,» *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 49, pp. 157-165, 1993.
- [6] R. Wilders, «Dynamic clamp: a powerful tool in cardiac electrophysiology,» *The Journal of Physiology*, vol. 576, n. 2, pp. 349-359, 2006.
- [7] B. Goversen, N. Becker, S. Soelzle-Feix, A. Obergrusserger, M. A. Vos, T. A. van Veen, N. Fertig e T. P. de Boer, «A Hybrid Model for Safety Pharmacology on an Automated Patch Clamp Platform: Using Dynamic Clamp to Join iPSC-Derived Cardiomyocytes and Simulations of I_{K1} Ion Channels in Real-Time,» *Frontiers in Physiology*, vol. 8, n. 1094, pp. 1-10, January 2018.
- [8] G. Berecki, J. G. Zegers, Z. A. Bhuiyan, A. O. Verkerk, R. Wilders e A. C. G. van Ginneken, «Long-QT syndrome-related sodium channel mutations probed by the dynamic action potential clamp technique,» *The Journal of Physiology*, vol. 570, n. Pt 2, pp. 237-250, 2006.
- [9] N. Fertig, R. H. Blick e J. C. Behrends, «Whole Cell Patch Clamp Recording Performed on a Planar Glass Chip,» *Biophysical Journal*, vol. 82, n. 6, p. 3056–3062, June 2002.
- [10] A. Obergrusserger, A. Brüggemann, T. A. Goetze, M. Rapedius, C. Haarmann, I. Rinke, N. Becker, T. Oka, A. Ohtsuki, T. Stengel, M. Vogel, J. Steindl, M. Mueller, J. Stiehler, M. George e N. Fertig, «Automated Patch Clamp Meets

High-Throughput Screening: 384 Cells Recorded,» *Journal of Laboratory Automation*, vol. 21, n. 6, pp. 779-793, 2016.

- [11] A. Stett, C. Burkhardt, U. Weber, P. van Stiphout e T. Knott, «CYTOCENTERING: a novel technique enabling automated cell-by-cell patch clamping with the CYTOPATCH chip,» *Receptors & channels*, vol. 9, n. 1, pp. 59-66, 2003.
- [12] A. L. Hodgkin e A. F. Huxley, «A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve,» *The Journal of Physiology*, vol. 117, n. 4, pp. 500-544, 1952.
- [13] M. R. Davies, K. Wang, G. R. Mirams, A. Caruso, D. Noble, A. Walz, T. Lavé, F. Schuler, T. Singer e L. Polonchuk, «Recent developments in using mechanistic cardiac modelling for drug safety evaluation,» *Drug Discovery Today*, vol. 21, n. 6, pp. 924-938, 2016.
- [14] P. T. Sager, G. Gintant, R. J. Turner, S. Pettit e N. Stockbridge, «Rechanneling the cardiac proarrhythmia safety paradigm: A meeting report from the Cardiac Safety Research Consortium,» *American Heart Journal*, vol. 167, n. 3, pp. 292-300, 2014.
- [15] CiPA, «About CiPA,» Health and Environmental Sciences Institute, 2019. [Online]. Available: <https://cipaproject.org/about-cipa/>. [Consultato il giorno 26 Febbraio 2020].
- [16] T. O'Hara, L. Virág, A. Varró e Y. Rudy, «Simulation of the Undiseased Human Cardiac ventricular action Potential: Model Formulation and Experimental Validation,» *PLoS Computational Cardiology*, vol. 7, n. 5, pp. 1-27, May 2011.
- [17] T. De Boer, G. Mirams e S. Severi, *Bridging the gap between in vitro drug tests and computer simulations with dynamic clamping*, Internal report, received from the authors, 14 Novembre 2017.
- [18] N. Gamper, J. D. Stockand e M. S. shapiro, «The Use of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells in the Study of Ion Channels,» *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, vol. 51, pp. 177-185, 2005.
- [19] E. Wettwer e U. Ravens, «Recording Cardiac Potassium Currents with the Whole-Cell Voltage Clamp Technique,» in *Practical Methods in Cardiovascula Research*, Heidelberg, Berlin: Springer, 2005, pp. 355-380.
- [20] K. A. Beattie, A. P. Hill, R. Bardenet, Y. Cui, J. I. vanderberg, D. J. Gavaghan, T. P. De Boer e G. R. Mirams, «Sinusoidal Voltage Protocols for Rapid Characterisation of Ion Channel Kinetics,» *The Journal of physiology*, vol. 596, n. 10, pp. 1813-1828, 2018.

- [21] C. Sanson, B. Schombert, B. Filoche-Rommé, M. Partiseti e A. Bohme, «Electrophysiological and Pharmacological Characterization of Human Inwardly Rectifying Kir2.1 Channels on an Automated Patch-Clamp Platform.,» *ASSAY and Drug Development Technologies*, vol. 17, n. 3, pp. 89-99, 2019.
- [22] B'SYS GmbH, «HEK-293 CaV1.2 Cells, Specification sheet,» [Online]. Available: https://bsys.ch/media/hek_cav1.2_2.pdf. [Consultato il giorno 7 Febbraio 2020].
- [23] C. L. Lei e G. Mirams, *Voltage Clamp Modelling*, Internal report, received from the authors, 11 Luglio 2019.
- [24] P. Weerakoon, E. Culurciello, K. G. Klemic e F. J. Sigworth, «An Integrated Patch-Clamp Potentiostat with Electrode Compensation,» *IEEE Transaction on Biomedical Circuits and Systems*, vol. 3, n. 2, pp. 117-125, 2009.
- [25] G. Mirams, «Nanion User Meeting Talk by Gary Mirams,» 18 Ottobre 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.10001900.v1>.
- [26] C. L. Lei, M. Clerx, D. J. Gavaghan, L. Polonchuk, G. R. Mirams e K. Wang, «Rapid Characterisation of hERG Potassium Channel Kinetics I: using an Automated High-throuput System,» *Biophysical Journal*, 2019.
- [27] G. Berecki, J. G. Zegers, A. O. Verkerk, Z. A. Bhuiyan, B. de Jonge, M. W. Veldkamp, R. Wilders e A. C. van Ginneken, «HERG Channel (Dys)function Revealed by Dynamic Action Potential Clamp Technique,» *Biophysical Journal* vol. 88, n. 1, pp. 566-578, January 2005.
- [28] G. Williams e G. Mirams, «A web portal for in-silico action potential predictions,» *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, vol. 75, pp. 10-16, 2015.
- [29] E. Passini, O. J. Britton, H. R. Lu, J. Rohrbacher, A. N. Hermans, D. J. Gallacher, R. J. H. Greig, A. Bueno-Orovio e B. Rodriguez, «Human In Silico Drug Trials Demonstrate Higher Accuracy than Animal Models in Predicting Clinical Pro-Arrhythmic Cardiotoxicity,» *Frontiers in Physiology* , vol. 8, n. 668 2017.
- [30] A. Zaza, «Control of the cardiac action potential: The role of repolarization dynamics,» *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 48, n. 1, pp. 106-111, 2010.
- [31] L. Virág, K. Acsai, O. Hála, A. Zaza, M. Bitany, G. Bogáts, J. G. Papp e A. Varró, «Self-augmentation of the lengthening of repolarization is related to the shape of the cardiac action potential: implications for reverse rate dependancy,» *british Journal of Pharmacology*, vol. 156, n. 7, pp. 1076-1084, 2009.

- [32] A. Destexhe e T. Bal, *Dynamic Clamp: from Principles to Applications*, New York: Springer, 2009.
- [33] C. Bartolucci, C. Altomare, M. Bennati, S. Furini, A. Zaza e S. Severi, «Combined action potential- and dynamic-clamp for accurate computational modelling of the cardiac IKr current,» *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 79, pp. 187-194, 2015.
- [34] G. R. Mirams e D. Noble, «Is it time for in silico simulation of drug cardiac side effects?,» *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1245, n. 1, pp. 44-47, 2011.
- [35] G. R. Mirams, M. R. Davies, Y. Cui, P. Kohl e D. Noble, «Application of cardiac electrophysiology simulations to pro-arrhythmic safety testing,» *British Journal of Pharmacology*, vol. 167, pp. 932-945, 2012.