

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
SECONDA FACOLTÀ DI INGEGNERIA – SEDE DI CESENA
CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**ANALISI COMPUTAZIONALE DELLE PROPRIETÀ DI
RESTITUZIONE ELETTRICA DELLE CELLULE CARDIACHE**

Tesi in Laurea in

Laboratorio di Bioingegneria L-A

Relatore

Prof. Stefano Severi

Presentata da

Riccardo Muzzi

Correlatrice

Dott.ssa Elisa Passini

Sessione III

Anno Accademico 2010/2011

SOMMARIO

INTRODUZIONE.....	3
--------------------------	----------

CAPITOLO 1

FISIOLOGIA DEL POTENZIALE D'AZIONE.....	5
1.1 IL POTENZIALE D' AZIONE	5
1.2. LA MEMBRANA CELLULARE E I CANALI IONICI... 	12
1.3 LE CORRENTI IONICHE.....	14
1.4 PROPAGAZIONE DEL POTENZIALE D' AZIONE	16
1.5 DURATA DEL POTENZIALE D'AZIONE.....	19

CAPITOLO 2

MODELLISTICA DEL POTENZIALE D'AZIONE	23
2.1 INTRODUZIONE ALLA MODELLISTICA CARDIACA	23
2.2 IL MODELLO HODGKIN-HUXLEY	25
2.3 I MODELLI MARKOVIANI	29
2.4 MODELLI DI POTENZIALE D'AZIONE DI SINGOLA CELLULA	36

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI.....	39
3.1 MODELLI MATEMATICI DI INTERESSE.....	39
3.2 PROTOCOLLI DI STIMOLAZIONE	49
3.3 IMPLEMENTAZIONE IN MATLAB.....	51

CAPITOLO 4	
RISULTATI.....	61
4.1 RISULTATI PRELIMINARI.....	61
4.2 PROTOCOLLO S1S2.....	63
4.3 ANALISI DELLA FASE RAPIDA	65
CONCLUSIONI	73
APPENDICE A	
CODICE MATLAB	77
BIBLIOGRAFIA	97

INTRODUZIONE

I modelli di potenziale d'azione cardiaco sono modelli matematici utilizzati per simulare il comportamento di un cardiomiocita, o cellula cardiaca, in diversi contesti, per poter indagare le dinamiche cardiache ed eventualmente individuare le possibili cause di aritmie o patologie cardiache.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di confrontare tre diversi modelli di potenziale d'azione cardiaco, analizzando in particolare la risposta di ognuno di essi ad una variazione di frequenza di stimolazione, con l'obiettivo di individuare i meccanismi ionici responsabili dell'adattamento della durata del potenziale d'azione, che non si mantiene costante bensì si riduce, all'aumentare della frequenza. Dallo studio delle cause responsabili dell'adattamento in ogni modello, si può quindi cercare di comprendere quelli che sono più verosimilmente i meccanismi coinvolti nelle cellule reali.

Sono stati implementati diversi protocolli di stimolazione ai modelli matematici, e tutte le simulazioni sono state realizzate con il software Matlab.

Nel capitolo 1 vengono fornite le conoscenze di base per la comprensione di questo elaborato. In particolare, viene introdotta la fisiologia del potenziale d'azione nelle cellule ventricolari e se ne descrivono le sue caratteristiche.

Nel capitolo 2 vengono introdotte le conoscenze di base della modellistica cardiaca, a partire dal modello di potenziale d'azione di Hodgkin-Huxley fino ai più recenti modelli di cellula ventricolare umana.

Nel capitolo 3 vengono descritti i materiali e metodi utilizzati per le simulazioni numeriche, quindi in particolare le caratteristiche dei modelli matematici utilizzati e la struttura dei file sviluppati in Matlab.

Nel capitolo 4 vengono riportati i risultati delle simulazioni, con le relative conclusioni.

CAPITOLO 1

FISIOLOGIA DEL POTENZIALE D'AZIONE

Il primo capitolo serve ad introdurre le conoscenze di base per la comprensione di questo elaborato. In particolare, viene introdotta la fisiologia del potenziale d'azione (AP) nelle cellule ventricolari e se ne descrivono le sue caratteristiche.

1.1 IL POTENZIALE D' AZIONE

Si definisce potenziale d'azione una rapida variazione del potenziale di membrana, che passa dal valore negativo di riposo (circa -90mV) ad un valore positivo, per poi ritornare al valore iniziale (Fig.1.1).

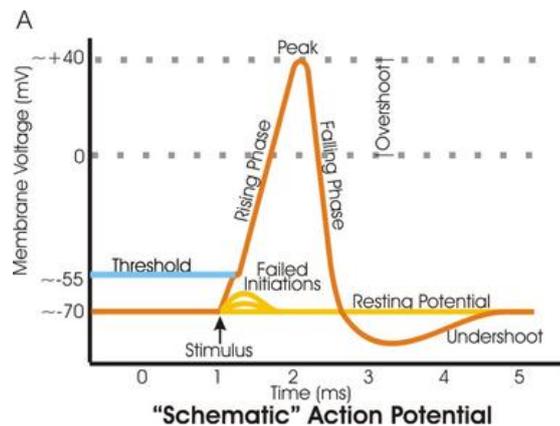


Figura 1.1 – Rappresentazione schematica del potenziale d'azione [31]

Il potenziale d'azione è composto da numerose fasi, associate a variazioni della conduttanza della membrana cellulare per alcuni ioni, in particolare Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . Affinché si sviluppi un potenziale d'azione è necessario che la membrana si depolarizzi fino ad un valore di soglia (circa -55mV), che produrrà l'apertura delle proteine di canali per gli ioni Na^+ , che entreranno nella cellula depolarizzandola ulteriormente e generando così un meccanismo di feedback positivo, responsabile del ripido spike iniziale. L'apertura di altri canali ionici,

invece, ne determinerà poi forma e durata, fino al ripristino delle condizioni di riposo.

1.1.1 Il potenziale d'azione della cellula cardiaca

Il potenziale d'azione cardiaco presenta caratteristiche leggermente differenti dalla altre cellule del cuore. Inizialmente si ha una fase di depolarizzazione estremamente rapida (Fase 0), seguita da due fasi che non hanno un preciso corrispondente nelle cellule nervose e nei muscoli scheletrici: la ripolarizzazione transiente (Fase 1), che gioca un ruolo importante nel determinare la durata del potenziale d'azione (APD), ed il plateau (Fase 2), responsabile del prolungato potenziale d'azione cardiaco. La ripolarizzazione (Fase 3) riporta il potenziale di membrana al suo valore di inizio e infine, si ha una fase di riposo, la diastole (Fase 4). Questo comportamento è quello che si ritrova nelle fibre atriali e ventricolari, mentre nelle cellule del nodo seno-atriale, che rappresentano il pace-maker naturale del cuore, durante la Fase 4 si ha una nuova depolarizzazione spontanea, responsabile della generazione del potenziale d'azione.

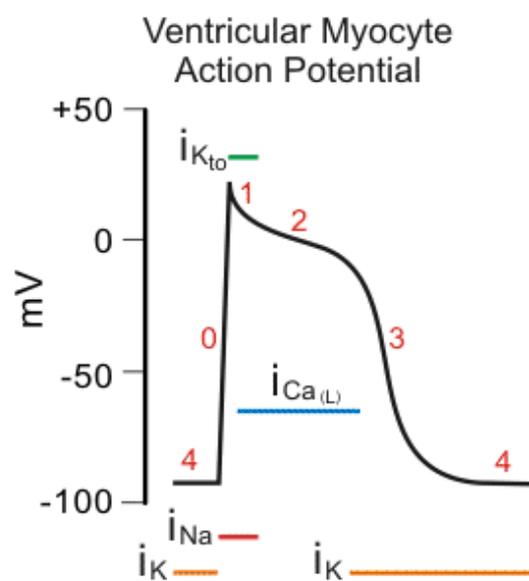


Figura 1.2 - Potenziale d'azione della cellula ventricolare cardiaca [18]

Potenziale di riposo

Il potenziale di riposo nelle cellule del miocardio ha un valore di circa -90 mV, ed è direttamente legato al gradiente elettrochimico del K^+ attraverso la membrana cellulare, che è permeabile al K^+ stesso. La concentrazione degli ioni K^+ all'interno della cellula è notevolmente superiore alla concentrazione extracellulare (circa 145 mM contro 5 mM) e il K^+ tenderà quindi a muoversi verso l'esterno della cellula, seguendo il gradiente di concentrazione.

Fase 0

La depolarizzazione rapida (Fase 0) è provocata da uno stimolo efficace [19], ovvero che superi il valore di soglia, ed è dovuta quasi esclusivamente all'ingresso di ioni Na^+ a seguito di un rapido-aumento della conduttanza dei canali ionici corrispondenti. L'ingresso di ioni Na^+ , positivi, provoca l'attivazione di altri canali rapidi del Na^+ , che ne aumentano ulteriormente l'ingresso, con un meccanismo a feedback positivo.

La velocità di depolarizzazione è determinata dal flusso di Na^+ entrante nella cellula. La corrente del Na^+ è molto rapida e di ampiezza elevata; tuttavia, l'ingresso di Na^+ , si arresta dopo 1-2 ms, perché i canali ionici si inattivano subito dopo l'apertura e la conduttanza torna ad assumere i valori che aveva prima dell'attivazione. Finché la cellula non è completamente ripolarizzata (-90 mV) i canali non riescono ad uscire da questo stato di inattivazione.

Fase 1

La Fase 0 del potenziale d'azione è seguita da un breve periodo di ripolarizzazione (Fase 1), che rispecchia in parte l'effetto dell'inattivazione dei canali rapidi del Na^+ , ma soprattutto causata dall'apertura di canali del K^+ . che consentono il passaggio di una corrente uscente transiente ripolarizzante, chiamata Ito (transient outward).

Fase 2

In seguito si ha la fase di plateau (Fase 2) caratteristica dell'AP cardiaco nonché principale responsabile della sua durata. In questa fase, gli ioni Ca^{2+} e in parte anche gli ioni Na^+ entrano nella cellula attraverso i canali lenti (Long-Lasting, L-type), così chiamati perché i processi di attivazione, inattivazione e recupero (cioè l'uscita dallo stato di inattivazione ed il conseguente recupero della possibilità di attivarsi a fronte di uno stimolo elettrico adeguato) sono più lenti rispetto ai canali T-type. L'apertura di questi canali provoca un aumento della conduttanza del calcio, che inizia subito dopo la Fase 0 del potenziale. Poiché la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} è molto inferiore a quella extracellulare (circa 100 nM contro 1-2 mM), l'aumento di conduttanza favorisce una corrente di calcio entrante nella cellula per tutta la durata del plateau: tale corrente è chiamata ICaL , proprio perché dovuta a canali L-type. La corrente di Ca^{2+} attraverso i canali T-type fornisce, invece, un contributo limitato all'upstroke dell' AP, che è principalmente sostenuto dalla corrente di Na^+ . Durante il plateau del potenziale d'azione, gli ioni K^+ escono dalla cellula, secondo il gradiente di concentrazione. La conduttanza di membrana risulta elevata durante la prima parte del plateau, e si riduce nella parte finale. Ciò significa che all'inizio della Fase 2 la membrana trasporta sia correnti entranti sia correnti uscenti, la cui ampiezza diminuisce, poi in modo parallelo per mantenere un potenziale relativamente costante, finché una corrente uscente aggiuntiva non completa la ripolarizzazione.

Fase 3

L' efflusso di ioni K^+ rende negativo l'interno della cellula rispetto all'esterno, e ripolarizza la membrana ponendo fine al plateau. La ripolarizzazione (Fase 3) dipende da due processi principali: l'incremento della conduttanza del K^+ (gK) e la riduzione della conduttanza di Ca^{2+} . L'incremento di gK comporta l'uscita di K^+ dalla cellula. Tale corrente in uscita non è più controbilanciata dalle correnti entranti di Na^+ e Ca^{2+} , che vanno diminuendo e l'interno della membrana tende a diventare sempre più negativo.

L'incremento di g_K è voltaggio-dipendente; se il potenziale di membrana diventa più negativo, g_K aumenta e viene accelerato il flusso di K^+ verso l'esterno. Pertanto, questa fase di rapida ripolarizzazione è un feedback positivo.

Esistono altri due meccanismi che offrono una corrente favorevole alla ripolarizzazione del potenziale di membrana.

Il primo è la pompa $Na^+ K^+$, che trasporta tre ioni Na^+ fuori dalla cellula ogni due ioni K^+ trasportati all'interno, generando una corrente netta uscente, che contribuisce al mantenimento del potenziale di riposo. Anche se normalmente piccola, questa corrente ripolarizzante aumenta quando la cellula è sovraccarica di Na^+ , ad esempio nel caso di frequenza cardiaca accelerata. Il secondo meccanismo è lo scambiatore $K^+ Ca^{2+}$ che scambia uno ione Ca^{2+} per tre ioni Na^+ e che sostiene una piccola corrente uscente durante la sistole ed entrante durante la diastole.

Periodo refrattario

Una volta che si è manifestato il potenziale d'azione si ha un periodo refrattario assoluto, ossia un intervallo di tempo durante il quale non è possibile scatenare un nuovo potenziale d'azione qualunque sia lo stimolo. Questo periodo parte dalla Fase 0 e si estende fino al punto della Fase 3 in cui i canali rapidi del Na^+ ritornano attivi. La restante parte della Fase 3 è detta periodo refrattario relativo: in questo periodo può essere prodotto un potenziale d'azione, ma solo applicando uno stimolo più intenso. Le risposte che si hanno durante questo periodo dipendono dal valore del potenziale di membrana al momento della stimolazione, ma sono comunque lente e di ampiezza non elevata, perché la conduzione è più lenta. L'ampiezza e la velocità della depolarizzazione aumentano progressivamente se lo stimolo avviene in momenti successivi al periodo refrattario relativo, dato che è probabile che un numero sempre maggiore di canali del Na^+ abbia recuperato dopo l'inattivazione. Il periodo refrattario è indispensabile per il corretto funzionamento del cuore, poiché permette un alto rendimento della funzione di pompa del cuore, in quanto il ventricolo può riempirsi completamente di sangue prima di eseguire un'altra contrazione; inoltre permette di avere una netta distinzione tra fase pulsoria (sistole) e fase di riposo (diastole), in maniera

tale da permettere l'apporto di sangue attraverso le coronarie, che può avvenire solo in fase diastolica.

1.1.2 Il potenziale d'azione nelle diverse regioni del tessuto cardiaco

Il potenziale d'azione presenta forme differenti da una regione all'altra del cuore, a causa della diversa espressione dei canali ionici nei tessuti che lo costituiscono (Fig.1.3). Morfologia e durata del potenziale d'azione sono quindi aspetti caratteristici di ogni cellula e sono influenzati dall'interazione di molti processi cellulari fondamentali (rivisto in Katz, 1992) [20].

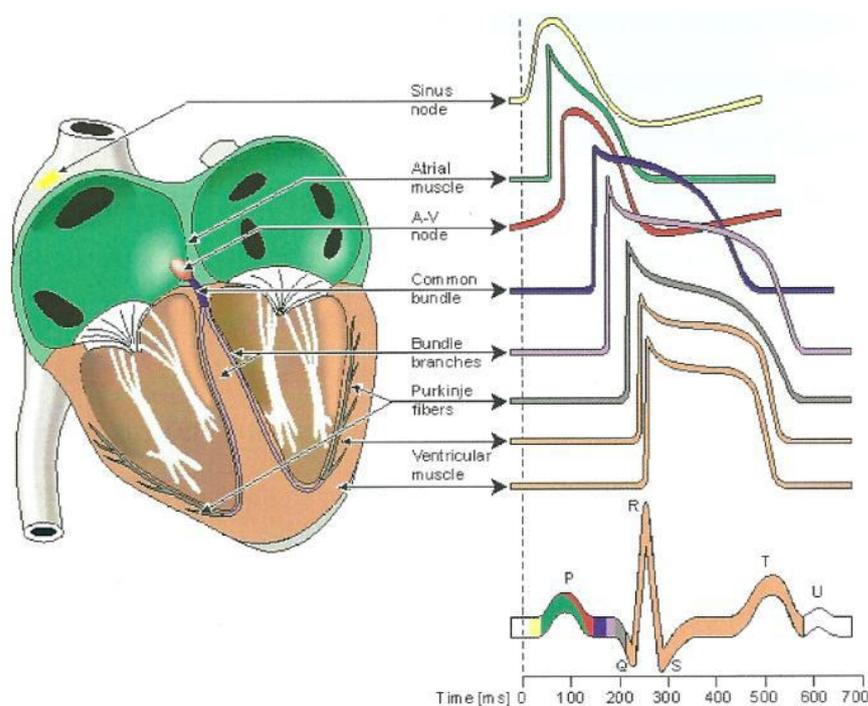


Figura 1.3- Rappresentazione dell' AP per il tessuto cardiaco nelle varie regioni del cuore

Nelle cellule del nodo seno atriale, ad esempio, il potenziale d'azione è di breve durata e ha un lento upstroke; negli atri, invece, l'upstroke è molto rapido, così come la ripolarizzazione ed il plateau è relativamente breve. Nelle cellule del sistema His-Purkinje il potenziale d'azione è molto ampio, sale rapidamente e dura a lungo (300 ms); nei ventricoli, infine, ha una durata

intermedia ed è molto simile a quello delle fibre del Purkinje, ma di minore ampiezza.

La durata del potenziale d'azione (APD) differisce nei diversi strati della parete ventricolare. In particolare l'AP è più lungo nel mid-miocardio, un po' più breve nell'endocardio e ancora più breve nell'epicardio (Figura 1.4).

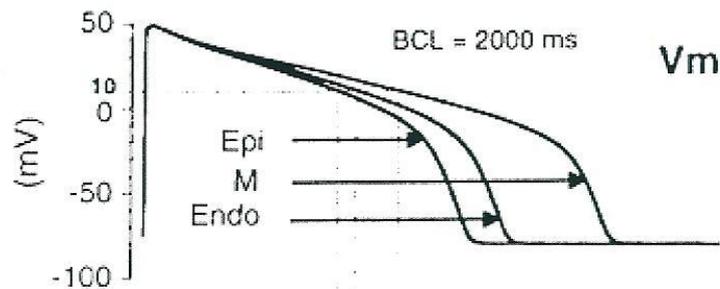


Figura 1.4-Rappresentazione della durata dell'AP nelle varie regioni del cuore

L'eterogeneità nella durata della ripolarizzazione ventricolare nei diversi strati del miocardio è principalmente dovuta al differente contributo delle due correnti di K^+ : I_{to} e I_{Ks} . Il potenziale d'azione tipico di un miocita ventricolare è mostrato in Figura 1.8, in cui sono anche mostrate le correnti depolarizzanti relative agli ioni Na^+ e Ca^{2+} .

In condizioni normali la corrente di Na^+ , I_{Na} , si attiva rapidamente producendo il picco dell' AP, poi si inattiva completamente (Marban et al., 1998)[21].

La corrente di Ca^{2+} L-type, I_{CaL} , si inattiva un po' più lentamente e non completamente consentendo alla corrente di Ca^{2+} di sostenere la fase di plateau dell' AP (Zeng e Rudy, 1995)[22]. L'ingresso di Ca^{2+} attraverso il canale di Ca^{2+} L-type innesca il rilascio di Ca^{2+} da parte del reticolo sarcoplasmatico (SR), un compartimento interno in cui è immagazzinato Ca^{2+} . Il reticolo sarcoplasmatico è un organello subcellulare che rilascia la maggior parte di Ca^{2+} durante ogni battito cardiaco (Bers, 2001)[23]. La parte inferiore della Figura mostra alcune correnti di K^+ e una corrente di Cl (I_{to2}), che sono coinvolte nella fase di ripolarizzazione della membrana. La corrente inward-rectifier, I_{K1} , mantiene e stabilizza il potenziale di riposo, le correnti transienti verso l'esterno, I_{to1} e

Ito₂, relative agli ioni K⁺ e Cl⁻ rispettivamente (Nabauer et al., 1993; Collier et al., 1996), [24-25] contribuiscono alla prima rapida diminuzione del picco dell' AP che precede la fase di plateau, mentre le componenti della corrente rettificante ritardata, IKr e IKs, e la corrente di K⁺ di plateau, IKp, mostrano proprietà voltaggio e tempo dipendenti che contribuiscono alla ripolarizzazione dell' AP (Yue e Marban, 1988) [26].

1.2. LA MEMBRANA CELLULARE E I CANALI IONICI

La membrana cellulare è costituita da un doppio strato fosfolipidico, e rappresenta una barriera selettivamente permeabile tra la cellula e l'ambiente esterno: essa permette l'ingresso di molecole essenziali, come glucosio, amminoacidi e lipidi, e l'uscita delle sostanze di scarto. In particolare, il passaggio di queste sostanze è possibile grazie alla presenza di particolari proteine, i canali ionici, che attraversano la membrana cellulare e creano quindi un collegamento tra l'interno e l'esterno della cellula.

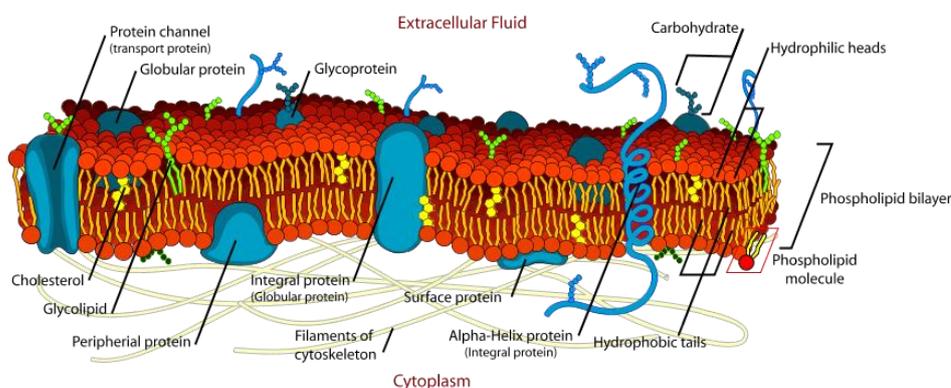


Figura 1.5 - Schematizzazione della membrana cellulare [28]

Il passaggio degli ioni può avvenire secondo gradiente, chimico o elettrico, o in modo attivo, con il consumo di energia. I canali ionici sono altamente selettivi, e la loro apertura può dipendere da diversi fattori: esistono canali sempre

aperti, altri che sono voltaggio-dipendenti o altri ancora che possono dipendere da una determinata concentrazione.

1.2.1 Canali del sodio

Nella maggior parte delle cellule, la corrente rigenerativa verso l'interno che dà origine al potenziale d'azione risulta dai canali del sodio voltaggio-dipendenti. La complessa struttura del canale è caratterizzata da 4 domini simili, ognuno di questi comprendente 6 eliche che attraversano la membrana. Una di queste eliche, la S4, contiene numerosi aminoacidi basici e forma il sensore di voltaggio, che spostandosi verso l'esterno consente l'apertura del canale quando la membrana viene depolarizzata. Una delle pieghe intracellulari è posizionata in modo da oscillare attraverso il canale e bloccarlo quando S4 viene spostata, con la conseguente inattivazione del canale (Fig. 6).

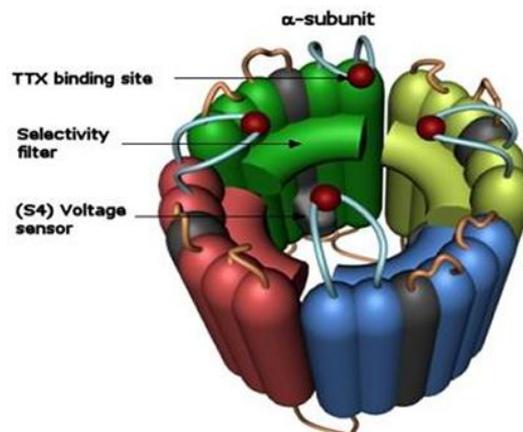


Figura 1.6-Rappresentazione schematica dei canali sodio voltaggio dipendenti [29]

1.2.2 Canali del potassio

I canali del potassio sono presenti in tutte le cellule e hanno la funzione fondamentale di stabilizzare il potenziale di riposo di una membrana; inoltre, intervengono nella fase di ripolarizzazione dopo un potenziale d'azione. La cinetica di attivazione è molto variabile (lenta o veloce); quella di inattivazione può essere molto veloce oppure inesistente.

A livello della 4a α -elica c'è il segmento che funge da sensore del voltaggio; è costituito da diversi aminoacidi, tra cui l'arginina a contatto con aminoacidi

idrofobici, che si muove in seguito alle variazioni del potenziale provocando l'apertura del canale. Il segmento tra la 5a e la 6a α -elica (P-loop) si trova al centro del poro e determina la selettività degli ioni; a livello di quest'ansa, inoltre, c'è il sito di legame per le tossine. Il gate di inattivazione, invece, si trova tra la 3a e la 4a α -elica.

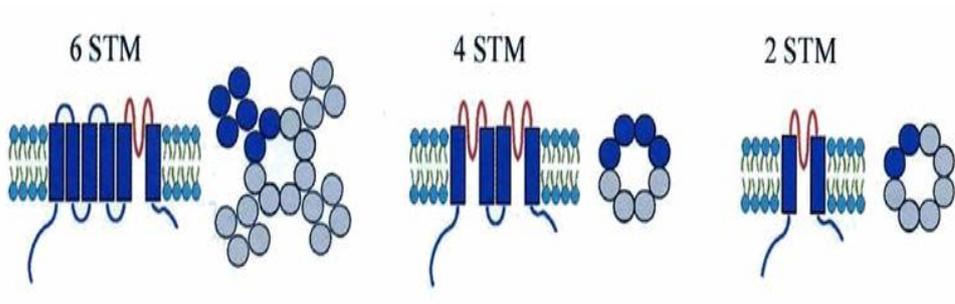


Figura 1.7- Rappresentazione schematica dei canali potassio voltaggio dipendenti [30]

1.3 LE CORRENTI IONICHE

La gran parte delle correnti che attraversando la membrana cellulare con specifici canali o pompe ioniche generano il potenziale d'azione, sono trasportate da ioni carichi positivamente. Infatti, Na^+ e Ca^{2+} sono maggiormente concentrati all'esterno della cellula (e tendono quindi ad entrare), mentre il K^+ è più concentrato all'interno (e tende quindi ad uscire).

Il movimento di tali ioni verso l'interno della cellula (corrente entrante) sposta il potenziale in senso positivo (depolarizzazione), il movimento verso l'esterno ha effetto opposto (ripolarizzazione). Ne consegue che, durante il potenziale d'azione fisiologico, le correnti Na^+ e di Ca^{2+} sono entranti e causano depolarizzazione, le correnti di K^+ sono uscenti e causano ripolarizzazione.

Le correnti vengono denotate dal simbolo I (corrente), seguito dal simbolo dello ione che trasporta la corrente (es. I_{Na} = corrente di Na^+) ed, eventualmente, da ulteriori simboli che definiscono il tipo di corrente (es. fast o slow). In Fig. 8 sono rappresentate le principali correnti cardiache di interesse.

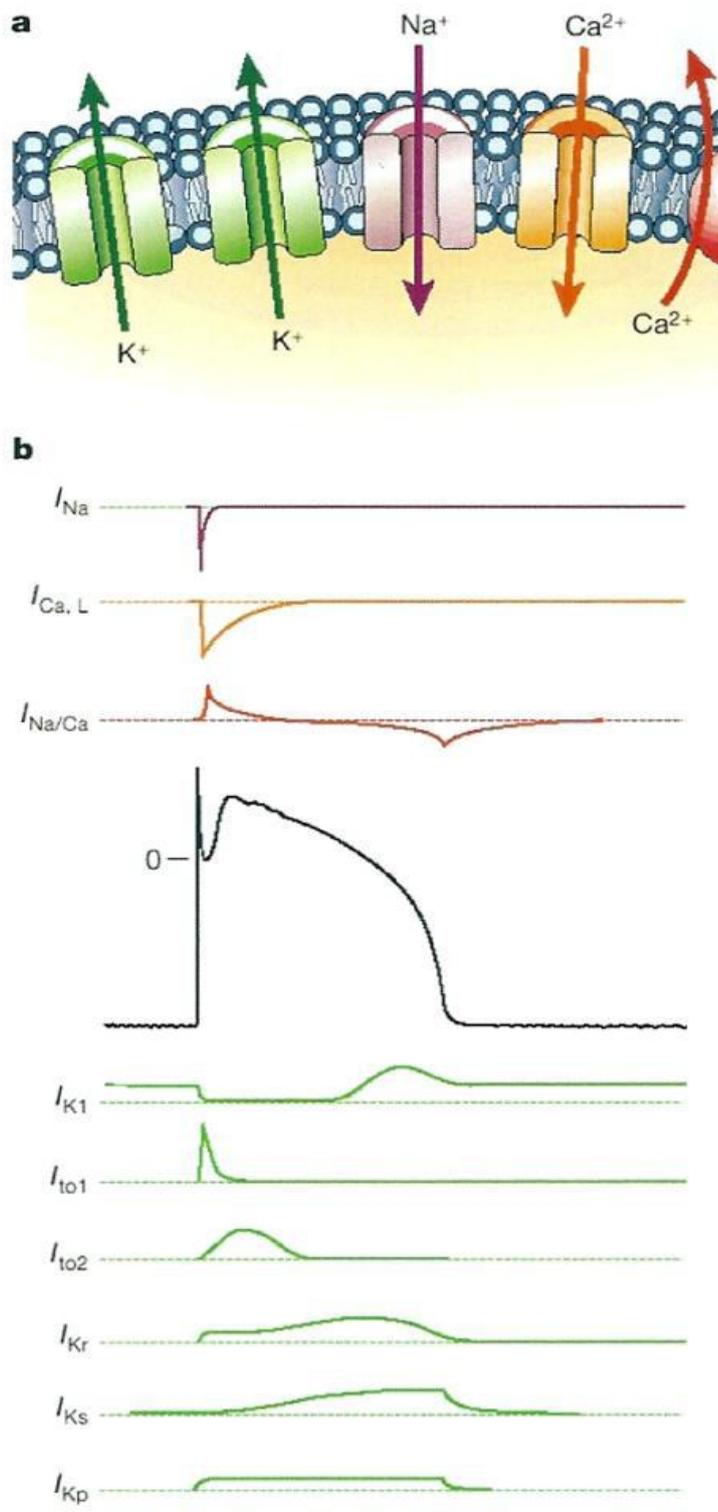


Figura 1.8- Schematizzazione delle correnti (a) e loro andamenti (b) attraverso la membrana cellulare [14]

1.4 PROPAGAZIONE DEL POTENZIALE D' AZIONE

Indipendentemente dal punto in cui sorge, il potenziale d'azione si propaga lungo la membrana, in tutte le direzioni. La velocità di conduzione del potenziale d'azione nelle varie parti del cuore è diverse, e dipende dal diametro delle fibre muscolari e dall'intensità delle correnti depolarizzanti, a loro volta dipendenti dall'ampiezza del potenziale d'azione. L'attivazione sequenziale dagli atri ai ventricoli è assicurata dal fatto che il generatore (pace-maker) primario del cuore è il nodo seno-atriale, dal quale l'eccitazione si propaga attraverso apposite fibre di conduzione. Anche il nodo atrioventricolare è costituito da cellule auto eccitabili, ma la sua frequenza intrinseca è inferiore a quella del nodo seno-atriale, e quindi è quest'ultimo a determinare il ritmo cardiaco. La funzione principale del nodo atrioventricolare non è quindi quella di pacemaker, ma piuttosto quella di permettere il passaggio del potenziale d'azione dall'atrio al ventricolo, rallentandone la propagazione per permettere alla contrazione atriale di completarsi prima dell'attivazione ventricolare.

1.4.1 Segnale Elettrocardiografico (ECG)

Per analizzare la propagazione del potenziale d'azione nel cuore, si può valutare il segnale elettrocardiografico. Il principio su cui si è prettamente fisiologico: l'insorgere degli impulsi nel miocardio porta alla generazione di differenze di potenziale (ddp), che variano nello spazio e nel tempo e che possono essere registrate tramite degli elettrodi. La registrazione della ddp da parte di elettrodi posti sulla superficie corporea avviene grazie alla conducibilità dei liquidi interstiziali del corpo umano. Il tracciato elettrocardiografico rappresenta il metodo più facile, meno dispendioso e più pratico per osservare se l'attività elettrica del cuore è normale oppure se sono presenti patologie di natura meccanica o bioelettrica. Il normale tracciato ECG presenta un aspetto caratteristico costituito da diverse onde, positive e negative, che si ripetono ad ogni ciclo cardiaco e che in presenza di alterazioni dell'attività elettrica del cuore si modificano, rendendone possibile la diagnosi.

A seconda della posizione degli elettrodi, si possono ottenere diverse derivazioni: consideriamo per semplicità la prima, che unisce le due braccia, con l'elettrodo positivo verso il braccio sinistro e quello positivo verso il braccio destro (FIG).

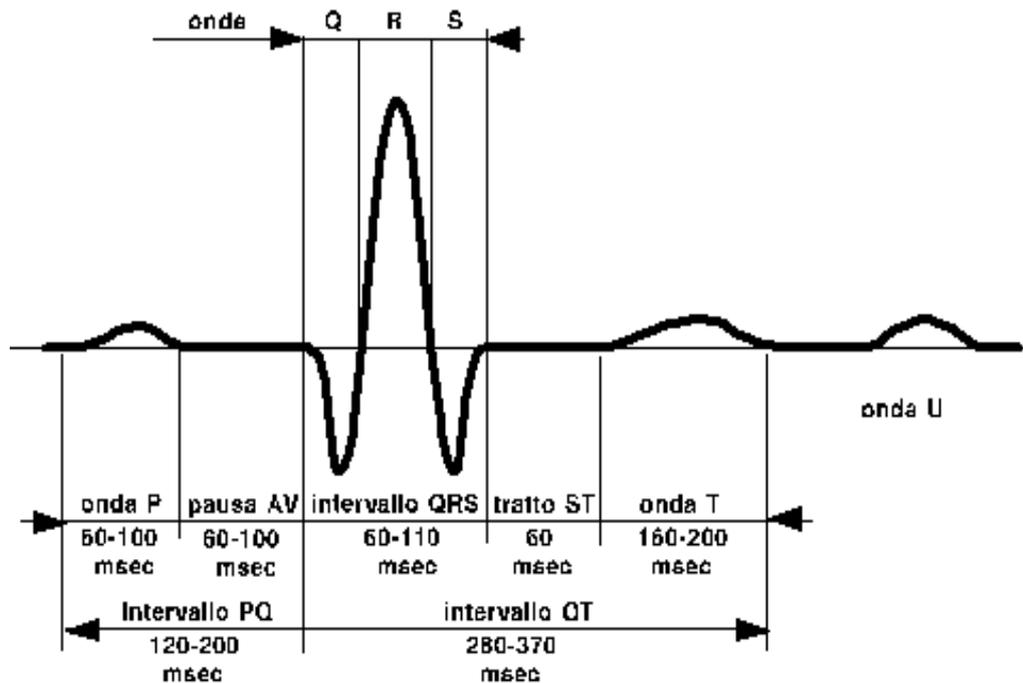


Figura 1.9-Tracciato elettrocardiografico e identificazione dei complessi

Onda P

È la prima onda che si genera nel ciclo, e corrisponde alla depolarizzazione degli atri. È di piccole dimensioni, poiché la contrazione degli atri non è così potente. La sua durata varia tra i 60 e i 120 ms, l'ampiezza è uguale o inferiore ai 2,5 mm.

Complesso QRS

Si tratta di un insieme di tre onde che si susseguono l'una all'altra, e corrisponde alla depolarizzazione dei ventricoli. L'onda Q è negativa e di piccole dimensioni, e corrisponde alla depolarizzazione del setto

interventricolare; la R è un picco molto alto positivo, e corrisponde alla depolarizzazione dell'apice del ventricolo sinistro; la S è un'onda negativa anch'essa di piccole dimensioni, e corrisponde alla depolarizzazione delle regioni basale e posteriore del ventricolo sinistro. La durata dell'intero complesso è compresa tra i 60 e 90 ms. In questo intervallo avviene anche la ripolarizzazione atriale che però non risulta visibile perché mascherata dalla depolarizzazione ventricolare.

Onda T

Rappresenta la ripolarizzazione dei ventricoli. Non sempre è identificabile, perché può avere un'ampiezza anche molto piccola.

Onda U

È un'onda che non sempre è possibile apprezzare in un tracciato, dovuta alla ripolarizzazione dei muscoli papillari.

Tratto ST

Rappresenta il periodo in cui le cellule ventricolari sono tutte depolarizzate e pertanto non sono rilevabili movimenti elettrici. Per questo di solito è isoelettrico, cioè posto sulla linea di base del tracciato, dalla quale si può spostare verso l'alto o il basso di non più di 1 mm.

Intervallo QT

Rappresenta la sistole elettrica, cioè il tempo in cui avviene la depolarizzazione e la ripolarizzazione ventricolare. La sua durata varia al variare della frequenza cardiaca, generalmente si mantiene tra i 350 e i 440ms.

Il tracciato ECG viene compilato su carta millimetrata, che scorre nell'elettrocardiografo ad una velocità di 25 mm al secondo, quindi cinque lati di quadrati da 5 mm rappresentano 1 secondo. È quindi facile immaginare come si possa immediatamente ricavare la frequenza cardiaca, valutando quanto tempo passa tra un ciclo e l'altro (si misura il tempo intercorso tra due picchi R).

1.5 DURATA DEL POTENZIALE D'AZIONE

La durata del potenziale d'azione (Action Potential Duration - APD) delle cellule cardiache non è costante, bensì dipende da numerosi fattori. In particolare, è stato riscontrato in letteratura che all'aumentare della frequenza si ha una riduzione dell'APD, mentre al diminuire della frequenza, e quindi ad un aumento della lunghezza del ciclo cardiaco (CL), corrisponde un aumento di APD. L'esperimento più notevole in questo senso è quello realizzato da Franz et al. [4] nel 1998, uno dei pochi che riporta dati ottenuti su umani. È stato realizzato utilizzando un nuovo metodo di registrazione a lungo termine di potenziali d'azione monofasici in cellule endocardiche del ventricolo. In particolare, sono stati analizzati gli effetti sulla durata dell'APD di tre diverse alterazioni del CL: (1) singolo extrastimolo; (2) brusca accelerazione e decelerazione in frequenza; (3) APD con diverse frequenze, in condizioni stazionarie. In tutti i casi, si è riscontrato un aumento dell'APD al diminuire della frequenza cardiaca (HR), e viceversa. Per quanto riguarda l'esperimento di singolo extrastimolo, la curva di restituzione si presenta crescente all'aumentare dell'intervallo tra stimolo ed extrastimolo, e mostra un andamento bifasico (Fig. 1.10).

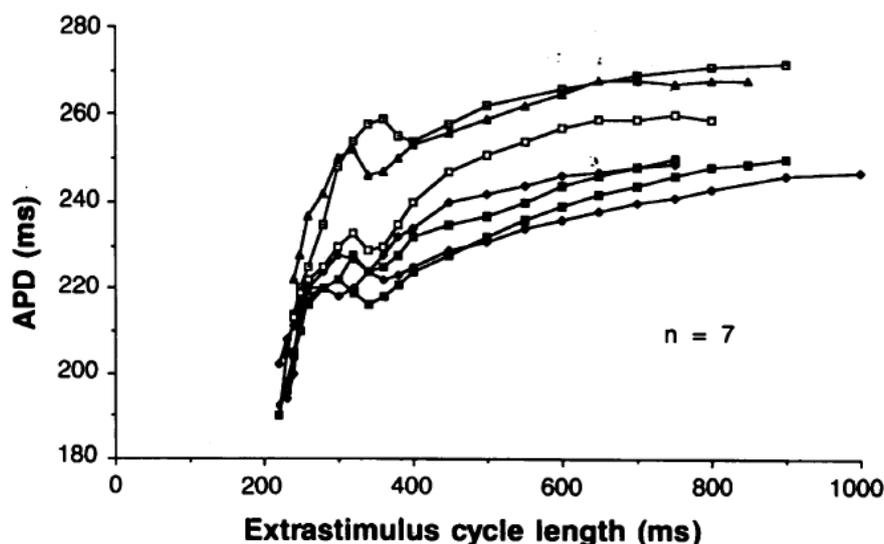


Figura 1.10 - Dati di Franz et al [15] relativi alla risposta al protocollo S1S2 per sette pazienti

Considerando invece le variazioni di APD in risposta ad un gradino di frequenza (Fig 1.10), si vede che la diminuzione avviene in due fasi distinte: si ha un accorciamento rapido, immediato (fast phase) e uno invece più graduale, che arriva a regime nell'arco di alcuni minuti (slow phase).

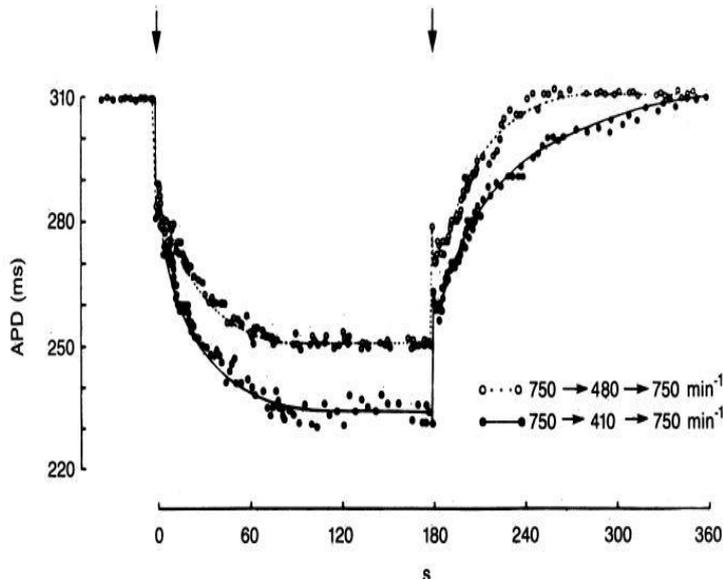


Figura 1.11- Grafico dell'andamento dell'APD nell'esperimento di Franz [4] per il paziente nr 8

Altri dati sperimentali ottenuti sull'uomo, sono quelli di Morgan et al. [27], in cui è stato misurato l'APD a partire da una condizione stazionaria con CL=1000ms e sono stati applicati singoli extrastimoli con intervalli diastolici (DI) variabili fra 50 e 800 ms (Fig 1.12).

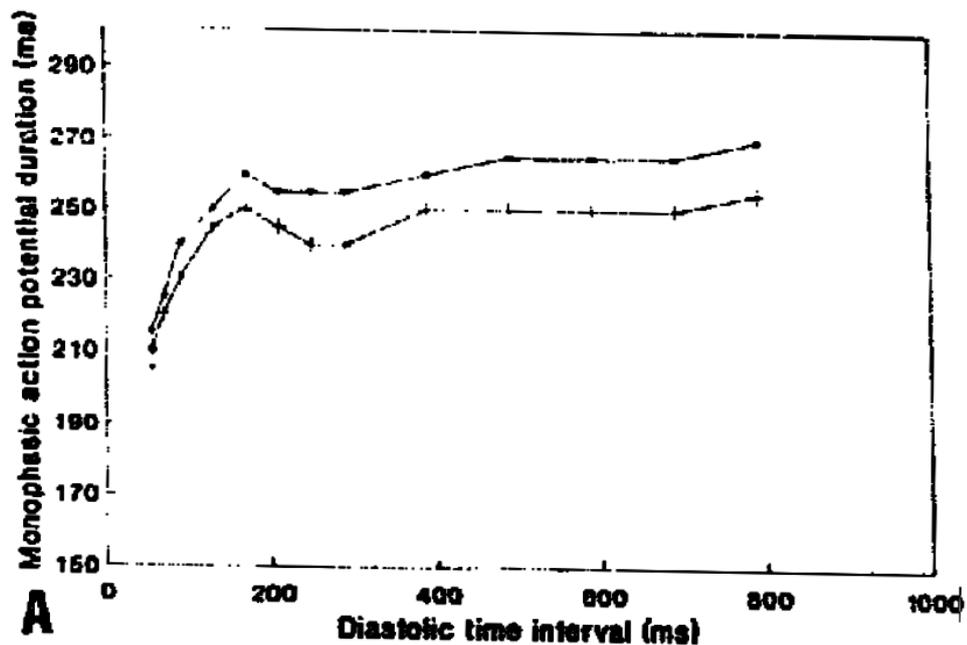


Figura 112- Dati sperimentali di Morgan et al. [27]

Come si può vedere dal confronto tra la Fig.1.10 e la Fig 1.12 la morfologia delle curve è analoga, ma c'è una grande variabilità tra paziente e paziente.

1.5.1 Meccanismi ionici alla base della Fast Phase

In letteratura sono presenti diverse ipotesi per cercare di spiegare i meccanismi ionici alla base del meccanismo dell'adattamento di APD. Per quanto riguarda la fase istantanea, l'accorciamento in risposta ad un aumento di HR è dovuto soprattutto alle modifiche delle variabili di gating di alcune correnti ioniche. In particolare, le correnti di Na^+ e Ca^{2+} non recuperano completamente dall'inattivazione, e quindi risultano più ridotte in ampiezza, mentre le correnti di K^+ tendono ad accumularsi e quindi risultare più elevate [16-17]. Entrambi questi fenomeni portano ad un accorciamento della durata del potenziale d'azione. Inoltre, aumentando la frequenza si ha un mancato recupero di ioni Ca^{2+} all'interno del reticolo sarcoplasmatico (SR), che ne causa un minor

rilascio e di conseguenza reprime lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e contribuisce ulteriormente ad una riduzione del potenziale d'azione [16], [17].

1.5.2 Meccanismi ionici alla base della Slow Phase

Per quanto riguarda la fase lenta, la cause sono riscontrabili in particolare nell'accumulazione di alcune specie ioniche, in particolare K^+ extracellulare e Na^+ intracellulare; quest'ultimo poi, attraverso lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) contribuisce ad un aumento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare.

L'aumento di $[\text{K}]_e$ provoca un aumento delle correnti uscenti di K, con conseguente accorciamento di APD, ma in realtà l'effetto più marcato è quello dovuto al Na^+ . Questo influenza, oltre allo NCX anche la pompa Na^+/K^+ . Gli esatti meccanismi di interazione tra Na^+ , Ca^{2+} , NCX e la pompa Na^+/K^+ non sono però del tutto chiari, a causa anche della scarsità di dati disponibili per l'uomo in questo ambito [16], [17].

1.5.3 Importanza dell'adattamento dell'APD

L'adattamento dell'APD è un processo molto importante, utilizzato come marker della vulnerabilità ventricolare alla fibrillazione: quando si ha un APD troppo corto, così come nel caso opposto, si possono sviluppare aritmie con rischio elevato per la vita del paziente.

CAPITOLO 2

MODELLISTICA DEL POTENZIALE D'AZIONE

Il secondo capitolo serve ad introdurre brevemente le conoscenze di base della modellistica cardiaca, partendo dal modello di potenziale d'azione di Hodgkin-Huxley fino ai più recenti modelli di cellula ventricolare umana.

2.1 INTRODUZIONE ALLA MODELLISTICA CARDIACA

Un'analisi accurata dei meccanismi alla base del potenziale d'azione di un cardiomiocita risulta difficile, considerati i numerosi processi dinamici coinvolti nell'eccitazione cellulare. La modellistica matematica e la simulazione numerica sono strumenti molto potenti che ben si prestano all'analisi del funzionamento a livello di singola cellula: ciò è possibile grazie allo sviluppo di descrizioni matematiche per i singoli componenti cellulari, come canali ionici, pompe e scambiatori. Tali descrizioni sono state sviluppate sulla base di specifici esperimenti, realizzati in modo da isolare e poter quindi caratterizzare una particolare corrente, o compartimento. Facendo interagire in un unico modello le formulazioni matematiche dei vari componenti del sistema, si ottiene quindi un modello integrato di cellula cardiaca. L'utilità di un modello integrato deriva dalla sua proprietà di "trasparenza": infatti, tutte le variabili di interesse come il potenziale di membrana, le concentrazioni e le correnti ioniche possono essere analizzate in fase di simulazione: è possibile "vedere" dentro le cellule e osservare ogni aspetto dei processi simulati, cosa che non è possibile negli approcci sperimentali, dove si riesce tipicamente ad analizzare e caratterizzare un solo processo per volta. Inoltre, nella maggior parte degli esperimenti, l'ambiente in cui si trovano le cellule è leggermente diverso da quello naturale, a causa della presenza di agenti farmacologici, buffer esogeni o soluzioni non fisiologiche.

La modellazione matematica è anche uno strumento importante nell'interpretazione dei dati sperimentali, in quanto può aiutare a chiarire i meccanismi alla base dei fenomeni osservati, spesso di difficile comprensione sulla base della sola osservazione sperimentale. Inoltre, i modelli possono essere utilizzati come strumento per effettuare previsioni quantitative e per guidare il progetto di futuri esperimenti.

È importante, comunque, tener presente che la capacità di previsione di qualsiasi modello è limitata dal fatto che alcuni processi potrebbero essere stati trascurati o descritti in maniera incompleta. Ad esempio, un modello integrato del potenziale d'azione di cardiomiociti rappresenta la sintesi analitica delle conoscenze a disposizione, ottenute dagli esperimenti; l'incapacità di un modello di riprodurre correttamente i fenomeni osservati, quindi, indica la presenza di lacune nella descrizione del sistema. Anche in questo caso, però, il modello potrebbe rivelarsi utile: fornendo indicazioni proprio sulle sue lacune, infatti, fungerà di supporto per nuovi esperimenti, volti ad ottenere nuovi dati per poi aggiornare il modello stesso e fare ulteriori previsioni. Queste interazioni tra esperimenti e simulazioni sono fondamentali per l'aumento delle nostre conoscenze sui meccanismi alla base del potenziale d'azione delle cellule ventricolari

Come semplice esempio si può citare il modello di D. Noble del 1962 [5]: esso propone una descrizione matematica dell'attività elettrica delle cellule delle fibre del Purkinje sulla base del capostipite dei modelli matematici di AP, il modello di assone gigante di calamaro di Hodgkin-Huxley [6-7].

In questo modello sono considerate solo tre correnti: una corrente entrante di Na^+ , una uscente di K^+ e una corrente di leakage, attribuita ad un flusso generico di anioni. Con l'introduzione di alcune modifiche alla formulazione della corrente di Na^+ , Noble riuscì a replicare il plateau caratteristico del potenziale d'azione delle cellule cardiache. Tali modifiche offrirono due possibili interpretazioni: o i canali del sodio erano più numerosi nelle cellule cardiache rispetto alle cellule nervose, oppure dovevano esistere altri canali

veicolanti una corrente entrante. Entrambe le previsioni si sono in seguito rivelate corrette.

2.2 IL MODELLO HODGKIN-HUXLEY

Molte delle conoscenze attuali sulle correnti ioniche nelle cellule eccitabili sono state ottenute con la tecnica del voltage clamp. Questo approccio è stato utilizzato per la prima volta da Hodgkin, Huxley e Katz (1949) [8] e ancora oggi continua ad essere la principale tecnica per lo studio delle correnti ioniche. "Clampare", ovvero "bloccare" il potenziale di membrana ad un valore prefissato consente di caratterizzare quantitativamente la dipendenza dal voltaggio delle proprietà cinetiche delle correnti ioniche, ed è quindi fondamentale per lo sviluppo di modelli matematici delle cellule eccitabili.

Nel 1952 Hodgkin e Huxley (HH) hanno pubblicato sia numerose misure delle correnti di membrana eseguite in voltage clamp sia un modello del potenziale d'azione dell'assone gigante di calamaro. I ricercatori formularono semplici descrizioni quantitative delle correnti di Na^+ e K^+ attraverso la membrana. In Fig 2.1 è riportato l'analogo elettrico della membrana cellulare dell'assone gigante di calamaro.

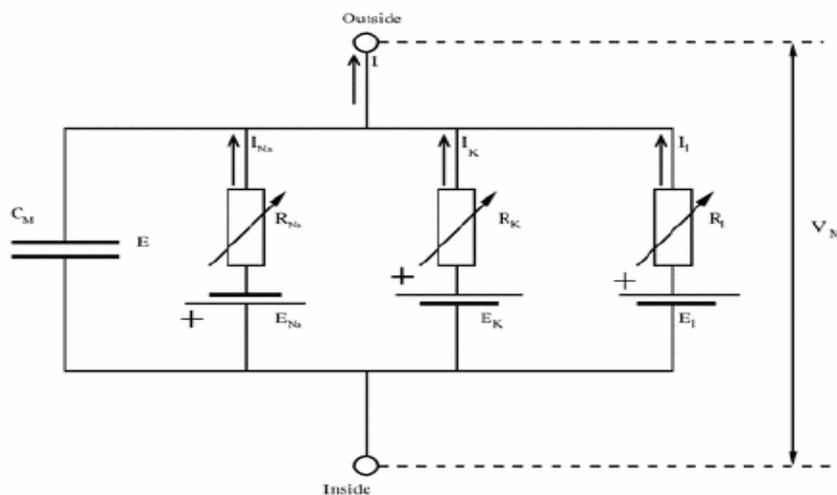


Figura 2.12 – Schematizzazione del modello di HH relativo agli assoni del calamaro gigante

Nel circuito equivalente al modello, il flusso di corrente attraverso la membrana presenta due componenti principali: una associata al caricamento della capacità di membrana (legata all'accumulo degli ioni a ridosso delle sue superfici intra ed extra-cellulari) e l'altra al movimento di specifici tipi di ioni attraverso di essa.

La corrente ionica è suddivisa in 3 componenti distinte; una corrente di sodio (INa), una di potassio (IK), ed una piccola corrente di leakage IL a cui contribuiscono principalmente ioni Cl-. Il comportamento del circuito elettrico equivalente può essere descritto dalla seguente equazione differenziale:

$$C_m \frac{dV_m}{dT} + I_{ion} = I_{ext}$$

Nell'equazione, Cm rappresenta la capacità di membrana, Vm il potenziale di membrana, Iion il flusso di corrente netto attraverso la membrana, e Iext una corrente di stimolo applicata alla cellula durante gli esperimenti in voltage clamp. La corrente totale Iion rappresenta la somma algebrica dei contributi individuali dovuti ai singoli ioni:

$$I_{ion} = \sum_i I_i G_i (V_m - E_m)$$

Ad ogni singola specie ionica sono associati un valore di conduttanza gi ed un potenziale di equilibrio Em. La corrente che ne deriva, quindi, è proporzionale sia alla conduttanza che alla forza elettrica (Vm-Em).

Sulla base dei risultati sperimentali, Hodgkin e Huxley stimarono che la permeabilità di membrana variasse dinamicamente e in modo diverso per ogni ione; definirono quindi delle formulazioni specifiche per le conduttanze corrispondenti a Na⁺ e K⁺. I meccanismi biofisici di base erano allora ancora sconosciuti, ed esistevano varie teorie relative al trasporto intermembrana degli ioni: questo costituisce un ulteriore motivo di merito per i due fisiologi che, tramite una descrizione formale, riuscirono a cogliere una caratteristica fondamentale dell'elettrofisiologia cellulare, ovvero la presenza di canali di trasporto selettivi per specifici ioni, pur senza contemplarne l'esistenza. Il

successo del modello risiede proprio in questa sua potenza espressiva, tanto da renderlo il paradigma per eccellenza per tutti i modelli proposti in seguito. La conduttanza relativa a un particolare tipo di ione (G_i) venne descritta da un'equazione in cui compare, oltre ad un termine relativo alla conduttanza massima (g_i), il prodotto di una serie di termini legati alla permeabilità di membrana allo ione (p_i):

$$G_i = g_i \prod_i p_i$$

Questi termini seguono una cinetica del primo ordine, e possono essere rivisitati alla luce di una interpretazione biofisica (non proposta in questi termini dai due fisiologi), per quanto generica e quindi poco dettagliata. Infatti, partendo dal presupposto che la permeabilità è regolata dalla presenza di canali di membrana selettivi, si può schematizzare la loro struttura assumendo che siano costituiti da più cancelli, o gate, ciascuno dei quali può trovarsi in uno stato aperto o chiuso: il canale corrispondente risulterà aperto quando tutti i gate si troveranno nello stato aperto. La variazione della permeabilità in funzione del potenziale di membrana è compresa all'interno degli elementi p_i ; che assumono valori compresi fra 0 ed 1 e sono passibili di due interpretazioni equivalenti: ragionando sul singolo canale, essi rappresentano la probabilità che hanno i gate di trovarsi nello stato aperto al variare di V_m , mentre $(1-p_i)$ indica la probabilità complementare, ovvero di trovarsi in uno stato chiuso; considerando invece l'insieme dei gate di uno stesso tipo, ciascun p_i indica la frazione di gate di tipo i che si trova in stato permissivo, e $(1-p_i)$ indica la frazione di gate nello stato contrario. L'equazione differenziale che governa ogni singola funzione p_i è la seguente:

$$\frac{dp_i}{dt} = \alpha_i(V)(1 - p_i) - \beta_i(V)(p_i)$$

I termini α_i , β_i , costituiscono i ratei o le velocità di transizione, rispettivamente dallo stato chiuso ad aperto (α_i) e viceversa (β_i). È semplice ricavare l'espressione per il valore a regime $p_i^\infty(V)$ e per la costante di tempo τ_i :

$$p_{i\infty}(V) = \alpha_i \frac{V}{\alpha_i(V) + \beta_i(V)}; \quad \tau_i(V) = \frac{1}{\alpha_i(V) + \beta_i(V)};$$

Sulla base di queste specifiche, la corrente ionica risultante venne descritta da Hodgkin e Huxley come:

$$I_{ion} = g_{Na} m^3 h (V_m - E_{Na}) + g_K n^4 (V_m - E_K) + g_l (V_m - E_l)$$

ove m,h,n sono particolari tipi di gate, che obbediscono alle equazioni sopra indicate per il generico termine pi. Hodgkin ed Huxley cercarono di derivare delle descrizioni matematiche per i gate e per la dipendenza dal potenziale dei ratei ad essi associati in grado di riprodurre quanto più fedelmente possibile i risultati degli esperimenti in voltage-clamp sulle correnti e le conduttanze di membrana. Applicando un particolare protocollo sperimentale, in cui la membrana, a partire da un valore iniziale di potenziale, veniva sottoposta ad una serie di gradini depolarizzanti, ed acquisendo i dati sulla conduttanza per il K^+ ed il Na^+ , Hodgkin ed Huxley furono in grado di determinare il numero di gate ed i ratei associati che meglio riproducevano i dati sperimentali. Il comportamento dei gate è descritto tramite delle equazioni differenziali; pertanto, fissate le condizioni iniziali e nota la conduttanza a regime, la loro dinamica è univocamente determinata.

2.3 I MODELLI MARKOVIANI

Prima di passare in rassegna le tappe più importanti nell'evoluzione della modellistica cellulare cardiaca, è opportuno introdurre brevemente una descrizione della cinetica dei canali ionici alternativa a quella di Hodgkin e Huxley, ovvero quella markoviana. Questi modelli sono nati dall'esigenza di trovare una descrizione matematica più facilmente riconducibile a specifici stati cinetici dei canali, e per compensare l'incapacità del modello HH di riprodurre particolari comportamenti dei canali ionici.

Un esempio rappresentativo riguarda l'inattivazione dei canali per il sodio, che diventa più significativa quando il canale risulta aperto (Armstrong & Bezanilla, 1977; Bezanilla & Armstrong, 1977) [12-13]. Una situazione di questo tipo non è rappresentabile con i parametri di gating di HH, assunti indipendenti tra loro, bensì richiede una classe di modelli in grado di esprimere la dipendenza di una data transizione dall'occupazione di differenti stati del canale. Ad esempio, per poter descrivere il processo di inattivazione del canale rapido per il sodio, un modello deve prendere in considerazione la probabilità che il canale si trovi nello stato aperto.

I modelli di Markov soddisfano questo requisito, essendo basati sull'assunto che le transizioni di stato di un canale dipendano dalla sua presente conformazione, ma non dal suo comportamento precedente (Rudy & Silva 2006) [9]. Tali modelli forniscono un'astrazione delle interazioni molecolari dei canali, dipendenti dal loro stato, in modo da far corrispondere alle transizioni del modello specifiche modificazioni del canale, caratterizzate sperimentalmente. Con l'aiuto di alcuni esempi è possibile chiarire le caratteristiche di questo approccio modellistico. Il caso più semplice corrisponde è quello di un canale che presenti due soli stati: uno aperto (O, open), e uno chiuso (C, closed).

Le corrispondenti equazioni del primo ordine sono:

$$\frac{dC}{dT} = -\alpha C + \beta O; \quad \frac{dO}{dT} = \alpha C - \beta O;$$

dove O e C rappresentano rispettivamente le probabilità che il canale si trovi nello stato aperto o chiuso, α e β indicano i ratei, ovvero le velocità di transizione (ms⁻¹), voltaggio dipendenti, tra i due stati.

La situazione si complica quando, in aggiunta all'attivazione, viene introdotta l'inattivazione, ovvero la tendenza dei canali a chiudersi anche se permane il livello di potenziale che ne aveva causato l'apertura. L'utilizzo degli stati inattivati permette di costruire una corrispondenza fra distinte conformazioni molecolari del canale e particolari stati del modello, cogliendo i meccanismi che si susseguono prima e dopo l'apertura. Si può costruire allora un modello ipotetico a quattro stati (uno chiuso, uno aperto e due inattivati), con due coppie di ratei: quelli diretti (α e β) descrivono il passaggio tra stati in cui il canale è aperto (O) o chiuso (C) e tra i due stati inattivati IO ed IC (Nello schema di Markov in figura 2.2 essi rappresentano transizioni orizzontali); quelli inversi (γ e δ) descrivono il passaggio dagli stati O o C verso i corrispondenti stati inattivati, e viceversa (transizioni verticali).

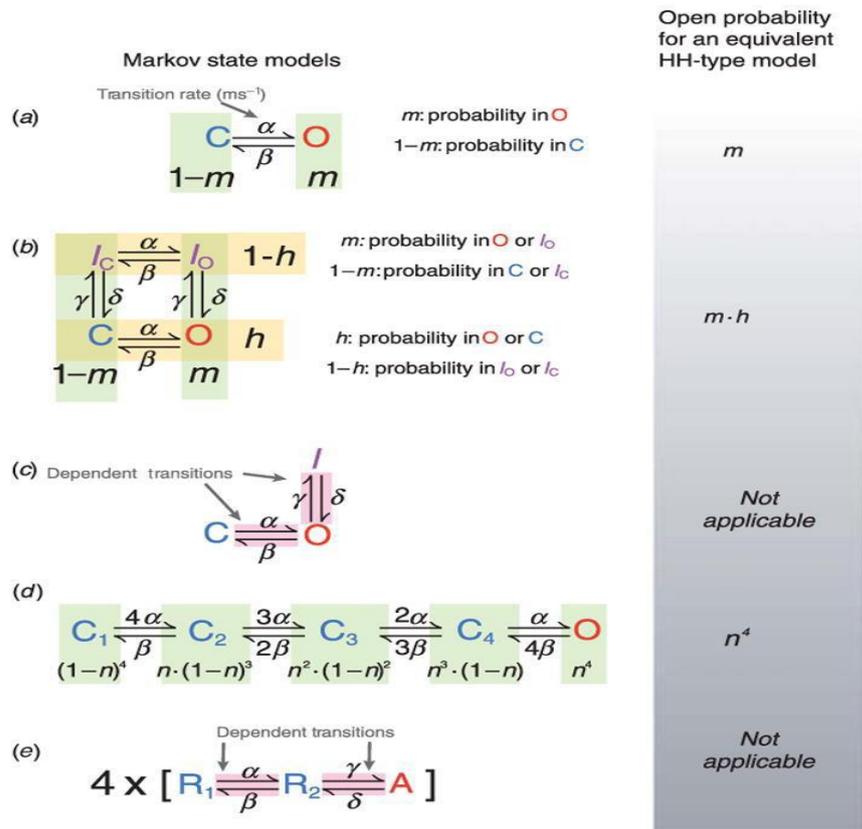


Figura 13.2 Rappresentazione schematica del modello Markoviano a quattro stati, con due stati inattivati

Le equazioni differenziali risultanti sono:

$$\frac{dC}{dt} = -\beta O + \delta I_c - (\alpha + \gamma)C; \quad \frac{dO}{dt} = \alpha C + \delta I_o - (\beta + \gamma)O$$

$$\frac{dI_c}{dt} = \beta I_o + \gamma C - (\alpha + \delta)I_c; \quad \frac{dI_o}{dt} = \alpha I_c + \gamma O - (\beta + \delta)I_o$$

Dal momento che ogni stato rappresenta una conformazione del canale, calcolarne l'occupazione fornisce una interpretazione meccanicistica di come le transizioni del canale stesso governino il suo comportamento e la sua partecipazione al potenziale d'azione. Per esempio, i canali che durante la depolarizzazione si muovono da C ad I_c , e da qui ad I_o non sono capaci di condurre corrente e non contribuiscono all'AP. Al contrario, canali che raggiungono lo stato I_o a partire da O possono condurre corrente ed influire

sull'AP fintanto che occupano lo stato aperto O. Quindi, le formule di Markov possono essere impiegate per correlare la morfologia e le proprietà dell'AP a specifici stati cinetici dei canali ionici ed alle loro transizioni durante differenti fasi dell'AP.

Quando si adottano le formule di Hodgkin-Huxley, l'occupazione di ogni stato non è calcolata esplicitamente. Infatti in questi modelli si assume un'indipendenza fra i gate, ipotesi vantaggiosa dal punto di vista del costo computazionale. Nel modello di Markov le transizioni verticali (da C ad IC e da O ad Io) presentano ratei identici (γ, δ). Ne consegue che l'inattivazione del canale possa essere rappresentata da una singola variabile di gating. Allo stesso modo, i ratei che descrivono le transizioni da Ic ad Io sono identici a quelli per le transizioni da C ad O, e possono essere rappresentati da una singola variabile di gating. I movimenti orizzontali, da C ad O e da Ic ad Io, rappresentano l'attivazione del canale e possono pertanto essere assegnati ad un gate (m) che ne descriva le transizioni. Analogamente, possiamo assegnare ad un secondo gate (h) il processo di inattivazione. Essendo identici i ratei di inattivazione che partono da C o da O, l'inattivazione non dipende da uno di questi due stati. La probabilità che il canale si trovi in C o O vale h, mentre la probabilità che stia in O o in Io vale m. Siccome tali gate sono indipendenti, la probabilità che il canale sia aperto viene calcolata attraverso il loro prodotto ($m \cdot h$), ritrovando per il modello una espressione di HH valida. Di conseguenza, sotto l'ipotesi di indipendenza fra i gate il formalismo di Markov è equivalente a quello di HH. Come già indicato, gli esperimenti hanno dimostrato che i processi di attivazione ed inattivazione dei canali tipicamente non sono indipendenti, ma accoppiati. Una semplice versione di accoppiamento di attivazione ed inattivazione, in un canale ipotetico, viene fornito nella figura 2.2. In questo schema, l'inattivazione del canale può avvenire solo a partire dallo stato aperto, e le transizioni di attivazione ed inattivazione non coinvolgono transizioni indipendenti (come se indicassero il movimento indipendente di diversi sensori di voltaggio, vedi esempio in figura 2.2). Pertanto, le transizioni tra stati sono correlate fra loro, e l'ipotesi di meccanismi di gating indipendenti non sussiste:

non potendo così applicare il modello di HH, ogni stato deve essere descritto individualmente da una equazione differenziale, del tipo:

$$\frac{dC}{dt} = -\alpha C + \beta O \quad \frac{dO}{dt} = \alpha C + \delta I - (\beta + \gamma) O$$

$$\frac{dI}{dt} = \gamma O - \delta I$$

I modelli proposti fino ad ora descrivono attivazioni che dipendono dall'attivazione di un unico gate. Tuttavia dal momento che nella maggior parte dei casi i canali sono tetramerici (formati da 4 parti) è richiesta più di una transizione per attivare il canale, perché deve attivarsi il sensore di voltaggio presente in ogni sub-unità. Un diagramma di stato per un modello di Markov che rappresenti con identiche sub-unità ciascuna delle transizioni dei sensori di voltaggio di un canale tetramerico è rappresentata in figura 2.2d. Ogni stato chiuso rappresenta una permutazione delle posizioni dei sensori del voltaggio. Per esempio, il primo stato chiuso rappresenta la permutazione in cui tutti i quattro sensori si trovano nella posizione di riposo, il secondo quello in cui un sensore di voltaggio è attivato e gli altri tre sono a riposo. Lo stato finale, allora, è quello in cui tutte e quattro le sub-unità presentano sensori di voltaggio nella conformazione attiva.

I ratei riflettono queste permutazioni; ad esempio il rateo che caratterizza il passaggio da C1 a C2 vale 4α , poiché tutti e quattro i sensori di voltaggio si trovano nella posizione di riposo e possono muoversi indipendentemente da una eventuale posizione attivata. Analogamente, il rateo da C1 a C2 vale β perché un solo sensore di voltaggio deve tornare allo stato di riposo. L'occupazione di ogni stato può essere calcolata tramite equazioni differenziali come quelle già mostrate in precedenza. Dal momento che ogni sub-unità è indipendente, l'attivazione del canale può essere rappresentata assegnando un gate a ciascuna di esse, ottenendo così un modello improntato sul formalismo

di HH. Essendo infatti identiche, è possibile rappresentare le sub-unità con gate dello stesso tipo, ai quali assegnare la variabile di gating n . L'indipendenza dei 4 gate determina una probabilità di apertura del canale pari a n^4 .

Dato che sia l'attivazione che l'inattivazione di un canale non sono indipendenti, anche il processo di attivazione può contenere transizioni dipendenti. Un esempio è fornito dal modello proposto per l'attivazione del canale di potassio *Shaker*, volto a riprodurre un ritardo osservato prima dell'attivazione (Zagotta et al. 1994a,b [10-11]). Questo modello rappresenta 4 sub-unità con identici ratei di attivazione, ma ipotizza che ognuna di queste attraversi due conformazioni, R1 ed R2, prima di raggiungere lo stato attivato A. La figura 2.3 presenta un diagramma di stato valido per ciascuna delle quattro sub-unità: come si può vedere, nessuna sub-unità può raggiungere lo stato attivato senza aver prima attraversato uno stato intermedio (R2). Questo modello ipotizza che un sensore del voltaggio presente nelle sub-unità subisca delle transizioni conformazionali, necessarie per tenere conto dell'attivazione ritardata del canale. Silverman e colleghi hanno poi dimostrato sperimentalmente che l'interazione sequenziale fra i residui di arginina nel sensore di voltaggio (S4) ed i residui acidi in S2 (Silverman et al. 2003) [14] corrisponde ad un meccanismo di attivazione a due stati del sensore di voltaggio, come suggerito da Zagotta et al. (1994b) (Fig. 2.3) [11]. Tali esperimenti suggerirono il modello mostrato in figura 2.3a (pannello superiore), che consta di una posizione di riposo (R1), una intermedia (R2) ed una attivata (A). Gli amminoacidi coinvolti nell'interazione sono conservati in molti canali del potassio, avvalorando l'ipotesi che tale meccanismo di attivazione operi anche nei canali cardiaci relativi al potassio. Il modello sopracitato può essere applicato per rappresentare ciascuna sub-unità del canale (Fig. 2.3b), con una transizione finale cooperativa verso lo stato aperto.

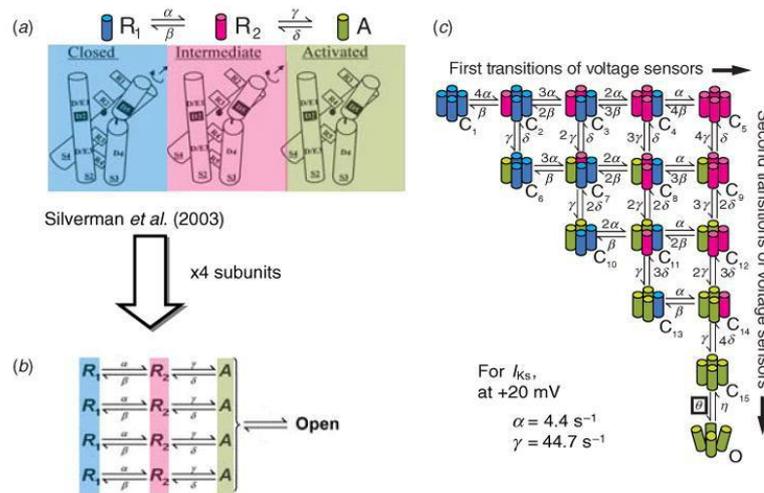


Figura 2.14- Rappresentazione del meccanismo di attivazione a due stati del sensore di voltaggio (Silverman)

Ogni transizione da sinistra a destra rappresenta il movimento di un sensore del voltaggio da R1 alla sua posizione intermedia R2; tali transizioni sono lente. Ogni transizione verticale dall'alto al basso rappresenta lo spostamento di un sensore del potenziale da R2 alla sua posizione attiva A; tali transizioni tipicamente sono veloci. Pertanto, ogni stato chiuso corrisponde ad una conformazione del canale indicata sperimentalmente con un'unica combinazione di posizioni dei sensori di potenziale (ad esempio C3 ha due sensori in R1e due in R2; C7 ha due sensori in R1, uno in R2 ed uno in A; C10 ne ha due in R1e due in A, etc.). I 15 stati chiusi rappresentano tutte le possibili combinazioni. Quando tutti i sensori di potenziale risultano attivati (C15), può scatenarsi una transizione cooperativa che porta allo stato aperto O. Per IKS, l'ultima transizione non dipende dalla tensione. I modelli di Markov calcolano l'occupazione del canale nei suoi vari stati cinetici in funzione della tensione e del tempo (ed eventualmente di altri fattori come ad esempio l'interazione con ligandi). Il canale conduce ioni quando occupa il suo stato aperto (o, in alcuni casi, uno dei molteplici stati aperti). Quindi, la densità di corrente attraverso un insieme di questi canali può essere descritto dalla seguente equazione:

$$I_{ion} = g_{sc,x} n O (V_m - E_m)$$

In cui, per un generico canale X $g_{sc,x}$ è la conduttanza del singolo canale, n è il numero di canali per unità d'area della membrana, O è la probabilità che un canale occupi lo stato aperto, e $(V_m - E_m)$ è la forza elettromotrice data dal gradiente elettrochimico. L'equazione descrive la corrente come il risultato del flusso di ioni che attraversa quella popolazione di canali che si trova nello stato aperto con una probabilità che dipende dal tempo e dalla tensione. Questa formulazione, relativa ad una singola corrente, può essere incorporata in un modello dell'AP. Siccome lo schema rappresenta esplicitamente stati discreti del canale (ovvero aperto, chiuso, inattivato), il modello può essere impiegato per descrivere non solo la corrente macroscopica durante l'AP, ma anche le occupazioni e le transizioni degli stati. Tale approccio fornisce un collegamento meccanicistico tra il potenziale d'azione della cellula e la struttura/funzione dei canali ionici.

2.4 MODELLI DI POTENZIALE D'AZIONE DI SINGOLA CELLULA

Definiamo modello di potenziale d'azione cellulare la rappresentazione matematica del funzionamento del PA, inteso come sviluppo e ampliamento del modello di HH. Questi modelli integrano le informazioni dei modelli markoviani per simulare l'andamento del PA all'interno della cellula. Ogni modello prende informazioni dai precedenti modelli e li implementa migliorandoli, grazie all'apporto di sempre nuovi dati sperimentali disponibili in cellule umane.

Ad esempio, i modelli di Fitzhugh (1960) e Noble (1962) utilizzarono una descrizione delle correnti di Na^+ e K^+ simile a quella proposta da Hodgkin e Huxley per il lungo plateau dell'AP cardiaco nelle fibre di Purkinje (rivisto da Noble, 2001). Modifiche alle cinetiche delle correnti di Na^+ e K^+ sono in grado

di generare un plateau sostenuto dalla corrente di Na^+ verso l'interno. Questi primi modelli potevano quindi riprodurre l'AP, ma non erano in grado di riprodurre proprietà importanti delle cellule cardiache, come ad esempio il flusso entrante di Ca^{2+} ed il rilascio del calcio dal reticolo che non era ancora stato scoperto. Aspetti relativi agli spostamenti di Ca^{2+} intracellulare sono stati introdotti nel modello di cellula di Purkinje di DiFrancesco-Noble (DiFrancesco and Noble, 1985) ed in quello di cellula ventricolare di Luo-Rudy (Luo and Rudy, 1994). Tra gli aspetti innovativi di questi modelli vi furono l'inclusione del compartimento intracellulare relativo al reticolo sarcoplasmatico, la descrizione delle variazioni dinamiche delle concentrazioni ioniche intracellulari ed extracellulari, gli scambiatori e le pompe ioniche. Questi modelli sono in grado di riprodurre l'AP utilizzando una descrizione dettagliata della cinetica delle correnti di membrana; ogni modello è inoltre caratterizzato da un sottosistema relativo al Ca^{2+} .

Modelli di miociti ventricolari basati sulle misure effettuate su cellule cardiache del guinea pig (Jafri *et al.*, 1998) e del cane (Winslow *et al.*, 1999) sviluppati più recentemente cercano di migliorare i modelli precedenti includendo descrizioni dettagliate dei flussi dello ione Ca^{2+} . Tra i modelli sviluppati per investigare le proprietà del rilascio locale di Ca^{2+} sono da citare: Rice *et al.* (1999), Stern *et al.* (1999), Langer e Peskoff (1996), Cannell e Soeller (1997), Soeller e Cannell (1997). Nel 2002 Greenstein e Winslow svilupparono un modello completo di miocita ventricolare basato sulla teoria di un controllo locale del rilascio di Ca^{2+} da parte del reticolo sarcoplasmatico. La disponibilità di dati sperimentali ha portato allo sviluppo di modelli di miociti ventricolari isolati da guinea pig (Luo and Rudy, 1994; Noble *et al.*, 1998), ratto (Pandit *et al.*, 2001), cane (Winslow *et al.*, 1999; Hund and Rudy 2004) e coniglio (Puglisi and Bers, 2001; Shannon *et al.*, 2004).

In particolare, il nuovo modello di ventricolo di cane formulato da Hund e Rudy nel 2004 è simile a quello di Luo and Rudy del ventricolo di guinea pig, ma include due correnti transienti ripolarizzanti (I_{to1} e I_{to2}), una corrente di sodio lenta e una dipendenza di trasportatori e correnti dallo ione Cl^- . La

dinamica del calcio, aggiornata, include la descrizione della proteina kinasi CAMKII e della calmodulina, per investigare i meccanismi ionici sottostanti il transiente di calcio (CaT) e la dipendenza dell'APD dal calcio stesso. Il modello è basato su dati sperimentali ricavati da ventricoli di cane.

Negli ultimi anni sono stati raccolti molti dati relativi alle correnti ioniche in cardiomiociti umani.

Il modello di Priebe-Beuckelmann (1998) e le semplificazioni seguite (Bernus *et al.*, 2002) sono stati i primi modelli di cardiomiocita ventricolare umano. Nel 2004 è stato introdotto un nuovo modello per miociti ventricolari umani da Ten Tusscher *et al.* (Ten Tusscher *et al.*, 2004). Sempre nel 2004 un altro modello di miociti ventricolari umani è stato pubblicato da Iyer *et al.* (2004).

In generale negli ultimi anni, la maggior disponibilità di dati sperimentali sull'uomo ha portato alla caratterizzazione di sempre un maggior numero di modelli di cellula ventricolare umana. In particolare, i tre modelli più recenti, sono il Grandi-Bers del 2010 [1], il Carro-Pueyo [3] e il modello O'Hara Rudy [2] del 2011. Questi modelli verranno visti più nel dettaglio nel prossimo capitolo, tuttavia è opportuno sottolineare il fatto che il problema dell'adattamento della durata del potenziale d'azione è un processo non ancora perfettamente riprodotto da nessuno di questi modelli. Abbiamo quindi scelto di analizzare il comportamento dei tre modelli più recenti in questo ambito, in risposta a diversi protocolli di stimolazione, per cercare di valutarne l'affidabilità rispetto a questo argomento.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

In questo capitolo andremo a descrivere i materiali e metodi utilizzati per le simulazioni numeriche, quindi in particolare le caratteristiche dei modelli matematici utilizzati e la struttura dei file che sono stati sviluppati in Matlab.

3.1 MODELLI MATEMATICI DI INTERESSE

3.1.1 Il modello Grandi-Bers [1]

Il modello Grandi-Bers (**GB**) è uno dei più recenti modelli di cardiomiocita ventricolare umano, sviluppato dal gruppo di lavoro dell'Università di Davis (CA, USA). Tale modello è nato dall'adattamento per l'uomo di un modello di cardiomiocita ventricolare di coniglio, sviluppato dallo stesso gruppo [28], utilizzando nuovi dati sperimentali di cellule cardiache umane.

Gli obiettivi principali di questo modello sono: simulare le basi dell'accoppiamento eccitazione-contrazione, migliorare la ripolarizzazione delle correnti di K^+ e il raggiungimento di un corretto stato stazionario. Il modello contiene più compartimenti, in particolare in quello giunzionale i canali ionici sono molto più sensibili alla concentrazione di Ca^{2+} rispetto a quello citoplasmatico. Inoltre, il modello rende possibile differenziare tra simulazione di cellule epi o endocardiche. Il modello è stato validato con un ampio set di dati sperimentali, in particolare relativamente alle variazioni della durata del potenziale d'azione al variare della frequenza cardiaca: la causa principale dell'APD shortening risulta la variazione di Na intracellulare, che a sua volta influenza lo scambiatore Na/Ca e la pompa Na/K . In generale, quindi, questo modello offre un buon punto di partenza per indagare l'accoppiamento eccitazione-contrazione così come le anomalie della ripolarizzazione a livello di singoli miociti.

3.1.2 Il modello Carro-Pueyo [3]

Il modello Carro-Pueyo (CP) è stato sviluppato nel 2011 a partire dal modello Grandi-Bers, utilizzato come punto di partenza; in particolare, questo modello è stato costruito riformulando due correnti ioniche (I_{Ca} e I_{K1}) e ridefinendo un certo numero di parametri, tra cui la massima conduttanza della I_{Na} (G_{Na}) e la massima conduttanza della I_{Na} K-dipendente (G_{NaK}). Questi cambiamenti sono stati motivati dalle scarse prestazioni mostrate dal modello GB su due particolari aspetti: la forma e la pendenza della curva di restituzione APD90 in risposta al protocollo S1S2, e la risposta dell'APD90 ai bruschi cambiamenti di frequenza cardiaca. Al fine di mantenere il più possibile la coerenza con il modello GB, il modello CRLP è stato sviluppato per lo stesso tipo di cellule del miocardio, cioè endo ed epicardiche. La differenziazione tra i due tipi di cellule sta soprattutto nella definizione della componente fast e slow della I_{to} , così come avviene nel modello GB.

Questo modello è stato validato in una fibra uni-dimensionale, simulando una condizione di iperkalemia, ovvero aumentando la concentrazione di potassio extracellulare. Le modifiche introdotte nel modello sono state guidate da nuovi dati disponibili in letteratura e dall'analisi di alcuni marker di rischio aritmico, quali la durata della ripolarizzazione al 90% dell'APD (APD90), la triangolazione dell'AP, le dinamiche del calcio, e le variazioni di APD in risposta a brusche variazioni di frequenza. Cinque protocolli di stimolazione sono stati applicati al modello GB originale e a quello modificato: i risultati delle simulazioni riproducono abbastanza fedelmente quelli sperimentali, dando quindi validità alle modifiche apportate.

3.1.3 Il modello O'Hara-Rudy [2]

Il modello O'Hara-Rudy (**ORd**) è il risultato di uno studio basato su una grande quantità di nuovi dati sperimentali, ottenuti in cellule cardiache ventricolari umane sane, quindi provenienti da cuori privi di patologie. È stata data una grande importanza alla misura dell'AP per i diversi CL fisiologici, e quindi anche alla dipendenza dell'APD dalla frequenza cardiaca. L'AP simulato riproduce abbastanza bene la morfologia sperimentale dell'AP, così come la dipendenza dalla frequenza. Inoltre, sono stati quantitativamente riprodotti dai modelli i risultati di esperimenti che analizzano la dipendenza della concentrazione di Ca^{2+} e del Na^+ intracellulare sempre dalla frequenza cardiaca. In Fig 3.1 è mostrata una rappresentazione schematica del modello, fornita dagli autori.

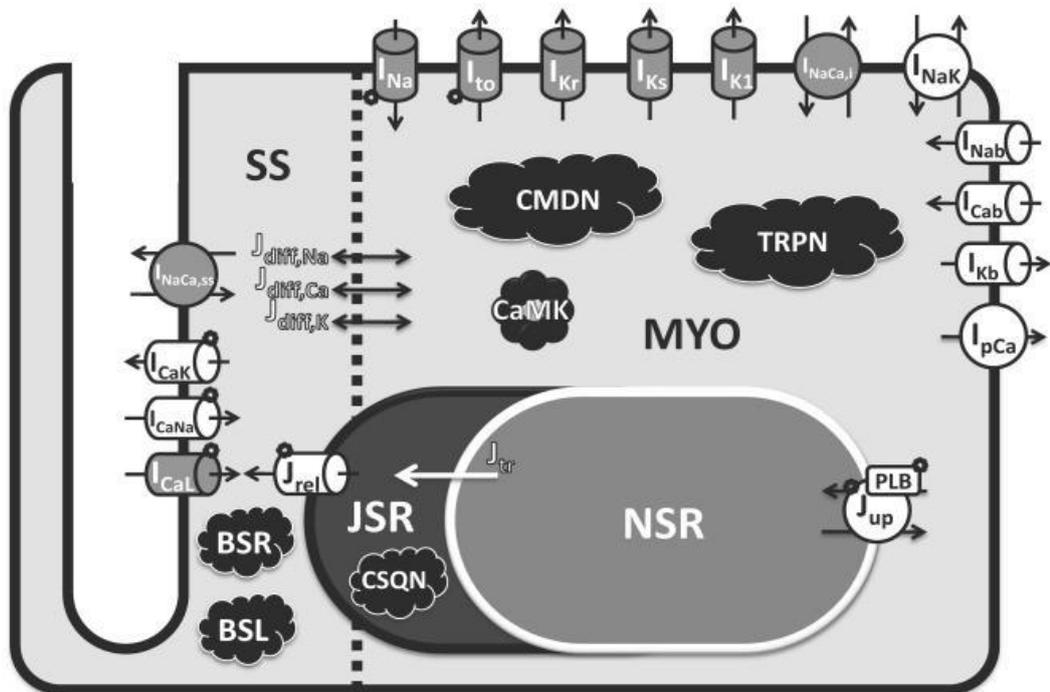


Figura 3.15 – Schematizzazione del modello di miocita ventricolare umano per ORd

Questo modello risulta particolarmente complesso in quanto sono presenti numerose variabili di stato e soprattutto molti parametri, la cui identificazione risulta particolarmente complessa

3.1.4. Confronto dei tre modelli utilizzati

I modelli GB e CP risultano molto simili, sia come struttura sia come morfologia del potenziale d'azione (Fig 3.2-Fig 3.3), in quanto l'uno sviluppato a partire dall'altro. Il modello O'Hara-Rudy, invece, presenta numerose differenze sia nella formulazione delle correnti che nella morfologia del potenziale d'azione.

Nelle figure seguenti, vengono presentati i potenziali d'azione dei tre modelli, con $CL=1000ms$.

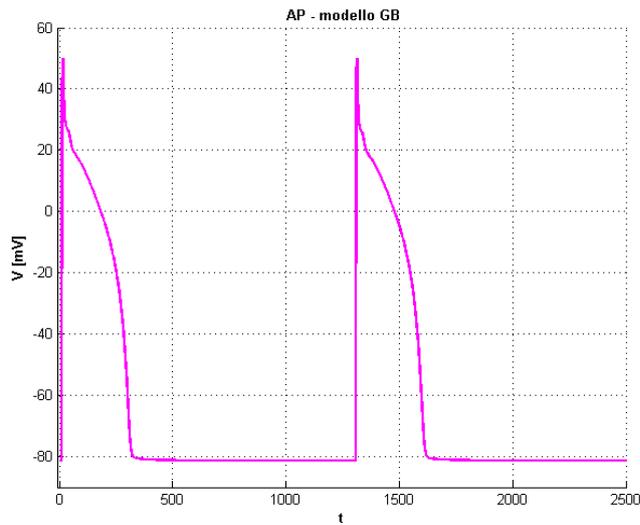


Figura 3.16- Andamento dell'AP per il modello GB

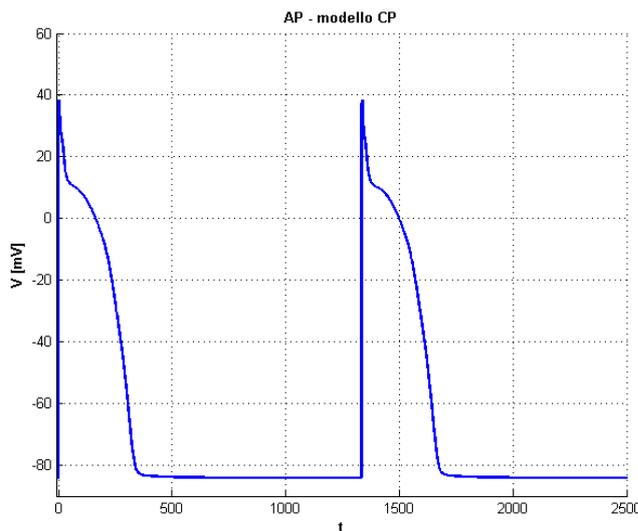


Figura 17.3- Andamento dell'AP per il modello CP

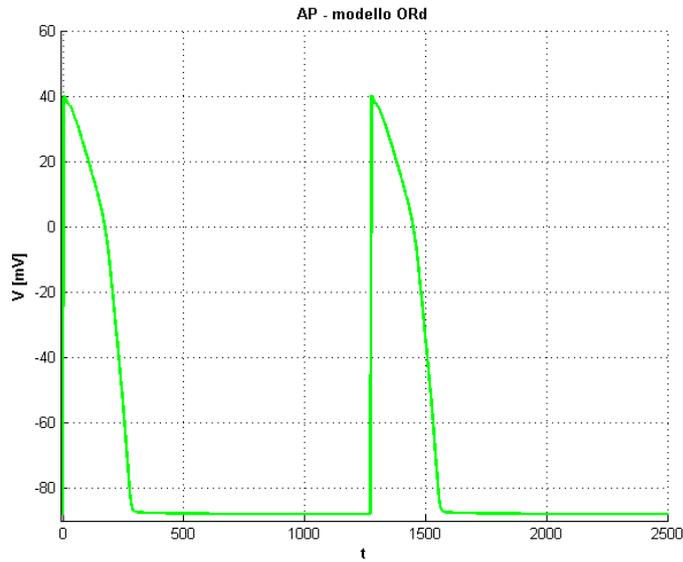


Figura 3.18-Andamento dell'AP per il modello ORd

Dal confronto delle tre figure sopra riportate è evidente come il modello ORd presenti una forma molto particolare per il potenziale d'azione, che non rispecchia la morfologia fisiologica.

Un'altra differenza fondamentale si rileva nella presenza della corrente late del Na^+ (I_{NaL}), che è presente solo nel modello ORd (Fig.3.5).

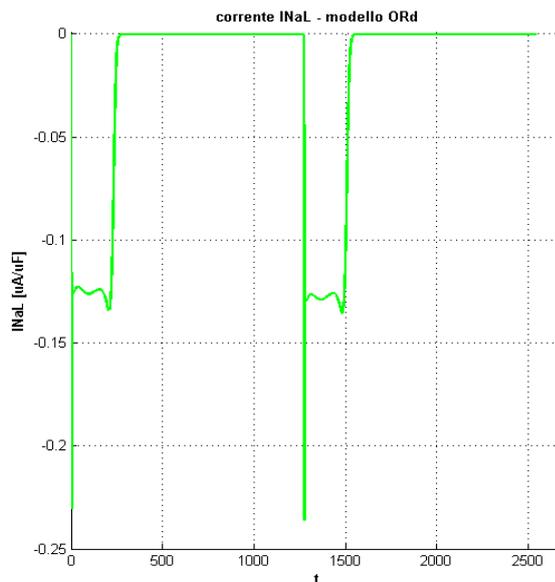


Figura 3.19- Andamento della corrente I_{NaL} nel modello ORd

Inoltre, nel modello ORd la corrente I_{Ks} presenta un'ampiezza notevolmente superiore rispetto agli altri due modelli. Tale caratteristica è stata spiegata dagli autori con la motivazione che tale corrente è stata spesso sottovalutata nei modelli, in quando non erano presenti molte misure su umani, e la sua modifica è quindi rientrata nelle caratteristiche principali del modello ORd (Fig 3.6-3.7-3.8)

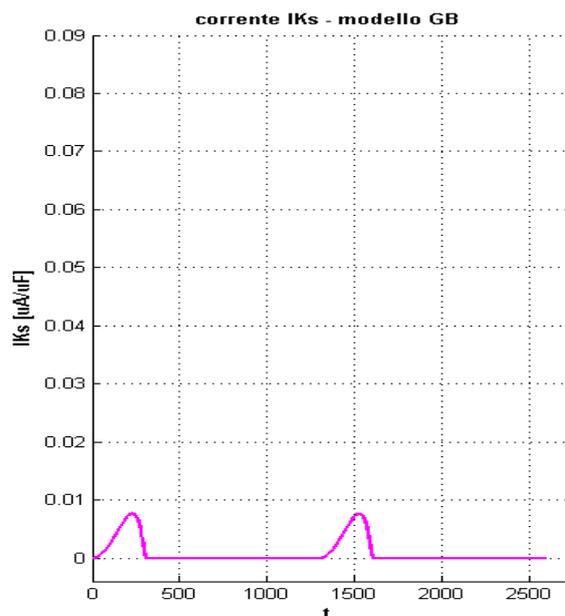


Figura 3.20-Andamento della corrente I_{Ks} nel modello GB

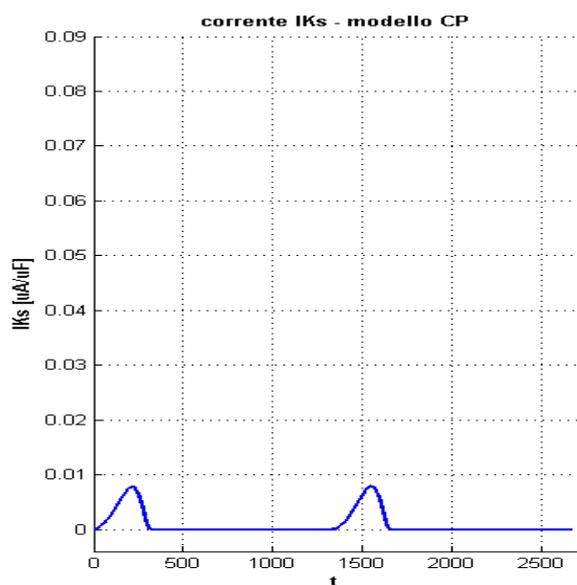


Figura 3.21- Andamento della corrente I_{Ks} nel modello CP

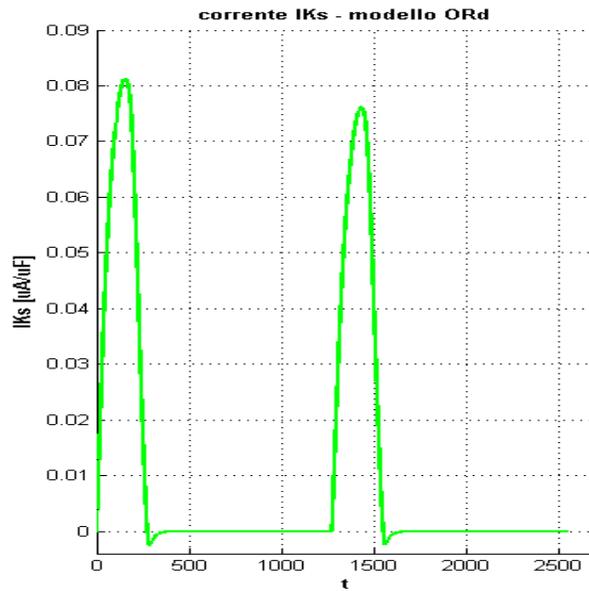


Figura 3.22- Andamento della corrente IKs nel modello ORd

Per quanto riguarda la corrente ICaL, i modelli GB e ORd presentano una morfologia simile, mentre il modello CP si differenzia da entrambi. Ricordiamo che la modifica delle variabili di gating della ICaL è proprio uno dei cambiamenti introdotti nel modello CP rispetto a quello GB. Per quanto riguarda l'ampiezza, invece, il picco della ICaL nel modello ORd risulta leggermente inferiore (Fig 3.9-3.10-3.11).

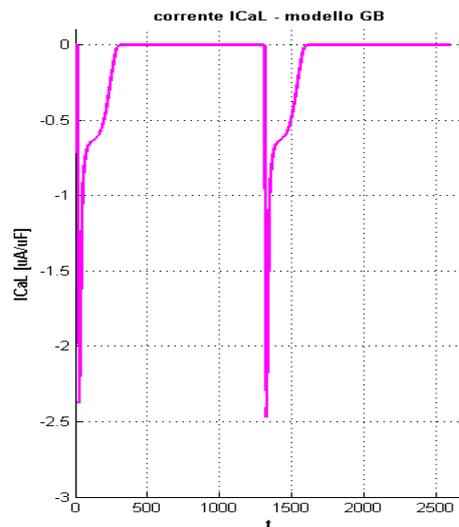


Figura 3.23-Grafico della ICaL nel modello GB

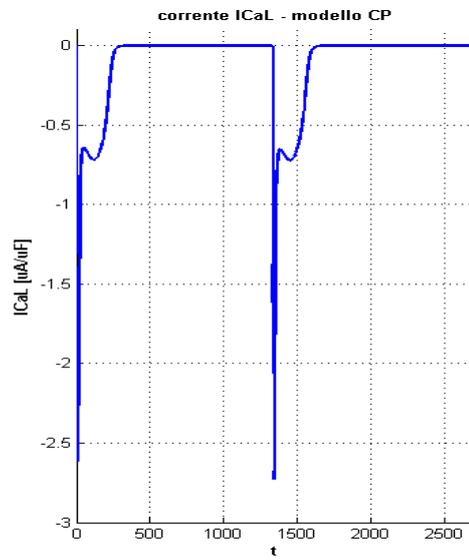


Figura 3.24-Grafico della I_{CaL} nel modello CP

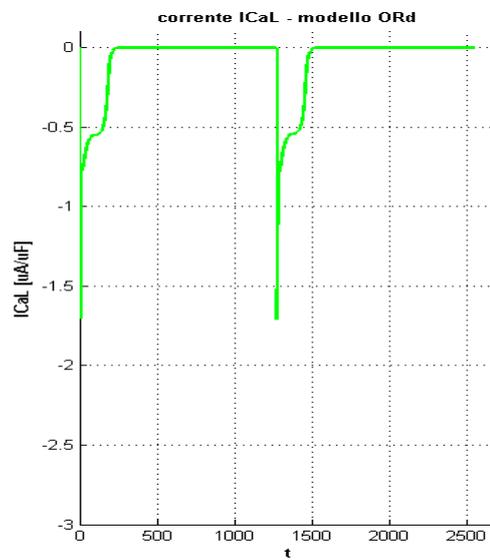


Figura 3.25- Grafico della I_{CaL} nel modello ORd

Infine, anche l'ampiezza della Ito risulta ridotta nel modello ORd, e potrebbe essere proprio la spiegazione del mancato spike iniziale, che porta ad una morfologia poco fisiologica per il potenziale d'azione (Fig 3.12-3.13-3.14).

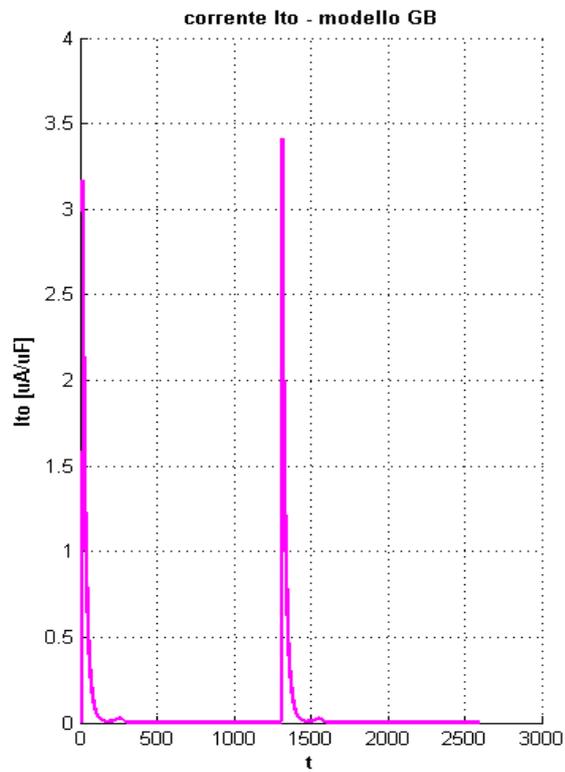


Figura 3.26-Andamento della Ito nel modello GB

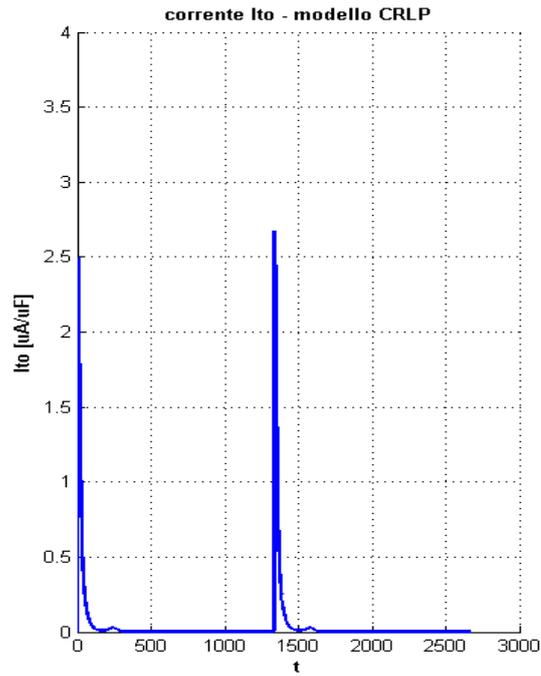


Figura 3.27- Andamento della Ito nel modello CP

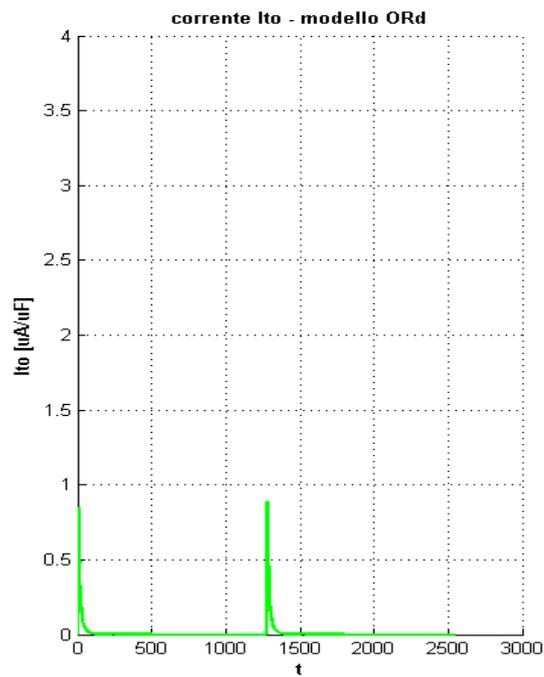


Figura 3.28- Andamento della Ito nel modello Ord

Infine, è importante ricordare che la corrente I_{NaL} , una componente tardiva della corrente del Na^+ , è presente solo nel modello ORd.

3.2 PROTOCOLLI DI STIMOLAZIONE

Per analizzare la risposta dei vari modelli a diverse tipologie di stimoli, variabili in frequenza e durata, sono stati utilizzati due protocolli: il protocollo S1S2 e la riproduzione dell'esperimento di Franz [4]. Questi sono stati applicati per lo studio dell'adattamento di APD a partire da una condizione stazionaria.

3.2.1 Il protocollo S1S2

Il protocollo originale S1S2 è costituito da una ripetizione di un "treno" di 10 stimolazioni di base (S1) con un CL di 1000 ms, seguita da un extra-stimolo (S2) con variabili intervalli diastolici (DI), nel range fisiologico tra 250 e 1000ms. La curva ottenuta tracciando l'andamento dell' APD90 corrispondente all'extra-stimolo rispetto al suo DI, per ciascuno dei valori considerati, viene definita curva di restituzione (APDR). Questo protocollo ha quindi lo scopo di indagare le variazioni istantanee dell'APD al variare delle frequenze. Si può notare infatti come già dal primo stimolo con frequenza modificata l'andamento dell'APD vari visibilmente. Un esempio di protocollo S1S2 è riportato in Fig 3.15.

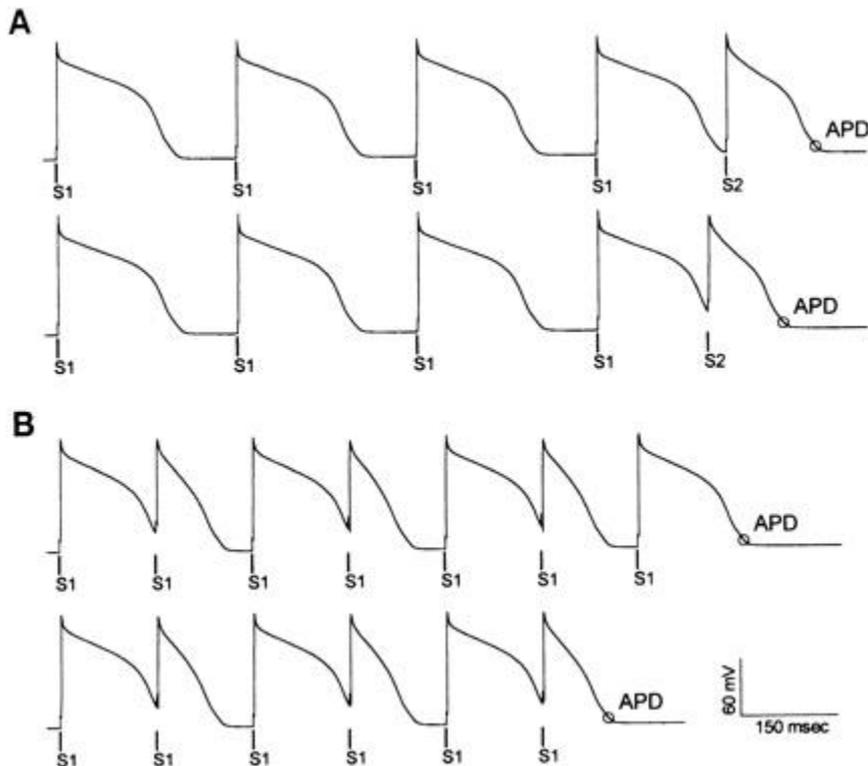


Figura 3.29-Rappresentazione grafica dell'andamento del protocollo S1S2

Prendendo come base questo protocollo, ne è stata sviluppata una piccola variante, per considerare un numero maggiore di DI. Si è scelto di utilizzare in particolare i seguenti valori:

$$DI = [50:50:1000 \ 1100:100:2000]$$

per poter analizzare con una maggiore risoluzione gli intervalli inferiori, dove la variazione di APD risulta più marcata. Per valori più elevati, infatti, l'APDR tende ad un plateau, e le differenze risultano meno significative.

Per ogni DI sono stati simulati 2 battiti a partire dalla condizione dello steady state, e del secondo è stato calcolato l'APD90, ovvero la durata dell'AP per tornare al 90% del valore di regime.

3.2.2 Esperimento di Franz

L'esperimento effettuato da Franz et al. nel 1998 [4], già introdotto al termine del Capitolo 1, consiste nell'applicazione di un doppio gradino di CL decrescente, a partire dalla condizione stazionaria di CL=750ms. Al

raggiungimento del nuovo stazionario, ipotizzato dopo 300 battiti, il valore di CL viene ripristinato al valore iniziale, quindi in pratica si applica un nuovo gradino, questa volta crescente. I due CL considerati sono 480ms e 410ms.

Con questo protocollo è possibile analizzare approfonditamente l'adattamento di APD al variare della frequenza, sia in caso di aumento che di diminuzione. A differenza del protocollo S1S2, non si analizza solo la variazione istantanea (fase rapida), misurabile già dal primo battito, ma anche la variazione più lenta, che impiega alcuni minuti per giungere ad una nuova condizione di equilibrio (slow phase).

3.2.3 Gradino di CL

Oltre alla simulazione dell'esperimento di Franz, si è scelto di utilizzare anche una sua variante, più semplice. In particolare, a partire da una condizione di stato stazionario è stato applicato un brusco decremento di CL, ovvero un aumento di frequenza. Si è scelto di utilizzare il valore più piccolo tra quelli considerati da Franz, ovvero il passaggio da 750 a 410ms. Per semplicità si è considerato solo il gradino decrescente, mantenuto per 300 battiti.

3.3 IMPLEMENTAZIONE IN MATLAB

Nei paragrafi successivi verrà descritta brevemente la struttura dei file matlab, in parte già disponibili e in parte implementati ex novo, che sono stati utilizzati per le simulazioni. Per maggiori dettagli si rimanda al codice completo presente in Appendice A.

3.3.1 Struttura dei modelli matematici

I modelli sopra citati (GB, CP e ORd) sono disponibili come funzioni .m di Matlab, e presentano una struttura analoga. Consideriamo per esempio la struttura del modello GB:

```
function dY = GB_2010(time, Y, flag_ode)
```

Vediamo subito che la funzione richiede 3 ingressi:

- `time`: intervallo temporale di simulazione; di solito si considera un battito alla volta, quindi [0 CL];
- `Y`: vettore contenente i valori iniziali delle variabili di stato
- `flag_ode`: parametro di selezione, che permette di scegliere l'output del modello

Subito dopo l'intestazione è presente una parte introduttiva che fornisce tutte le informazioni sul modello e aiuta quindi i potenziali utilizzatori. Per prima cosa vengono indicati i valori iniziali da utilizzare per le variabili di stato, così come suggerite dagli autori. Inoltre, per ogni variabile vengono definite le unità di misura e il loro significato nel modello (Fig.3.16).

```
% Initial conditions
%-----

% Y = [6.138856e-1, 9.719632e-5, 2.048633e-4, 1.188246e-4, 1.262853, 3.288063e-4

% YNames = {'Ca_SR', 'Ca_i', 'Ca_j', 'Ca_sl', 'Csqn_b', 'CaM', 'Myo_c', 'Myo_m',
% YUnits = {'millimolar', 'millimolar', 'millimolar', 'millimolar', 'millimolar'
% YComponents = {'Calcium_Concentrations', 'Calcium_Concentrations', 'Calcium_Co

%-----

% State variables
%-----

% 1: Ca_SR (millimolar) (in Calcium_Concentrations)
% 2: Ca_i (millimolar) (in Calcium_Concentrations)
% 3: Ca_j (millimolar) (in Calcium_Concentrations)
% 4: Ca_sl (millimolar) (in Calcium_Concentrations)
```

Figura 3.30-Parte di codice riportante condizioni iniziali e variabili di stato del modello

A seguire vengono elencate le variabili di uscita, ovvero quelle che verranno calcolate a partire dalle variabili di stato. Non tutte sono di immediato

interesse, ma anche qui dal nome è facile risalire al loro significato fisico. Inoltre, vengono elencati anche tutti i parametri e le costanti utilizzati nel modello (Fig 3.17)

```

%-----
% Computed variables
%-----

% I_Ca_Bk (picoA_per_picoF) (in Background_Ca_Current)
% I_Ca_Bk_junc (picoA_per_picoF) (in Background_Ca_Current)
% I_Ca_Bk_sl (picoA_per_picoF) (in Background_Ca_Current)
% I_Cl_Bk (picoA_per_picoF) (in Background_Cl_Current)
% I_Na_Bk (picoA_per_picoF) (in Background_Na_Current)
% I_Na_Bk_junc (picoA_per_picoF) (in Background_Na_Current)
% I_Na_Bk_sl (picoA_per_picoF) (in Background_Na_Current)
% I_ClCa (picoA_per_picoF) (in Ca_Activated_Cl_Current)
% I_ClCa_junc (picoA_per_picoF) (in Ca_Activated_Cl_Current)
% I_ClCa_sl (picoA_per_picoF) (in Ca_Activated_Cl_Current)
% B_max_csqn (millimolar) (in Calcium_Concentrations)
% I_Ca_tot_junc (picoA_per_picoF) (in Calcium_Concentrations)
% I_Ca_tot_sl (picoA_per_picoF) (in Calcium_Concentrations)
% J_Ca_B_cytosol (milliM_per_millis) (in Cytosolic_Ca_Buffers)
% I_Na (picoA_per_picoF) (in Fast_Na_Current)
% I_Na_junc (picoA_per_picoF) (in Fast_Na_Current)
% I_Na_sl (picoA_per_picoF) (in Fast_Na_Current)

```

Figura 3.31- Parte di codice contenenti l'elenco delle variabili di uscita

Al termine di questa parte introduttiva, tutti i parametri con valore costante vengono inizializzati, per poi iniziare la parte di computazione vera e propria: per ogni variabile di stato è presente la corrispondente equazione differenziale, mentre per ogni variabile di uscita è presente un'equazione algebrica (Fig. 3.18).

```

dY(6, 1) = k_on_CaM*Y(2)*(B_max_CaM-Y(6))-k_off_CaM*Y(6);
dY(7, 1) = k_on_myosin*Ca*Y(2)*(B_max_myosin-Y(7)-Y(8))-k_off_myosin*Ca*Y(7);
dY(8, 1) = k_on_myosin*Mg*Mg_i*(B_max_myosin-Y(7)-Y(8))-k_off_myosin*Mg*Y(8);
dY(9, 1) = k_on_SR*Y(2)*(B_max_SR-Y(9))-k_off_SR*Y(9);

```

```

I_CaK = ibark*Y(11)*Y(12)*(Fjunc_CaL*(fcaCaj+(1.0-Y(13)))+Fsl_CaL*(fca
I_CaNa_junc = Fjunc_CaL*ibarna_j*Y(11)*Y(12)*(1.0-Y(13)+fcaCaj)*Q10CaL
I_CaNa_sl = Fsl_CaL*ibarna_sl*Y(11)*Y(12)*(1.0-Y(14)+fcaCaMSL)*Q10CaL^
I_CaNa = I_CaNa_junc+I_CaNa_sl;
I_Catot = I_Ca+I_CaK+I_CaNa;

```

Figura 3.32-Parte di codice riportante l'assegnazione delle equazioni differenziali per ogni variabile di stato e delle equazioni algebriche per ogni variabile di uscita

Al termine della computazione, il modello restituisce l'output che è diverso a seconda del valore dell'ingresso `flag_ode`. Nel caso in cui

Quando `flag_ode==1`, in uscita viene restituito il vettore `dY`, contenente tutte le variazioni infinitesime delle variabili di stato. Tale vettore potrà essere utilizzato come nuova condizione di partenza per il battito successivo.

Quando `flag_ode==0`, invece, in uscita viene restituito un vettore di variabili di uscita, a scelta dell'utente in base alle variabili di interesse.

In particolare, per le nostre simulazioni, le variabili di maggiore interesse sono risultate il V di membrana, le principali correnti cardiache (CaL, IKs, IKr, Ito, INCX, INaK) e le concentrazioni di Na^+ e Ca^{2+} nei diversi compartimenti.

3.3.2 Struttura del file “main” per l'esecuzione dei modelli matematici

Per utilizzare i modelli matematici sopra descritti in Matlab, è necessario creare un apposito file `.m`, che al suo interno richiami la funzione del modello. In particolare, tale file “main” servono per indicare il valore iniziale delle variabili di stato del modello, stabilire CL e numero di battiti, e provvedere quindi ad integrare la funzione del modello per ogni battito, utilizzando la OdeSuite di Matlab. Si utilizza un ciclo `for` per simulare di seguito tutti i battiti necessari, e al termine di ogni battito l'ultimo valore delle variabili di stato diventa il valore iniziale del battito successivo (Fig 3.19)

```

for n = 1:beats
    [time X]=ode15s(@GB_2010,[0 CL],X0,options,1);
    % ad ogni battito le condizioni iniziali diventano le condizioni finali del battito precedente
    X0 = X(end,:);

    fprintf('Beat n°%d of %d\n',n,beats)    % runtime progress
end

```

Figura 3.33-Codice utilizzato per la simulazione dei battiti

Al termine dell'elaborazione, i dati ottenuti possono essere poi salvati o rappresentati graficamente, in base alle esigenze. Se necessario, si potrà nuovamente richiamare il modello con `flag_ode==0` per avere accesso anche alle variabili di uscita scelte, invece delle sole variabili di stato.

3.3.3 File “main” per calcolare lo stato stazionario

Per portare tutti i modelli in uno stato stazionario si è utilizzato un CL fisso e si sono simulati 1000 battiti (Fig 3.20). Il file “main” è stato quindi modificato per effettuare tale simulazione, e il vettore dei valori delle variabili di stato ottenute al termine di questi battiti è stato memorizzato per poter poi essere utilizzato come punto di partenza delle elaborazioni future.

```
%% CL and Beats

CL = 1000;      % pacing cycle length in ms
beats = 1000;   % number of beats in the simulation

%% Simulazione

options=odeset('MaxStep',1);      % options for ode solver

for n = 1:beats
    [time X]=ode15s(@GB_2010,[0 CL],X0,options,1);
    % ad ogni battito le condizioni iniziali diventano le condizioni finali del battito precedente
    X0 = X(end,:);

    fprintf('Beat n°%d of %d\n',n,beats) % runtime progress
end
```

Figura 3.34-Parte del main utilizzato per il calcolo dello Steady State

Lo stato stazionario è stato utilizzato per due valori di CL, in particolare CL=1000ms come preparazione al protocollo S1S2 e CL=750ms come preparazione al protocollo di Franz.

3.3.3 Realizzazione del protocollo S1S2

Il protocollo S1S2 è stato applicato a partire dalle condizioni stazionarie ottenute per CL=1000ms. Dopo il caricamento dei dati, è stato necessario ricollegare i DI da utilizzare nel protocollo con i corrispondenti CL, da utilizzare in fase di integrazione del modello. Per fare questo prima si è

calcolato per ogni modello il valore di APD90 stazionario, e si è poi sommato tale valore al vettore dei DI scelto (Fig. 3.21)

```
% Diastolic Interval
%DI = 100:50:2000;
DI = [50:50:1000 1100:100:2000];
n = length(DI);
% Pacing CL
CL_GB = DI + APD90_GB;
CL_CRLP = DI + APD90_CRLP;
CL_ORd = DI + APD90_ORd;
```

Figura 3.35-Ridefinizione dei CL in funzione dei valori di ADP90 nei tre modelli

Per poter memorizzare i dati in un'unica matrice si è scelto di definire una massima lunghezza per il vettore dei tempi, pari a 2500. Ad ogni integrazione, dal momento che i metodi OdeSuite utilizzano un passo variabile, il numero di intervalli temporali risulterà diverso, ma è stato verificato che non supera mai tale valore. Sono state quindi inizializzate le tre matrici per il salvataggio delle variabili di stato: si tratta di matrici 3D in cui nella prima dimensione abbiamo il tempo e le variabili di stato di interesse, nella seconda dimensione abbiamo l'andamento temporale di tali variabili, e nella terza dimensione i valori corrispondenti a diversi CL (Fig 3.22).

Per ogni DI sono stati simulati due battiti: il primo, però, partirà dalla condizione stazionaria e quindi, per poter capire cosa succede all'APD quando il DI si accorcia, sarà necessario analizzare il secondo dei due battiti. Al termine della simulazione viene calcolato e memorizzato anche il valore dell'APD90, utilizzando un'apposita funzione realizzata in matlab (Fig 3.23)

```

tmax = 2500;
beats = 2;
n_var = 9;

%% Matrici per il salvataggio dei dati

% 1a dim: asse dei tempi
% 2a dim: variabili di stato/di uscita
% 1a colonna -> t
% 2a colonna -> V
% 3a colonna -> ICaL
% 4a colonna -> [Ca]i
% 5a colonna -> [Ca]j o [Ca]ss
% 6a colonna -> [Ca]sl o INaL
% 7a colonna -> IKs
% 8a colonna -> Ito
% 9a colonna -> Incx
% 3a dim: CL
% 4a dim: beats
|
M_1=zeros(tmax,n_var,n,beats);
M_2=zeros(tmax,n_var,n,beats);
M_3=zeros(tmax,n_var,n,beats);

```

Figura 3.36-Codice per inizializzare matrici di zeri utilizzate per il salvataggio dati

```

#####
% II Battito %
#####
% Condizioni finali del I Battito
XGB=XGB(end,:);
XCRLP=XCRLP(end,:);
XORd=XORd(end,:);

[t_1 XGB] = ode15s(@GB_2010,[0 CL_GB(j)],XGB,options,1);
[t_2 XCRLP] = ode15s(@CRLP_2011,[0 CL_CRLP(j)],XCRLP,options,1);
[t_3 XORd] = ode15s(@ORD_2011,[0 CL_ORD(j)],XORd,options,1);

l1 = length(t_1); l2 = length(t_2); l3 = length(t_3);

% Calcolo APD90
APD_1(j,2) = calcoloAPD90(t_1(1:l1),XGB(1:l1,39));
APD_2(j,2) = calcoloAPD90(t_2(1:l2),XCRLP(1:l2,39));
APD_3(j,2) = calcoloAPD90(t_3(1:l3),XORd(1:l3,1));

```

Figura 3.37-Codice per il calcolo dell'APD90 al termine della simulazione dei battiti

I dati ottenuti dalla simulazione del protocollo S1S2 vengono visualizzati graficamente da un altro file .m, che permette di analizzare la curva di restituzione così come le variazioni che la variazione di CL ha sulle variabile di interesse memorizzate, come le principali correnti e concentrazioni.

3.3.5 Realizzazione del protocollo di Franz

Per riprodurre il protocollo di Franz è stato modificato il file main per riprodurre un gradino di frequenza, prima crescente poi decrescente.

Sono stati simulati per ogni valore di CL 300 battiti, e tutti i dati sono stati memorizzati per poter poi essere elaborati in seguito. Si è scelto di utilizzare sempre matrici 3D per poter salvare l'andamento temporale di tutte le variabili di stato in ogni battito.

```
113 -
114 - for n = 1:beats_ss
115 -
116 -     [time_1 X_1] = odel5s(@GB_2010,[0 CL],X0_1s,options,1);
117 -     [time_2 X_2] = odel5s(@CRLP_2011,[0 CL],X0_2s,options,1);
118 -     [time_3 X_3] = odel5s(@ORD_2011,[0 CL],X0_3s,options,1);
119 -
120 -     % ad ogni battito le condizioni iniziali diventano le condizioni finali del battito precedente
121 -     X0_1s=X_1(end,:);          X0_2s=X_2(end,:);          X0_3s=X_3(end,:);
122 -
123 -     ltime_1a(n) = length(time_1);      ltime_2a(n) = length(time_2);      ltime_3a(n) = length(time_3);
124 -     ltime_1b(n) = length(time_1);      ltime_2b(n) = length(time_2);      ltime_3b(n) = length(time_3);
125 -
126 -     adaptation_1a(1:ltime_1a(n),1,n)=time_1;      adaptation_1a(1:ltime_1a(n),2:end,n)=X_1;
127 -     adaptation_2a(1:ltime_2a(n),1,n)=time_2;      adaptation_2a(1:ltime_2a(n),2:end,n)=X_2;
128 -     adaptation_3a(1:ltime_3a(n),1,n)=time_3;      adaptation_3a(1:ltime_3a(n),2:end,n)=X_3;
129 -     adaptation_1b(1:ltime_1b(n),1,n)=time_1;      adaptation_1b(1:ltime_1b(n),2:end,n)=X_1;
130 -     adaptation_2b(1:ltime_2b(n),1,n)=time_2;      adaptation_2b(1:ltime_2b(n),2:end,n)=X_2;
131 -     adaptation_3b(1:ltime_3b(n),1,n)=time_3;      adaptation_3b(1:ltime_3b(n),2:end,n)=X_3;
132 -
133 -     fprintf('Beat n%d of %d\n',n,beats_ss)      % runtime progress
134 -
135 - end
136 -
```

Figura 3.38- Parte del codice del file main per la riproduzione del gradino di frequenza

3.3.6 Ripristino di selezionate variabili di stato

Per cercare di separare gli effetti delle singole variabili di stato in merito alle variazioni di APD dopo un brusco cambiamento di frequenza, si è reso necessario ripristinare il loro valore a quello di steady state, subito dopo la variazione di CL. Questo è stato fatto modificando sia il protocollo S1S2 che quello di Franz, e grafitando i diversi risultati ottenuti.

Nel caso del protocollo S1S2, il ripristino è stato fatto tra il primo e il secondo battito, mentre nel protocollo di Franz il ripristino è stato fatto per tutti i battiti successivi al gradino di CL applicato. In appendice A è riportato il completo di uno dei file di ripristino per tipo di protocollo.

3.3.7 Calcolo dell'APD90

Questa breve funzione è stata realizzata per calcolare a partire dai vettori V e t il valore APD90, ovvero la durata temporale tra l'istante di massima pendenza e l'istante necessario per raggiungere il 90% della ripolarizzazione (Fig 3.25).

```
function APD90=calcoloAPD90(t,V)

% Ricerca del punto di Massima Pendenza
|
differenza = V(2:end)-V(1:end-1);
[~, i_start] = max(differenza);

M=max(V);
% Valore iniziale del potenziale -> minimo:
m=V(1);

% Calcolo del valore di soglia e relativo indice
durata=90;
Vsoglia=m+(1-durata/100)*M;
i_end=find(V>=Vsoglia,1,'last');

APD_start=t(i_start);
APD_end=t(i_end);

APD90 = APD_end - APD_start;

end
```

Figura 3.39-Codice relativo alla function utilizzata per il calcolo dell'APD90

CAPITOLO 4

RISULTATI

In questo capitolo andremo a descrivere e visualizzare i risultati ottenuti applicando i protocolli introdotti nel precedente capitolo ai modelli considerati, ovvero GB, CP e ORd.

4.1 RISULTATI PRELIMINARI

Come prima cosa è stato riprodotto nei tre modelli l'esperimento di Franz, per poter confrontare la risposta della simulazione con i risultati sperimentali disponibili (Fig 4.1).

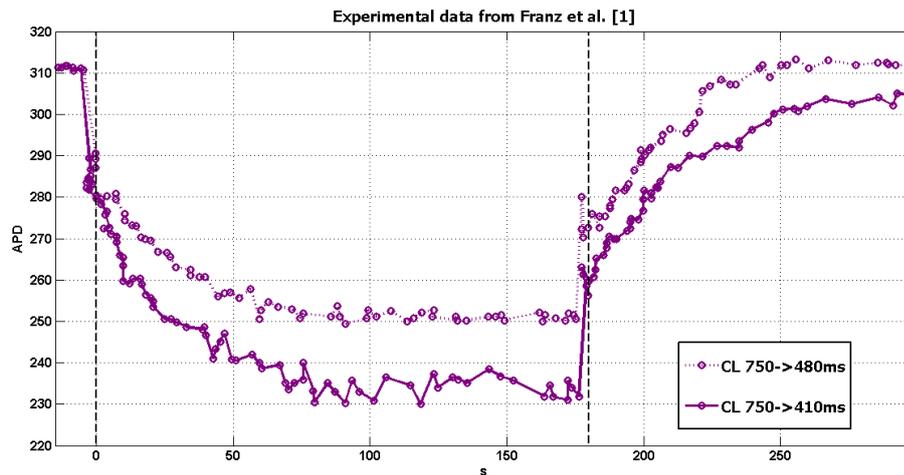


Figura4.1-Dati sperimentali di Franz et al. [15]

Per quanto riguarda il modello GB, emerge subito l'assenza della fase rapida di adattamento, ovvero del gradino iniziale nella durata dell'AP. Al contrario, i primi AP dopo il cambio di CL risultano leggermente prolungati. La fase lenta, invece, presenta un andamento molto simile a quello sperimentale (Fig 4.2). I modelli CP e ORd, invece, presentano una corretta fase di adattamento rapida, ma una diversa morfologia per quanto riguarda la fase lenta (Fig 4.3 e Fig 4.4).

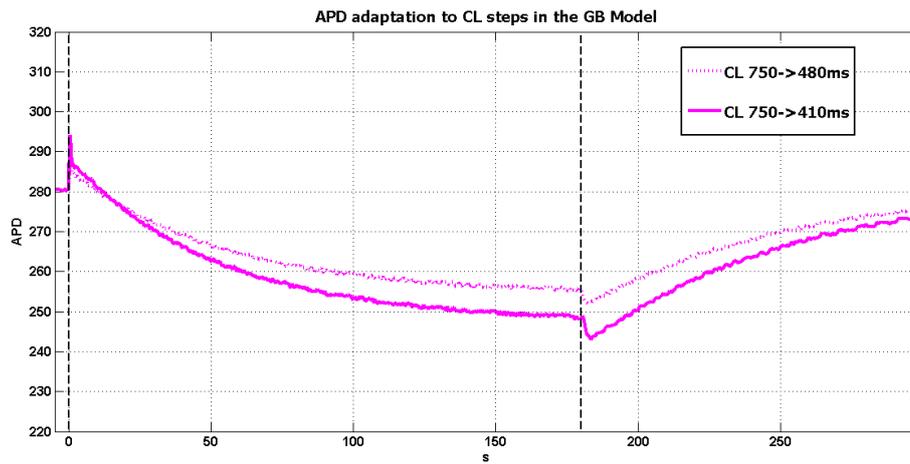


Figura 4.2- Riproduzione del protocollo di Franz con il modello GB

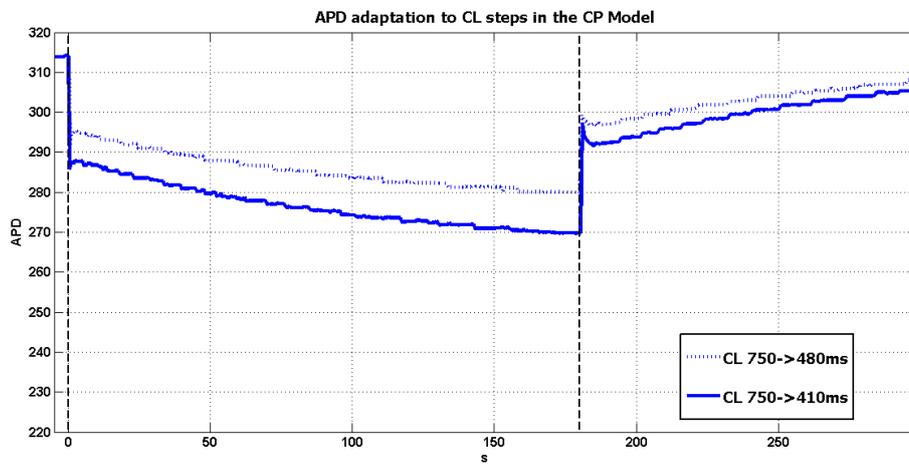


Figura 4.40- Riproduzione del protocollo di Franz con il modello CP

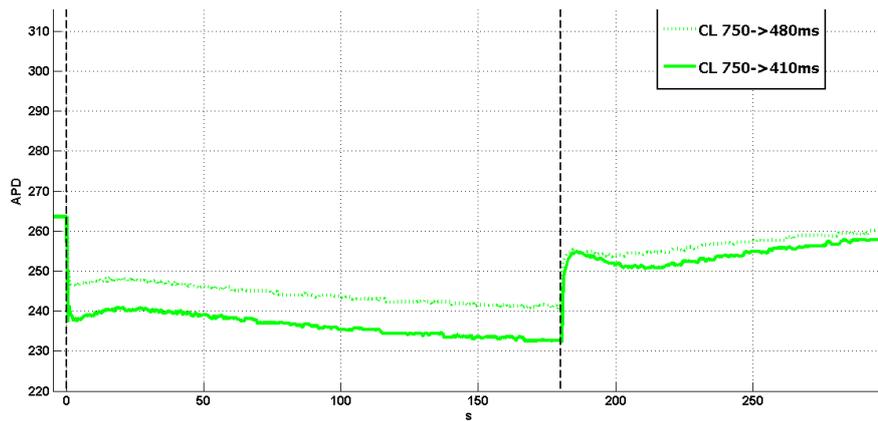


Figura 4.4- Riproduzione del protocollo di Franz con il modello ORd

4.2 PROTOCOLLO S1S2

L'esecuzione del protocollo S1S2 ha sostanzialmente confermato quello che era già visibile dall'esperimento di Franz in merito alla fase rapida, ovvero nel caso del modello GB il grafico risulta praticamente piatto, con un leggero comportamento non fisiologico iniziale (Fig 4.5), mentre per i modelli CP e ORd l'andamento è quello fisiologico, ovvero una curva con una maggiore pendenza iniziale, che tende ad un plateau per DI più elevati (Fig 4.6 e Fig 4.7)

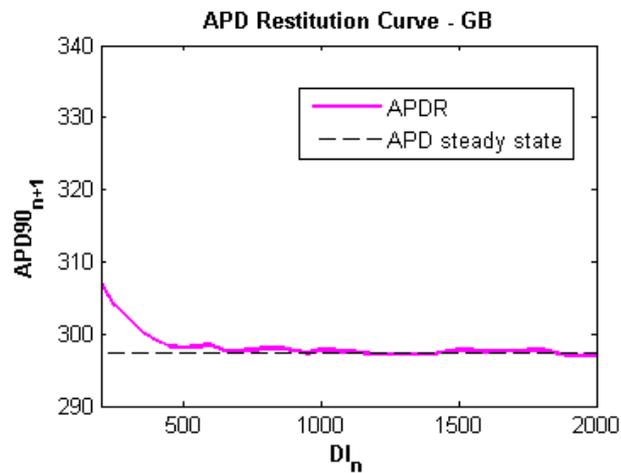


Figura 4.5-Andamento dell'APD90 nell'esecuzione del protocollo S1S2 per il modello GB

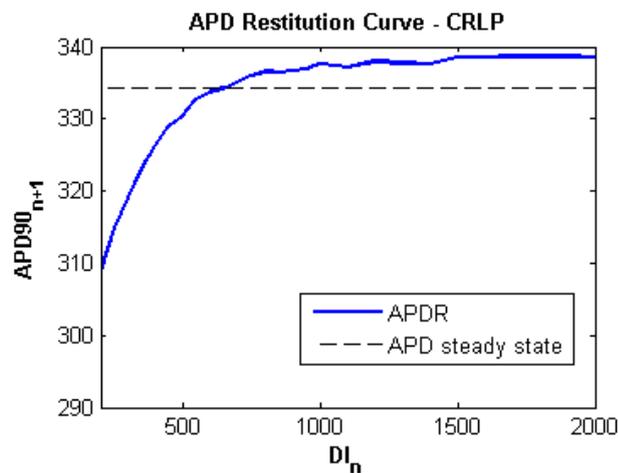


Figura 4.6- Andamento dell'APD90 nell'esecuzione del protocollo S1S2 per il modello CP

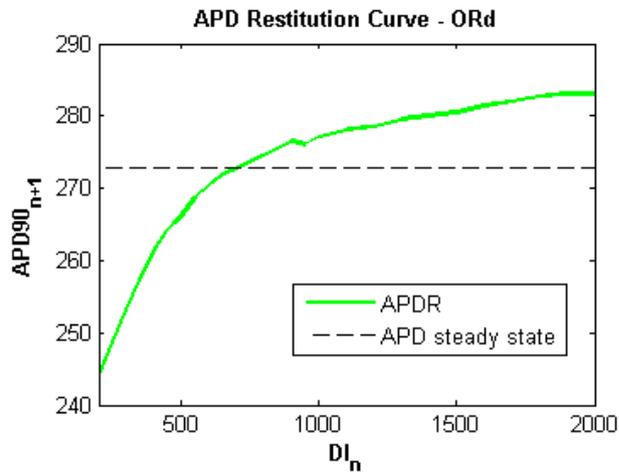


Figura 4.7-Andamento dell'APD90 nel protocollo S1S2 per il modello ORd

I dati ottenuti dal protocollo S1S2 applicato ai tre modelli sono stati confrontati con quelli dell'esperimento di Morgan [27], come rappresentato in Fig. 4.8.

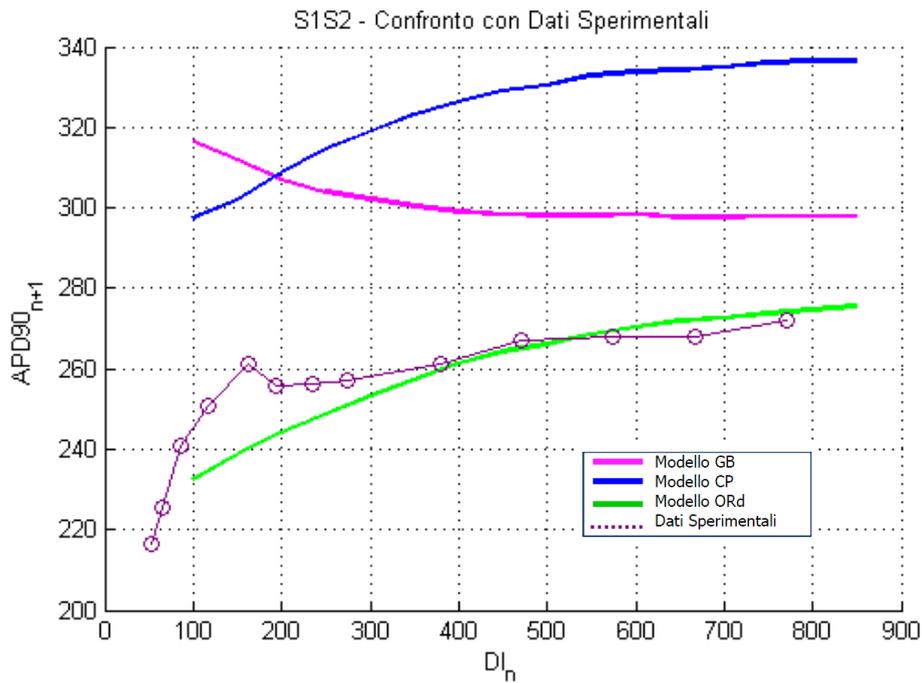


Figura 4.8- Confronto del protocollo S1S2 con i dati sperimentali di Morgan et al. [27]

Il modello ORd è quello che più si avvicina ai dati sperimentali, mentre il modello CP presenta una morfologia simile, ma risulta traslato verso un APD medio maggiore. Questa variazione però non è del tutto significativa, perché in generale si hanno notevoli variazioni nell'APD basale da paziente a paziente, come già mostrato in Fig.1.10. Il modello GB, oltre ad essere traslato, presenta un andamento contrario a quello sperimentale, come atteso in base ai risultati già ottenuti applicando il gradino di frequenza. È importante sottolineare però che nessuno dei modelli, riproduce l'andamento bifasico dei dati sperimentali.

4.3 ANALISI DELLA FASE RAPIDA

Per indagare i meccanismi ionici responsabili della APDR, quindi in particolare della fase rapida dell'adattamento dell'AP, abbiamo ripristinato alcune delle variabili di stato al loro valore in stato stazionario, cercando così di separare i singoli effetti che ognuna di esse ha sulla durata del potenziale d'azione, subito dopo il cambio di frequenza. Inizialmente sono state considerate le variabili suggerite in letteratura come quelle più probabilmente implicate in questo fenomeno (elencate nel Capitolo 1), ma in seguito è stata fatta un'analisi più approfondita per riuscire a determinare se altre variabili fino a quel momento non considerate potevano comunque avere un'influenza. L'idea era quella di trovare un denominatore comune tra i vari modelli, ma quello che in realtà si è osservato con le simulazioni, è che ogni modello si comporta in modo molto diverso dagli altri, e i meccanismi ionici alla base dell'adattamento sono molto differenti per ogni modello.

4.3.1 Fase rapida nel modello Grandi-Bers

Nel modello GB, l'andamento non fisiologico della fase rapida in risposta a variazioni di CL, sembra dipendere principalmente da un incompleto recupero dall'inattivazione dei recettori rianodinici (RyRs), ovvero canali ionici del Ca^{2+} situati a livello del reticolo sarcoplasmatico. È presente anche un contributo dovuto alle variabili di gating (gv) delle correnti Ito e INa, ma il loro effetto sull'adattamento è minore.

Nelle due figure seguenti sono mostrati i grafici ottenuti dalle simulazioni per il modello. La linea più spessa rappresenta la curva originale, mentre le linee più sottili si riferiscono al ripristino selettivo di alcune variabili di stato, così come indicato nella legenda corrispondente. La linea nera rappresenta il ripristino di tutte le variabili di stato indicate, e infatti corrisponde ad una situazione in cui la fase rapida è stata completamente eliminata. Vengono mostrati sia la risposta al protocollo S1S2 (Fig 4.8) che la risposta al gradino di CL (Fig 4.9).

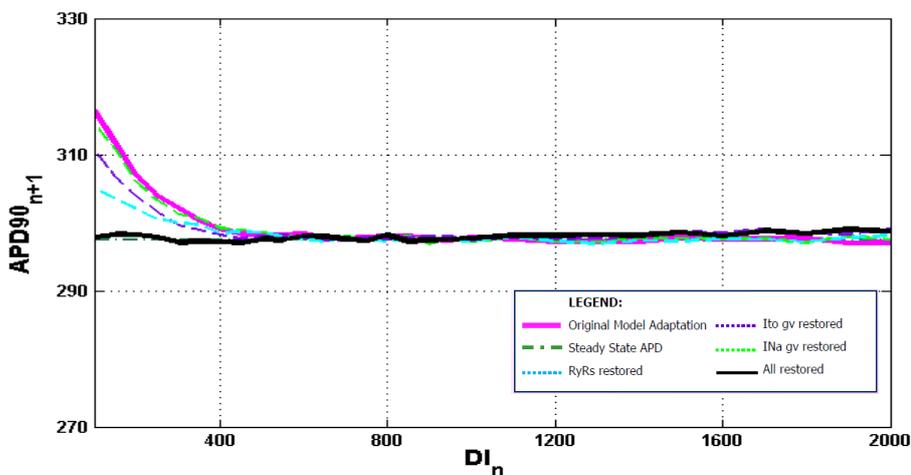


Figura 4.8- Risposte in fase rapida al protocollo S1S2 del modello di GB con ripristino di alcune variabili di stato

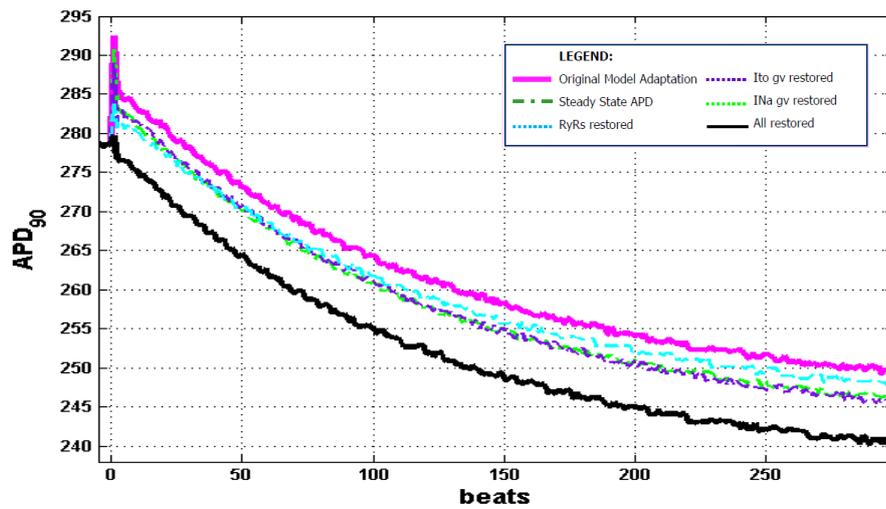


Figura 4.9- Risposte in fase rapida al gradino del modello di GB con ripristino di alcune variabili di stato

Per quantificare i singoli contributi, si è scelto di valutare la variazione percentuale di APD sul primo battito (Fig 4.10), indotta dal ripristino di una singola variabile di stato, rispetto alla simulazione del modello originale. I risultati sono mostrati nell'istogramma di Fig 4.11.

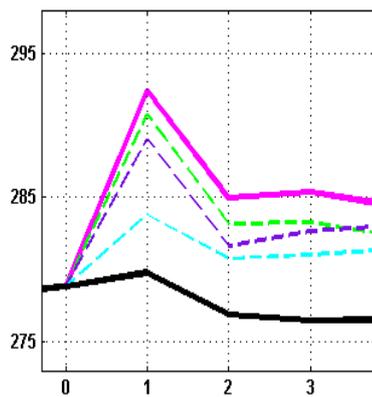


Figura 4.10- Variazione percentuale di APD sul primo battito per il modello GB

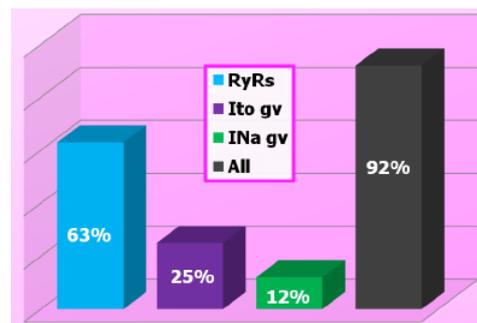


Figura 4.11- Istogramma delle percentuali di incidenza di alcune variabili di stato sull'andamento della fase rapida per il modello GB

4.3.2 Fase rapida nel modello Carro-Pueyo

Nel modello CP, la fase rapida dipende quasi completamente dal mancato recupero dall'inattivazione delle variabili di gating della corrente I_{CaL} , e in minor parte dall'accumulo della I_{Kr} . Proprio la formulazione della I_{CaL} , infatti, è stata oggetto di modifiche da parte degli autori di questo modello, rispetto a quello GB.

Tuttavia, quando si ripristinano queste variabili al valore che hanno in stato stazionario, l'APDR presenta un andamento non fisiologico, simile a quello del modello GB. Anche in questo caso, tale andamento è dovuto ai RyRs, oltre che alle variabili di gating delle correnti Ito e I_{Na} .

Nelle due figure seguenti sono mostrati i grafici ottenuti dalle simulazioni per il modello. La linea più spessa rappresenta la curva originale, mentre le linee più sottili si riferiscono al ripristino selettivo di alcune variabili di stato, così come indicato nella legenda corrispondente. La linea nera rappresenta il ripristino di tutte le variabili di stato indicate, e infatti corrisponde ad una situazione in cui la fase rapida è stata completamente eliminata. Vengono mostrati sia la risposta al protocollo S1S2 (Fig 4.12) che la risposta al gradino di CL (Fig.4.13).

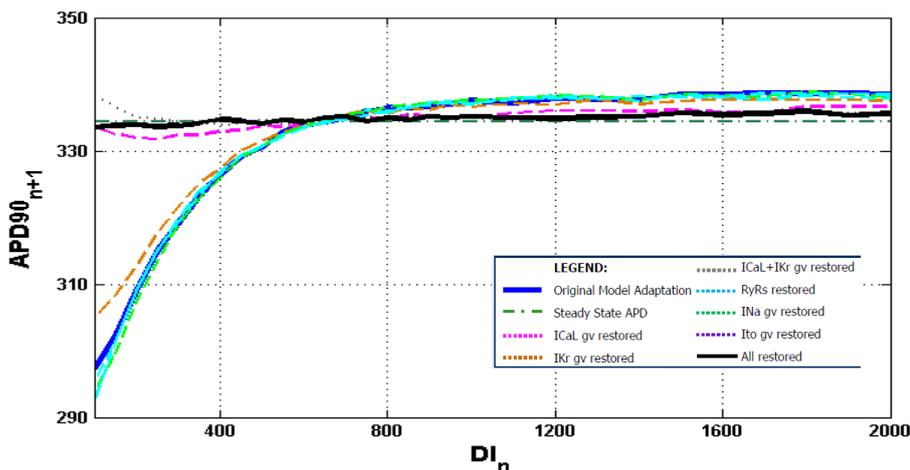


Figura 4.12-Risposte del modello CP in fase rapida al protocollo S1S2 con ripristino di alcune variabili di stato

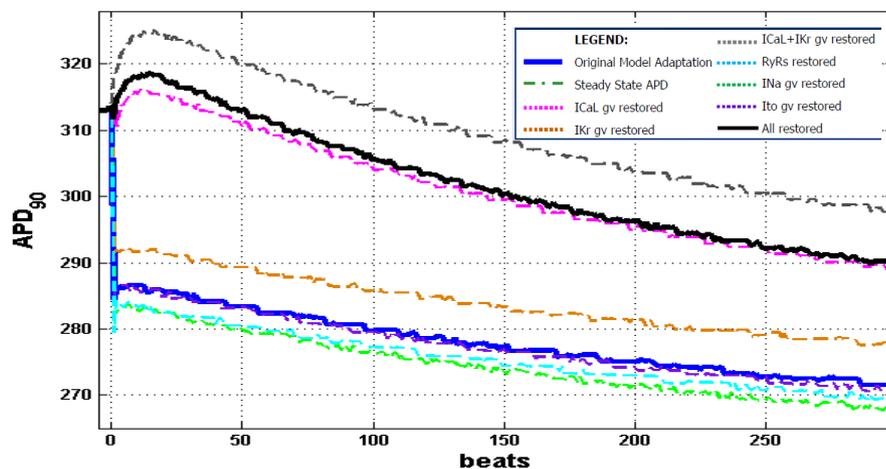


Figura 4.13 -Risposte al gradino del modello di CP con ripristino di alcune variabili di stato

Per quantificare i singoli contributi, si è scelto di valutare la variazione percentuale di APD sul primo battito (Fig 4.14), indotta dal ripristino di una singola variabile di stato, rispetto alla simulazione del modello originale. I risultati sono mostrati nell'isogramma di Fig 4.15.

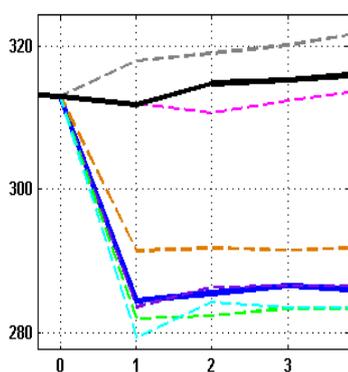


Figura 4.14- Variazione percentuale di APD sul primo battito per il modello CP

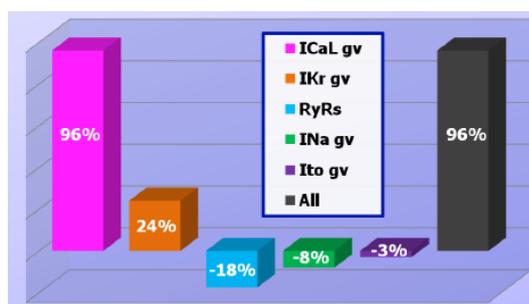


Figura 4.15- Istogramma con le percentuali di incidenza di alcune variabili di stato sull'andamento della fase rapida per il modello CP

4.3.3 Fase rapida nel modello O'Hara-Rudy

Nel modello ORd, la fase rapida è dovuta principalmente alla diminuzione della concentrazione di Ca^{2+} all'interno del reticolo sarcoplasmatico, che si traduce in un minor rilascio di Ca^{2+} dal reticolo stesso, e di conseguenza in un ridotto funzionamento dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$: questo causa una riduzione della durata dell'AP. Una volta ripristinata questa concentrazione, la parte rimanente della fase rapida è causata dalle variabili di gating di diverse correnti, in particolare l' I_{NaL} e l' I_{CaL} , anche se si evidenziano contributi della I_{Ks} e della I_{to} . Ricordiamo che la corrente I_{NaL} è presente solo in questo modello, e non in GB e CP.

Nelle due figure seguenti sono mostrati i grafici ottenuti dalle simulazioni per il modello. La linea più spessa rappresenta la curva originale, mentre le linee più sottili si riferiscono al ripristino selettivo di alcune variabili di stato, così come indicato nella legenda corrispondente. La linea nera rappresenta il ripristino di tutte le variabili di stato indicate, e infatti corrisponde ad una situazione in cui la fase rapida è stata completamente eliminata. Vengono mostrati sia la risposta al protocollo S1S2 (Fig 4.16) che la risposta al gradino di CL (Fig 4.17).

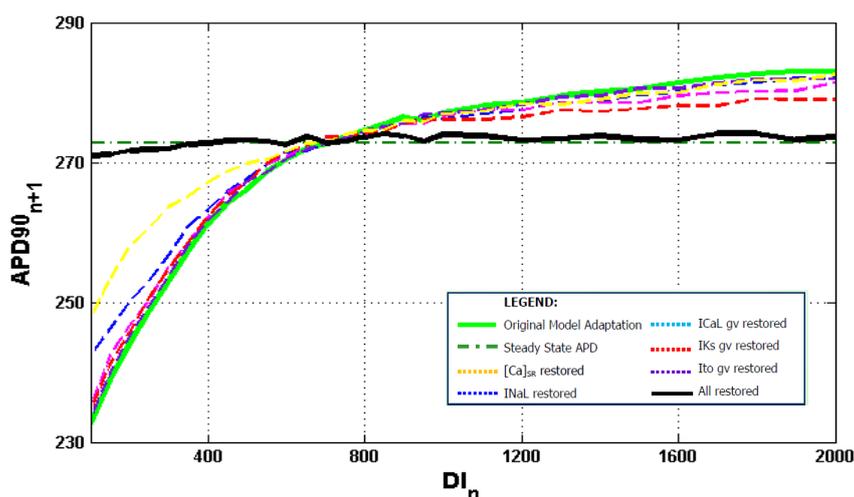


Figura 4.16-Risposte del modello ORd in fase rapida al protocollo S1S2 con ripristino di alcune variabili di stato

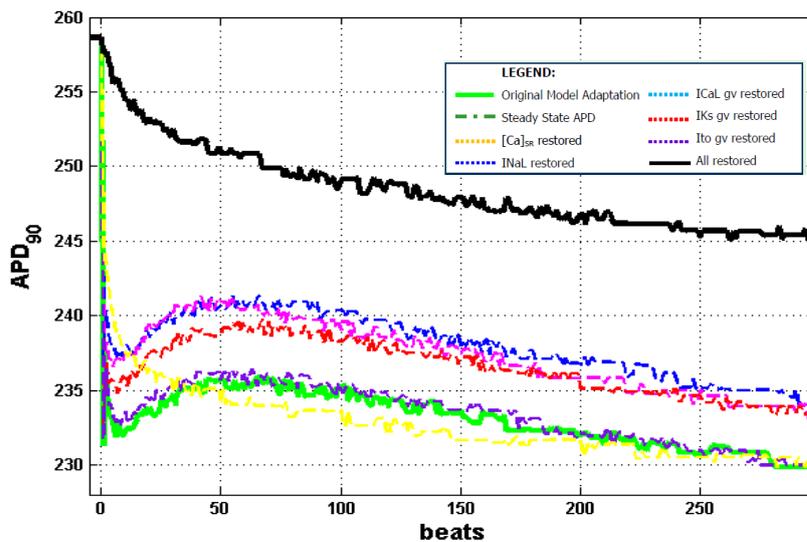


Figura 4.17 –Risposte al gradino del modello di ORd con ripristino delle principali variabili di stato

È interessante notare come sia proprio il Ca^{2+} la causa della forma particolare che presenta l'APD90 in risposta al gradino di CL applicato, rispetto a quella mostrata dai dati sperimentali. Il ripristino della concentrazione di Ca^{2+} nel reticolo, infatti, oltre ad eliminare gran parte della fase rapida, modifica la forma della fase lenta, rendendola più simile a quella fisiologica.

Per quantificare i singoli contributi, si è scelto di valutare la variazione percentuale di APD sul primo battito (Fig 4.18), indotta dal ripristino di una singola variabile di stato, rispetto alla simulazione del modello originale. I risultati sono mostrati nell'istogramma di Fig 4.19.

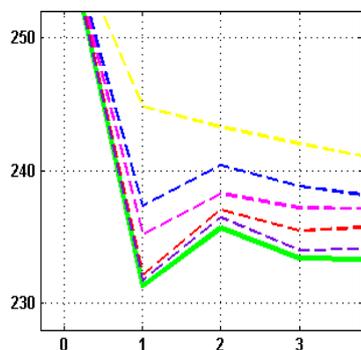


Figura 4.18- Variazione percentuale di APD sul primo battito per il modello ORd

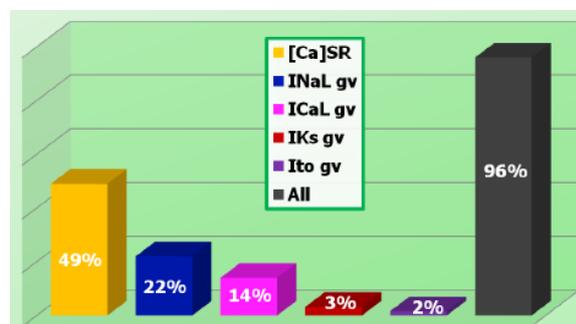


Figura 4.19- Istogramma delle percentuali di incidenza delle principali variabili di stato sull'andamento della fase rapida per il modello ORd

CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stato analizzato il comportamento di tre modelli di cardiomiocita ventricolare umano in risposta a variazioni di frequenza cardiaca, che portano ad una variazione nella durata del potenziale d'azione (APD). Tale variazione avviene in due fasi: un cambiamento immediato (fase rapida) e uno più graduale (fase lenta) che impiega alcuni minuti a raggiungere lo stato stazionario.

In particolare, l'obiettivo principale è stato quello di analizzare la fase rapida del processo di adattamento dell'APD al variare della frequenza, e individuare, per ogni modello, le correnti e le concentrazioni che maggiormente contribuiscono a questo fenomeno.

Un'indagine preliminare è stata condotta prendendo come punto di partenza i dati sperimentali presenti in letteratura [15], [27] che abbiamo cercato di riprodurre con i modelli considerati: Grandi-Bers (GB, [1]), Carro-Pueyo (CP, [2]) e O'Hara-Rudy (ORd, [3]).

Da questo confronto, sono emerse alcune differenze dei modelli rispetto ai dati sperimentali: in particolare, il modello GB, non presenta una fase rapida fisiologica: i primi potenziali d'azione dopo l'aumento di frequenza, infatti, risultano addirittura più lunghi di quelli all'equilibrio. Riproduce invece molto bene la fase lenta. Al contrario, i modelli CP e ORd presentano una corretta fase di adattamento rapida, ma una diversa morfologia nella fase lenta.

Questo comportamento è stato confermato anche dalla simulazione del protocollo S1S2, confrontando i dati ottenuti con i corrispondenti dati sperimentali [15], [27]: le curve ottenute presentano un andamento simile ma si è riscontrata una grande variabilità tra un modello e l'altro, così come per i diversi pazienti.

Per individuare i singoli meccanismi ionici responsabili della fase rapida dell'adattamento dell'APD, si è cercato di separare gli effetti delle variabili di stato sul potenziale d'azione: per fare questo, subito dopo il cambio di frequenza, alcune delle variabili di stato sono state ripristinate al loro valore stazionario. Sono stati così individuati per ogni modello i meccanismi ionici fondamentali per la fase rapida:

- Il modello GB, invece, non riproduce correttamente la fase rapida dell'adattamento, probabilmente perchè il recupero dall'inattivazione della corrente I_{CaL} è troppo rapido. Infatti, nel modello CP dove la fase rapida è presente, viene introdotta una seconda variabile di gating, che rallenta proprio questo recupero. Il fatto che addirittura l'APD aumenti sembra sia dovuto al recupero incompleto dall'inattivazione dei recettori rianodinici (RyRs), ovvero canali ionici del Ca^{2+} situati a livello del reticolo sarcoplasmatico. Contribuiscono anche alcune correnti, in particolare I_{to} e I_{Na} , ma il loro effetto è minore;
- nel modello CP, la fase rapida dipende quasi completamente dal mancato recupero dall'inattivazione delle variabili di gating della corrente I_{CaL} , e in misura minore dall'accumulo della I_{Kr} . Quando si eliminano gli effetti di queste variabili, tuttavia, il modello tende a comportarsi come il modello GB, dal quale è stato sviluppato;
- nel modello ORd, la fase rapida è dovuta principalmente alla diminuzione della concentrazione di Ca^{2+} all'interno del reticolo sarcoplasmatico. Una volta ripristinata questa concentrazione, la parte rimanente della fase rapida è causata dalle variabili di gating di diverse correnti, in particolare I_{NaL} e I_{CaL} , anche se si evidenziano contributi della I_{Ks} e della I_{to} ;

In conclusione quindi, i meccanismi ionici responsabili della variazione di APD per i tre modelli sono molto differenti tra di loro, ed è difficile trarre conclusioni generali che individuino una o più cause univoche per tale variazione, e che potrebbero dare indicazioni su quelli che sono i meccanismi che intervengono realmente nelle cellule.

In generale, comunque, i modelli CP e ORd hanno prodotto risultati in accordo con la fase rapida dei dati sperimentali, e le cause ioniche corrispondono per la maggior parte a quelle indicate in letteratura. Tuttavia, sono stati riscontrati alcuni limiti di questi modelli: nel modello CP, il contributo della ICaL è notevolmente superiore a quello delle altre correnti e questo potrebbe indicare un'anomalia nella sua formulazione. Nel modello ORd i meccanismi ionici responsabili della fase rapida sono più bilanciati e quindi più in accordo con quanto suggerito in letteratura. L'effetto delle variazioni della concentrazione di Ca^{2+} nel reticolo sarcoplasmatico, però, sembra avere alcune limitazioni, in quanto modifica la morfologia della curva di restituzione conferendole un andamento diverso da quello osservato sperimentalmente.

Per quanto riguarda il modello GB, l'assenza di una corretta fase rapida costituisce una grossa limitazione per poter osservare le variazioni di APD nei primi battiti successivi a una variazione di frequenza cardiaca.

Da questi risultati, emerge quindi chiaramente la necessità di avere un maggior numero di dati sperimentali sull'uomo, per poter chiarire meglio questo fenomeno e migliorare l'affidabilità dei modelli matematici.

APPENDICE A

CODICE MATLAB

Sono di seguito riportate le parti più significative del codice sviluppato in Matlab per l'esecuzione della simulazioni.

A.1 Codice per l'esecuzione del protocollo S1S2:

```
%% Introduction
%
% Esecuzione del protocollo S1S2
%
% Condizione di Steady State (ss):
%   - 1000 battiti con CL = 1000ms
%
% Si considerano 3 diversi modelli:
% 1) GB 2010
% 2) CRPL 2011
% 3) ORd 2011

% I dati ottenuti sono salvati nelle matrici M_1 M_2 e M_3
% 1a dim: asse dei tempi
% 2a dim: variabili di stato/di uscita
%   1a colonna   -> t
%   2a colonna   -> V
%   3a colonna   -> ICaL
%   4a colonna   -> [Ca]i
%   5a colonna   -> [Ca]j o [Ca]ss
%   6a colonna   -> [Ca]sl o INaL
%   7a colonna   -> IKs
%   8a colonna   -> Ito
%   9a colonna   -> Incx
% 3a dim: CL

addpath(strcat(pwd, '\Modelli'))

% Caricamento dei Dati di Steady State
fprintf('Protocollo S1S2...\n')
fprintf('Caricamento dei Dati di Steady State...\n')
load Dati_SS\ORd_ss_CL1000;
load Dati_SS\GB_ss_CL1000;
load Dati_SS\CP_ss_CL1000;
load Dati_SS\APD90
fprintf('Caricamento dei Dati di Steady State Completato!\n')

% Diastolic Interval
DI = [100:50:1000 1100:100:2000];
n = length(DI);
```

```

% Pacing CL
CL_GB = DI + APD90_GB;
CL_CP = DI + APD90_CP;
CL_ORd = DI + APD90_ORd;

tmax = 2500;
beats = 2;
options=odeset('MaxStep',1);

%% Matrici per il salvataggio dei dati
% n° variabili salvate
n_var = 9;
M_1=zeros(tmax,n_var,n,beats);
M_2=zeros(tmax,n_var,n,beats);
M_3=zeros(tmax,n_var,n,beats);

% Matrici per il salvataggio degli APD
APD_1=zeros(n,beats);
APD_2=zeros(n,beats);
APD_3=zeros(n,beats);

% Lunghezze dei vettori tempo
l_1=zeros(n,beats);
l_2=zeros(n,beats);
l_3=zeros(n,beats);

% Matrici per salvare i valori delle variabili non resettate
diff_GB=zeros(39,n,2);
diff_CP=zeros(39,n,2);
diff_ORd=zeros(41,n,2);

%% Esecuzione del Procollo S1S2:
for j=1:n
    fprintf('DI=%i: Step n°%i di %i\n',DI(j),j,length(DI))
    % runtime progress

    %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
    % I Battito %
    %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
    % Condizioni iniziali da ss
    XGB = GB_tXss_CL1000(end,2:end)';
    XCP = CP_tXss_CL1000(end,2:end)';
    XORd = ORd_tXss_CL1000(end,2:end)';

    [t_1,XGB]=ode15s(@GB_2010,[0 CL_GB(j)],XGB,options,1);
    [t_2,XCP]=ode15s(@CP_2011,[0 CL_CP(j)],XCP,options,1);
    [t_3,XORd]=ode15s(@ORd_2011,[0 CL_ORd(j)],XORd,options,1);

    %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
    % Calcolo delle Correnti %
    %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% N.B. la durata del ciclo è pari a quella del
vettore tempo più lungo
    for i=1:max([ l1 l2 l3 ])

```

```

    if i<=11
        % simulazione con flag = 0
        IsJs = GB_2010(t_1(i),XGB(i,:),0);

        ICaL_1(i) = IsJs(1);
        IKs_1(i) = IsJs(6);
        Incx_1(i) = IsJs(7);
        Ito_1(i) = IsJs(12);
    end

    if i<=12
        % simulazione con flag = 0
        IsJs = CP_2011(t_2(i),XCP(i,:),0);

        ICaL_2(i) = IsJs(1);
        IKs_2(i) = IsJs(8);
        Incx_2(i) = IsJs(9);
        Ito_2(i) = IsJs(11);
    end

    if i<=13
        % simulazione con flag = 0
        IsJs = ORd_2011(t_3(i),XORd(i,:),0);

        ICaL_3(i) = IsJs(4)+IsJs(24)+IsJs(25);
        IKs_3(i) = IsJs(6);
        Incx_3(i) = IsJs(8);
        Ito_3(i) = IsJs(3);
        INaL_3(i) = IsJs(2);
    end
end

% Memorizzazione dei dati: tempo + variabili di interesse
% 1a colonna ->
M_1(1:11,1,j,1)=t_1;
M_2(1:12,1,j,1)=t_2;
M_3(1:13,1,j,1)=t_3;
% 2a colonna -> V
M_1(1:11,2,j,1)=XGB(1:11,39);
M_2(1:12,2,j,1)=XCP(1:12,39);
M_3(1:13,2,j,1)=XORd(1:13,1);
% 3a colonna -> ICaL
M_1(1:11,3,j,1)=ICaL_1;
M_2(1:12,3,j,1)=ICaL_2;
M_3(1:13,3,j,1)=ICaL_3;
% 4a colonna -> [Ca]i
M_1(1:11,4,j,1)=XGB(1:11,1);
M_2(1:12,4,j,1)=XCP(1:12,2);
M_3(1:13,4,j,1)=XORd(1:13,6);
% 5a colonna -> [Ca]j,1 o [Ca]ss
M_1(1:11,5,j,1)=XGB(1:11,2);
M_2(1:12,5,j,1)=XCP(1:12,3);
M_3(1:13,5,j,1)=XORd(1:13,7);
% 6a colonna -> [Cs]s1 o INaL

```

```

M_1(1:11,6,j,1)=XGB(1:11,3);
M_2(1:12,6,j,1)=XCP(1:12,4);
M_3(1:13,6,j,1)=INaL_3;
% 7a colonna -> IKs
M_1(1:11,7,j,1)=IKs_1;
M_2(1:12,7,j,1)=IKs_2;
M_3(1:13,7,j,1)=IKs_3;
% 8a colonna -> Ito
M_1(1:11,8,j,1)=Ito_1;
M_2(1:12,8,j,1)=Ito_2;
M_3(1:13,8,j,1)=Ito_3;
% 9a colonna -> Incx
M_1(1:11,9,j,1)=Incx_1;
M_2(1:12,9,j,1)=Incx_2;
M_3(1:13,9,j,1)=Incx_3;

% Memorizzo la lunghezza del vettore dei tempi
l_1(j,1) = 11;    l_2(j,1) = 12;    l_3(j,1) = 13;

% Calcolo APD90
APD_1(j,1) = calcoloAPD90(t_1(1:11),XGB(1:11,39));
APD_2(j,1) = calcoloAPD90(t_2(1:12),XCP(1:12,39));
APD_3(j,1) = calcoloAPD90(t_3(1:13),XORd(1:13,1));

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% II Battito %
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% Condizioni finali del I Battito
XGB=XGB(end,:);
XCP=XCP(end,:);
XORd=XORd(end,:);

% Differenze tra i valori di XGB e quelli di ss
diff_GB(:,j,1) = XGB(:);
diff_GB(:,j,2) = GB_tXss_CL1000(end,2:end);
diff_CP(:,j,1) = XCP(:);
diff_CP(:,j,2) = CP_tXss_CL1000(end,2:end);
diff_ORd(:,j,1) = XORd(:);
diff_ORd(:,j,2) = ORd_tXss_CL1000(end,2:end);

[t_1,XGB]= ode15s(@GB_2010,[0 CL_GB(j)],XGB,options,1);
[t_2,XCP]=ode15s(@CP_2011,[0 CL_CP(j)],XCP,options,1);
[t_3,XORd]=ode15s(@ORd_2011,[0 CL_ORd(j)],XORd,options,1);

l1 = length(t_1);    l2 = length(t_2);    l3 = length(t_3);

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% Calcolo delle Correnti %
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

for i=1:max([ l1 l2 l3 ])
    if i<=l1
        % simulazione con flag = 0
        IsJs = GB_2010(t_1(i),XGB(i,:),0);

```

```

        ICaL_1(i) = IsJs(1);
        IKs_1(i) = IsJs(6);
        Incx_1(i) = IsJs(7);
        Ito_1(i) = IsJs(12);
    end

    if i<=12
        % simulazione con flag = 0
        IsJs = CP_2011(t_2(i),XCP(i,:),0);

        ICaL_2(i) = IsJs(1);
        IKs_2(i) = IsJs(8);
        Incx_2(i) = IsJs(9);
        Ito_2(i) = IsJs(11);
    end

    if i<=13
        % simulazione con flag = 0
        IsJs = ORd_2011(t_3(i),XORd(i,:),0);

        ICaL_3(i) = IsJs(4)+IsJs(24)+IsJs(25);
        IKs_3(i) = IsJs(6);
        Incx_3(i) = IsJs(8);
        Ito_3(i) = IsJs(3);
        INaL_3(i) = IsJs(2);
    end
end

end

% Memorizzazione dei dati: tempo + variabili di interesse
% 1a colonna ->
M_1(1:11,1,j,1)=t_1;
M_2(1:12,1,j,1)=t_2;
M_3(1:13,1,j,1)=t_3;
% 2a colonna -> V
M_1(1:11,2,j,1)=XGB(1:11,39);
M_2(1:12,2,j,1)=XCP(1:12,39);
M_3(1:13,2,j,1)=XORd(1:13,1);
% 3a colonna -> ICaL
M_1(1:11,3,j,1)=ICaL_1;
M_2(1:12,3,j,1)=ICaL_2;
M_3(1:13,3,j,1)=ICaL_3;
% 4a colonna -> [Ca]i
M_1(1:11,4,j,1)=XGB(1:11,1);
M_2(1:12,4,j,1)=XCP(1:12,2);
M_3(1:13,4,j,1)=XORd(1:13,6);
% 5a colonna -> [Ca]j,1 o [Ca]ss
M_1(1:11,5,j,1)=XGB(1:11,2);
M_2(1:12,5,j,1)=XCP(1:12,3);
M_3(1:13,5,j,1)=XORd(1:13,7);
% 6a colonna -> [Cs]s1 o INaL
M_1(1:11,6,j,1)=XGB(1:11,3);
M_2(1:12,6,j,1)=XCP(1:12,4);
M_3(1:13,6,j,1)=INaL_3;
% 7a colonna -> IKs

```

```

M_1(1:11,7,j,1)=IKs_1;
M_2(1:12,7,j,1)=IKs_2;
M_3(1:13,7,j,1)=IKs_3;
% 8a colonna -> Ito
M_1(1:11,8,j,1)=Ito_1;
M_2(1:12,8,j,1)=Ito_2;
M_3(1:13,8,j,1)=Ito_3;
% 9a colonna -> Incx
M_1(1:11,9,j,1)=Incx_1;
M_2(1:12,9,j,1)=Incx_2;
M_3(1:13,9,j,1)=Incx_3;

% Memorizzo la lunghezza del vettore dei tempi
l_1(j,2) = 11;    l_2(j,2) = 12;    l_3(j,2) = 13;

% Calcolo APD90
APD_1(j,2) = calcoloAPD90(t_1(1:11),XGB(1:11,39));
APD_2(j,2) = calcoloAPD90(t_2(1:12),XCP(1:12,39));
APD_3(j,2) = calcoloAPD90(t_3(1:13),XORd(1:13,1));

end

save Dati\DatiS1S2 M_1 M_2 M_3 APD_1 APD_2 APD_3 DI n...
    l_1 l_2 l_3 CL_GB CL_CP CL_ORD...
    diff_GB diff_CP diff_ORD DI n

```

A.2 Codice per l'esecuzione del protocollo di Franz:

```

%% Introduction
%
% Esecuzione del protocollo per lo studio dell'APD adaptation
% di Franz et al (1988)
%
% a)    Steady State: 1000 battiti con CL=750ms
%        180 minuti con CL=480ms
%        180 minuti con CL=750ms
%
% b)    Steady State: 1000 battiti con CL=750ms
%        180 minuti con CL=410ms
%        180 minuti con CL=750ms
%
% N.B.  I dati caricati partono con alcuni (beats_ss)
%        battiti in Steady State (CL = 750ms)
%
% Si utilizzando 3 diversi modelli:
% 1) GB 2010
% 2) CRPL 2011
% 3) ORd 2011
%
% I dati vengono salvati in 6 matrici 3D del tipo
'adaptation_la'
% - la lettera si riferisce al protocollo applicato (a,b)
% - il numero si riferisce al modello utilizzato (1,2,3)
%

```

```

% Le matrici sono strutturate in questo modo:
% - 1a dim: asse dei tempi
% - 2a dim: vettore t (1) + variabili di stato: 39 per 1) e 2),
41 per 3)
% - 3a dim: beats
%
% La durata del vettore dei tempi viene impostata ad un valore
massimo (1500)
% mentre il valore effettivo è memorizzato in vettori del tipo
'ltime_1a'
%
% I dati sono salvati nei file:
% - Franz_a.mat e Franz_b.mat
%
% Nel file DatiAPD_adapt.mat sono salvati i dati di simulazione
aggiuntivi:
% CL CL_a CL_b beats beats_a beats_b beats_ss durata

% Codice per il calcolo del tempo computazionale e per
% il salvataggio dei progressi su file di testo
c = tic;
f1=fopen('APD_adaptation.txt','w');
fprintf(f1,'Simulazione APD adaptation:\nCaricamento dei
dati...\n');
fprintf('\nCaricamento dei dati...\n')

%% Caricamento dei dati
% Steady State: 1000 battiti con CL=750ms
load dati\GB_ss_CL750
load dati\CP_ss_CL750
load dati\ORD_ss_CL750

fprintf(f1,'Caricamento dati di steady state completato: Tempo
Impiegato:%5.2f s\n',toc(c));
fclose(f1);

%% Dati di Simulazione

% CL e durata del gradino [ms]
CL=750; CL_a=480; CL_b=410; durata=180e3;

% number of beats in the simulation
beats_ss = 10; % Inizio: CL = 750ms

beats_a = ceil(durata/CL_a); % Gradino: CL = 480ms
beats_b = ceil(durata/CL_b); % Gradino: CL = 410ms
beats = ceil(durata/CL); % Fine: CL = 750ms

addpath(strcat(pwd, '\Modelli'))
options=odeset('MaxStep',1); %options for ode solver

%% Initial Conditions
% Initial conditions for state variables:

```

```

% Steady State: 1000 battiti con CL=750ms
X0_1s=GB_tXss_CL750(end,2:end);
X0_2s=CP_tXss_CL750(end,2:end);
X0_3s=ORd_tXss_CL750(end,2:end);

%% Matrici per il salvataggio dei dati
l_1e2 = size(X0_1s,2)+1;% n° var di stato dei modelli GB e CP
l_3 = size(X0_3s,2)+1; % n° var di stato del modello ORD

la = beats_ss + beats_a + beats; % battiti totali sim a)
lb = beats_ss + beats_b + beats; % battiti totali sim b)

tmax = 1500; % max lunghezza asse dei tempi

% Matrici per il salvataggio delle var di stato e dei vettori
di tempo
adaptation_1a=zeros(tmax,l_1e2,la);
adaptation_1b=zeros(tmax,l_1e2,lb);
adaptation_2a=zeros(tmax,l_1e2,la);
adaptation_2b=zeros(tmax,l_1e2,lb);
adaptation_3a=zeros(tmax,l_3,la);
adaptation_3b=zeros(tmax,l_3,lb);

% Vettori per memorizzare la lunghezza dei vettori di tempo
ltime_1a=zeros(1,la);
ltime_2a=zeros(1,la);
ltime_3a=zeros(1,la);
ltime_1b=zeros(1,lb);
ltime_2b=zeros(1,lb);
ltime_3b=zeros(1,lb);

%% Simulazione Steady State: CL = 750ms
% N.B. Questa fase è la stessa per le simulazioni A e B

f1=fopen('APD_adaptation.txt','a');
fprintf(f1,'Calcolo Battiti in Steady State: CL = 750ms\n');
fclose(f1);
fprintf('\nCalcolo Battiti in Steady State: CL = 750ms\n')
s = tic;

for n = 1:beats_ss

    [time_1 X_1] = ode15s(@GB_2010,[0 CL],X0_1s,options,1);
    [time_2 X_2] = ode15s(@CP_2011,[0 CL],X0_2s,options,1);
    [time_3 X_3] = ode15s(@ORd_2011,[0 CL],X0_3s,options,1);

    % ad ogni battito le condizioni iniziali diventano le
    condizioni finali del battito precedente
    X0_1s=X_1(end,:); X0_2s=X_2(end,:); X0_3s=X_3(end,:);

    ltime_1a(n) = length(time_1);
    ltime_2a(n) = length(time_2);
    ltime_3a(n) = length(time_3);
    ltime_1b(n) = length(time_1);

```

```

ltime_2b(n) = length(time_2);
ltime_3b(n) = length(time_3);

adaptation_1a(1:ltime_1a(n),1,n)=time_1;
adaptation_1a(1:ltime_1a(n),2:end,n)=X_1;
adaptation_2a(1:ltime_2a(n),1,n)=time_2;
adaptation_2a(1:ltime_2a(n),2:end,n)=X_2;
adaptation_3a(1:ltime_3a(n),1,n)=time_3;
adaptation_3a(1:ltime_3a(n),2:end,n)=X_3;
adaptation_1b(1:ltime_1b(n),1,n)=time_1;
adaptation_1b(1:ltime_1b(n),2:end,n)=X_1;
adaptation_2b(1:ltime_2b(n),1,n)=time_2;
adaptation_2b(1:ltime_2b(n),2:end,n)=X_2;
adaptation_3b(1:ltime_3b(n),1,n)=time_3;
adaptation_3b(1:ltime_3b(n),2:end,n)=X_3;

fprintf('Beat n°%d of %d\n',n,beats_ss)      % runtime progress

end

%% Simulazione A - Parte I: CL = 480ms

f1=fopen('APD_adaptation.txt','a');
fprintf(f1,'Simulazione Steady State Completata: Tempo
Impiegato:%5.2f s\n',toc(s));
fprintf(f1,'Simulazione A - Parte I: CL = 480ms\n');
fclose(f1);
fprintf('\nSimulazione A - Parte I: CL = 480ms\n')
a = tic;

% Initial conditions for state variables:
% (recupero le condizioni al termine dei battiti in Steady
State)
X0_1=X0_1s(end,:); X0_2=X0_2s(end,:); X0_3=X0_3s(end,:);

for n = 1:beats_a

    k = n + beats_ss;    % indice per iniziare a salvare i dati

    [time_1 X_1] = ode15s(@GB_2010,[0 CL_a],X0_1,options,1);
    [time_2 X_2] = ode15s(@CP_2011,[0 CL_a],X0_2,options,1);
    [time_3 X_3] = ode15s(@ORd_2011,[0 CL_a],X0_3,options,1);

    % ad ogni battito le condizioni iniziali diventano le
condizioni finali del battito precedente
X0_1=X_1(end,:); X0_2=X_2(end,:); X0_3=X_3(end,:);

    ltime_1a(k) = length(time_1);
    ltime_2a(k) = length(time_2);
    ltime_3a(k) = length(time_3);

    adaptation_1a(1:ltime_1a(k),1,k)=time_1;
    adaptation_1a(1:ltime_1a(k),2:end,k)=X_1;

```

```

adaptation_2a(1:ltime_2a(k),1,k)=time_2;
adaptation_2a(1:ltime_2a(k),2:end,k)=X_2;
adaptation_3a(1:ltime_3a(k),1,k)=time_3;
adaptation_3a(1:ltime_3a(k),2:end,k)=X_3;

fprintf('Beat n°%d of %d\n',n,beats_a)    % runtime progress

end

% Simulazione A - Parte II: CL = 750ms

f1=fopen('APD_adaptation.txt','a');
fprintf(f1,'Simulazione A - Parte I Terminata: Tempo
Impiegato:%5.2f s\n',toc(a));
fprintf('\nSimulazione A - Parte II: CL = 750ms\n')
fprintf(f1,'Simulazione A - Parte II: CL = 750ms\n');
fclose(f1);
a = tic;

for n = 1:beats

    k = n + beats_a + beats_ss;

    [time_1 X_1] = ode15s(@GB_2010,[0 CL],X0_1,options,1);
    [time_2 X_2] = ode15s(@CP_2011,[0 CL],X0_2,options,1);
    [time_3 X_3] = ode15s(@ORD_2011,[0 CL],X0_3,options,1);

    % ad ogni battito le condizioni iniziali diventano le
    % condizioni finali del battito precedente
    X0_1=X_1(end,:);      X0_2=X_2(end,:);      X0_3=X_3(end,:);

    ltime_1a(k) = length(time_1);
    ltime_2a(k) = length(time_2);
    ltime_3a(k) = length(time_3);

    adaptation_1a(1:ltime_1a(k),1,k)=time_1;
    adaptation_1a(1:ltime_1a(k),2:end,k)=X_1;
    adaptation_2a(1:ltime_2a(k),1,k)=time_2;
    adaptation_2a(1:ltime_2a(k),2:end,k)=X_2;
    adaptation_3a(1:ltime_3a(k),1,k)=time_3;
    adaptation_3a(1:ltime_3a(k),2:end,k)=X_3;

    fprintf('Beat n°%d of %d\n',n,beats)    % runtime progress

end

% Simulazione B - Parte I: CL = 410ms

f1=fopen('APD_adaptation.txt','a');
fprintf(f1,'Simulazione A - Parte II Terminata: Tempo
Impiegato:%5.2f s\n',toc(a));
fprintf('\nSimulazione B - Parte I: CL = 410ms\n')
fprintf(f1,'Simulazione B - Parte I: CL = 410ms\n');
fclose(f1);

```

```

b = tic;

% Initial conditions for state variables:
% (recupero le condizioni al termine dei battiti in Steady
State)
X0_1=X0_1s(end,:); X0_2=X0_2s(end,:); X0_3=X0_3s(end,:);

for n = 1:beats_b

    k = n + beats_ss;

    [time_1 X_1] = ode15s(@GB_2010,[0 CL_b],X0_1,options,1);
    [time_2 X_2] = ode15s(@CP_2011,[0 CL_b],X0_2,options,1);
    [time_3 X_3] = ode15s(@ORd_2011,[0 CL_b],X0_3,options,1);

    % ad ogni battito le condizioni iniziali diventano le
condizioni finali del battito precedente
    X0_1=X_1(end,:); X0_2=X_2(end,:); X0_3=X_3(end,:);

    ltime_1b(k) = length(time_1);
    ltime_2b(k) = length(time_2);
    ltime_3b(k) = length(time_3);

    adaptation_1b(1:ltime_1b(k),1,k)=time_1;
    adaptation_1b(1:ltime_1b(k),2:end,k)=X_1;
    adaptation_2b(1:ltime_2b(k),1,k)=time_2;
    adaptation_2b(1:ltime_2b(k),2:end,k)=X_2;
    adaptation_3b(1:ltime_3b(k),1,k)=time_3;
    adaptation_3b(1:ltime_3b(k),2:end,k)=X_3;

    fprintf('Beat n°%d of %d\n',n,beats_b) % runtime progress

end

%% Simulazione B - Parte II: CL = 750ms

f1=fopen('APD_adaptation.txt','a');
fprintf(f1,'Simulazione B - Parte I Terminata: Tempo
Impiegato:%5.2f s\n',toc(b));
fprintf('\nSimulazione B - Parte II: CL = 750ms\n')
fprintf(f1,'Simulazione B - Parte II: CL = 750ms\n');
fclose(f1);
b = tic;

for n = 1:beats

    k = n + beats_ss + beats_b;

    [time_1 X_1] = ode15s(@GB_2010,[0 CL],X0_1,options,1);
    [time_2 X_2] = ode15s(@CP_2011,[0 CL],X0_2,options,1);
    [time_3 X_3] = ode15s(@ORd_2011,[0 CL],X0_3,options,1);

```

```

    % ad ogni battito le condizioni iniziali diventano le
    condizioni finali del battito precedente
X0_1=X_1(end,:);      X0_2=X_2(end,:);      X0_3=X_3(end,:);

ltime_1b(k) = length(time_1);
ltime_2b(k) = length(time_2);
ltime_3b(k) = length(time_3);

adaptation_1b(1:ltime_1b(k),1,k)=time_1;
adaptation_1b(1:ltime_1b(k),2:end,k)=X_1;
adaptation_2b(1:ltime_2b(k),1,k)=time_2;
adaptation_2b(1:ltime_2b(k),2:end,k)=X_2;
adaptation_3b(1:ltime_3b(k),1,k)=time_3;
adaptation_3b(1:ltime_3b(k),2:end,k)=X_3;

fprintf('Beat n°%d of %d\n',n,beats)    % runtime progress
end

f1=fopen('APD_adaptation.txt','a');
fprintf(f1,'Simulazione B - Parte II Terminata: Tempo
Impiegato:%5.2f s\n',toc(b));

%% Calcolo dell'istante temporale corrispondente ad ogni
battito

t_ss = -CL*beats_ss:CL:0-CL;
t_a = 0:CL_a:beats_a*CL_a;
t_b = 0:CL_b:beats_b*CL_b;
t_fa = t_a(end)+CL:CL:t_a(end)+(beats-1)*CL;
t_fb = t_b(end)+CL:CL:t_b(end)+(beats-1)*CL;

tempo_a = [t_ss t_a t_fa]/1000;
tempo_b = [t_ss t_b t_fb]/1000;

%% Salvataggio dei Dati
fprintf(f1,'Inizio Salvataggio Dati...\n');
save Dati\Franz_a      adaptation_1a      adaptation_2a
adaptation_3a
save Dati\Franz_b      adaptation_1b      adaptation_2b
adaptation_3b
save Dati\Dati_APDtime      ltime_1a      ltime_2a
ltime_3a...
ltime_1b      ltime_2b
ltime_3b...
tempo_a      tempo_b
save Dati\Dati_APDadaptation      CL CL_a CL_b...
beats beats_a beats_b beats_ss...
durata l_1e2 l_3 la lb tmax

fprintf(f1,'Salvataggio Dati Completato\n');
fprintf(f1,'Simulazione Terminata: Tempo Totale:%5.2f
s\n',toc(c));
fclose(f1);

```

A.3 Codice per la visualizzazione dei risultati ottenuti:

```

%% %% Recupero dei dati delle simulazioni:
addpath(strcat(pwd, '\Funzioni'))
addpath(strcat(pwd, '\Dati'))

fprintf('Caricamento dei Dati...\n')
load Dati\Franz_a
load Dati\Franz_b
load Dati\Dati_APDtime
load Dati\Dati_APDadaptation
fprintf('Caricamento dei Dati Completato!\n')

%% Matrici per il salvataggio dell'APD

APD90_1a=zeros(1a,1);
APD90_2a=zeros(1a,1);
APD90_3a=zeros(1a,1);
APD90_1b=zeros(1b,1);
APD90_2b=zeros(1b,1);
APD90_3b=zeros(1b,1);

%% Simulazione A

for n=1:1a

    % Modello GB_2010:
    t_sim = adaptation_1a(1:1time_1a(n),1,n); % t: prima
colonna
    V_sim = adaptation_1a(1:1time_1a(n),end,n); % V: ultima
var di stato
    APD90_1a(n) = calcoloAPD90(t_sim,V_sim);

    % Modello CP_2011:
    t_sim = adaptation_2a(1:1time_2a(n),1,n); % t: prima
colonna
    V_sim = adaptation_2a(1:1time_2a(n),end,n); % V: ultima
var di stato
    APD90_2a(n) = calcoloAPD90(t_sim,V_sim);

    % Modello ORd_2011:
    t_sim = adaptation_3a(1:1time_3a(n),1,n); % t: prima
colonna
    V_sim = adaptation_3a(1:1time_3a(n),2,n); % V: prima
var di stato
    APD90_3a(n) = calcoloAPD90(t_sim,V_sim);

end

for n=1:1b

    % Modello GB_2010:
    t_sim = adaptation_1b(1:1time_1b(n),1,n); % t: prima
colonna
    V_sim = adaptation_1b(1:1time_1b(n),end,n); % V: ultima
var di stato

```

```

        APD90_1b(n) = calcoloAPD90(t_sim,V_sim);

        % Modello CP_2011:
        t_sim = adaptation_2b(1:ltime_2b(n),1,n); % t: prima
colonna
        V_sim = adaptation_2b(1:ltime_2b(n),end,n); % V: ultima
var di stato
        APD90_2b(n) = calcoloAPD90(t_sim,V_sim);

        % Modello ORd_2011:
        t_sim = adaptation_3b(1:ltime_3b(n),1,n); % t: prima
colonna
        V_sim = adaptation_3b(1:ltime_3b(n),2,n); % V: prima
var di stato
        APD90_3b(n) = calcoloAPD90(t_sim,V_sim);

end

%% Visualizzazione Simulazione A e B
figure('Name','Esperimento di Franz et al.')
title('Esperimento di Franz et al.')

subplot(3,1,1)
plot(tempo_a,APD90_1a,'m','LineWidth',2);
hold on
plot(tempo_b,APD90_1b,'m','LineWidth',2);
legend('GB 750->480ms','GB 750->410ms');
axis([-20 370 240 300]);
grid
subplot(3,1,2)
plot(tempo_a,APD90_2a,'b','LineWidth',2);
hold on
plot(tempo_b,APD90_2b,'b','LineWidth',2);
axis([-20 370 260 320]);
grid
legend('CP 750->480ms','CP 750->410ms');
subplot(3,1,3)
plot(tempo_a,APD90_3a,'g','LineWidth',2);
hold on
plot(tempo_b,APD90_3b,'g','LineWidth',2);
axis([-20 370 220 280]);
grid
legend('ORd 750->480ms','ORd 750->410ms');

%% Confronto dei 3 modelli

figure('Name','Esperimento di Franz et al. -> Confronto dei
modelli analizzati')
title('Modelli a Confronto')

plot(tempo_a,APD90_1a,'m','LineWidth',2);
hold on
plot(tempo_b,APD90_1b,'m','LineWidth',2);
plot(tempo_a,APD90_2a,'b','LineWidth',2);
plot(tempo_b,APD90_2b,'b','LineWidth',2);

```

```

plot(tempo_a,APD90_3a,'g','LineWidth',2);
plot(tempo_b,APD90_3b,'g:','LineWidth',2);
legend('GB 750->480ms','GB 750->410ms','CP 750->480ms','CP 750->410ms','ORD 750->480ms','ORD 750->410ms');
grid

%% Normalizzazione

figure('Name','Esperimento di Franz et al. -> Confronto e normalizzazione dei modelli analizzati')
title('Modelli a Confronto: normalizzazione')

plot(tempo_a,APD90_1a/APD90_1a(1),'m','LineWidth',2);
hold on
plot(tempo_b,APD90_1b/APD90_1b(1),'m:','LineWidth',2);
plot(tempo_a,APD90_2a/APD90_2a(1),'b','LineWidth',2);
plot(tempo_b,APD90_2b/APD90_2b(1),'b:','LineWidth',2);
plot(tempo_a,APD90_3a/APD90_3a(1),'g','LineWidth',2);
plot(tempo_b,APD90_3b/APD90_3b(1),'g:','LineWidth',2);
legend('GB 750->480ms','GB 750->410ms','CP 750->480ms','CP 750->410ms','ORD 750->480ms','ORD 750->410ms');
grid

```

A.4 Codice per l'esecuzione del protocollo S1S2 con ripristino selettivo di alcune variabili (es. variabili di gating della ICaL nel modello GB)

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% Clamp: ICaL GV - Modello GB %
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Dopo il 1° battito le variabili di gating presenti
% nella ICaL vengono resettate ai loro valori di ss
%
% - Y(11) -> d
% - Y(12) -> f
% - Y(13) -> f_Ca_Bj
% - Y(14) -> f_Ca_Bsl
%

%% Caricamento dei dati di Steady State
fprintf('Protocollo S1S2 - ICaL GV...\n')
fprintf('Caricamento dei Dati di Steady State...\n')
load Dati_SS\ORD_ss_CL1000;
load Dati_SS\GB_ss_CL1000;
load Dati_SS\CP_ss_CL1000;
load Dati_SS\APD90;
fprintf('Caricamento dei Dati di Steady State Completato!\n')

%% Dati di Simulazione
% Diastolic Interval
DI = [100:50:1000 1100:100:2000];

```

```

n = length(DI);

% Pacing CL
CL_GB = DI + APD90_GB;

tmax = 2500;
beats = 2;
options=odeset('MaxStep',1);

%% Matrici per il salvataggio dei dati
% n° variabili salvate
n_var = 9;
M_1=zeros(tmax,n_var,n,beats);
M_2=zeros(tmax,n_var,n,beats);
M_3=zeros(tmax,n_var,n,beats);

% Matrici per il salvataggio degli APD
APD_1=zeros(n,beats);
APD_2=zeros(n,beats);
APD_3=zeros(n,beats);

% Lunghezze dei vettori tempo
l_1=zeros(n,beats);
l_2=zeros(n,beats);
l_3=zeros(n,beats);

%% Esecuzione del Procollo S1S2:
for j=1:n

    fprintf('DI=%i: Step n°%i di %i\n',DI(j),j,length(DI))
% runtime progress

    %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
    % I Battito %
    %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
    % Condizioni iniziali da ss
    XGB = GB_tXss_CL1000(end,2:end)';

    [t_1, XGB] = ode15s(@GB_2010,[0 CL_GB(j)],XGB,options,1);

    %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
    % Calcolo delle Correnti %
    %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

    l1 = length(t_1);    l2 = length(t_2);    l3 = length(t_3);

    % Matrici temporanee per le correnti
    IcaL_1 = zeros(l1,1);
    IKs_1 = zeros(l1,1);
    Ito_1 = zeros(l1,1);
    Incx_1 = zeros(l1,1);

```

```

% N.B. la durata del ciclo è pari a quella del vettore tempo
più lungo
    for i=1:l
        % simulazione con flag = 0
        IsJs = GB_2010(t_1(i),XGB(i,:),0);

        ICaL_1(i) = IsJs(1);
        IKs_1(i) = IsJs(6);
        Incx_1(i) = IsJs(7);
        Ito_1(i) = IsJs(12);
    end

% Memorizzazione dei dati: tempo + variabili di interesse
% 1a colonna -> t
M_1(1:l,1,j,1)=t_1;
% 2a colonna -> V
M_1(1:l,2,j,1)=XGB(1:l,39);
% 3a colonna -> ICaL
M_1(1:l,3,j,1)=ICaL_1;
% 4a colonna -> [Ca]i
M_1(1:l,4,j,1)=XGB(1:l,1);
% 5a colonna -> [Ca]j,1 o [Ca]ss
M_1(1:l,5,j,1)=XGB(1:l,2);
% 6a colonna -> [Cs]sl o INaL
M_1(1:l,6,j,1)=XGB(1:l,3);
% 7a colonna -> IKs
M_1(1:l,7,j,1)=IKs_1;
% 8a colonna -> Ito
M_1(1:l,8,j,1)=Ito_1;
% 9a colonna -> Incx
M_1(1:l,9,j,1)=Incx_1;

% Memorizzo la lunghezza del vettore dei tempi
l_1(j,1) = l;

% Calcolo APD90
APD_1(j,1) = calcoloAPD90(t_1(1:l),XGB(1:l,39));

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% II Battito %
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% Condizioni finali del I Battito
XGB=XGB(end,:);

% Ripristino delle variabili di gating al valore di ss
% N.B. nella 1a colonna dei dati SS c'è il tempo, quindi
devo fare +1

% 1) Modello GB:
XGB(l) = GB_tXss_CL1000(end,12);
XGB(l) = GB_tXss_CL1000(end,13);
XGB(l) = GB_tXss_CL1000(end,14);
XGB(l) = GB_tXss_CL1000(end,15);

```

```

[t_1 XGB] = ode15s(@GB_2010,[0 CL_GB(j)],XGB,options,1);

l1 = length(t_1);

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% Calcolo delle Correnti %
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Matrici temporanee per le correnti
ICaL_1 = zeros(l1,1);
IKs_1 = zeros(l1,1);
Ito_1 = zeros(l1,1);
Incx_1 = zeros(l1,1);

% N.B. la durata del ciclo è pari a quella del vettore tempo
più lungo
for i=l1
    ICaL_1(i) = IsJs(1);
    IKs_1(i) = IsJs(6);
    Incx_1(i) = IsJs(7);
    Ito_1(i) = IsJs(12);
end

% Memorizzazione dei dati: tempo + variabili di interesse
% 1a colonna -> t
M_1(1:l1,1,j,1)=t_1;
% 2a colonna -> V
M_1(1:l1,2,j,1)=XGB(1:l1,39);
% 3a colonna -> ICaL
M_1(1:l1,3,j,1)=ICaL_1;
% 4a colonna -> [Ca]i
M_1(1:l1,4,j,1)=XGB(1:l1,1);
% 5a colonna -> [Ca]j,1 o [Ca]ss
M_1(1:l1,5,j,1)=XGB(1:l1,2);
% 6a colonna -> [Cs]sl o INaL
M_1(1:l1,6,j,1)=XGB(1:l1,3);
% 7a colonna -> IKs
M_1(1:l1,7,j,1)=IKs_1;
% 8a colonna -> Ito
M_1(1:l1,8,j,1)=Ito_1;
% 9a colonna -> Incx
M_1(1:l1,9,j,1)=Incx_1;

% Memorizzo la lunghezza del vettore dei tempi
l_1(j,1) = l1;

% Calcolo APD90
APD_1(j,1) = calcoloAPD90(t_1(1:l1),XGB(1:l1,39));

end

```

Codice per il calcolo dell'APD90:

```
function APD90=calcoloAPD90(t,V)

% Ricerca del punto di Massima Pendenza
% (inizio del calcolo dell'APD):

differenza = V(2:end)-V(1:end-1);
[~, i_start] = max(differenza);

M=max(V);
% Valore iniziale del potenziale -> minimo:
m=V(1);

% Calcolo del valore di soglia e relativo indice
durata=90;
Vsoglia=m+(1-durata/100)*M;
i_end=find(V>=Vsoglia,1,'last');

APD_start=t(i_start);
APD_end=t(i_end);

APD90 = APD_end - APD_start;

% controllo:
% plot(t,V,'m')
% hold on
% plot(APD_start,M,'k*')
% plot(APD_end,m,'k*')

end
```


BIBLIOGRAFIA

[1] **E. Grandi, F. S. Pasqualini, D. M. Bers.** A novel computational model of the human ventricular action potential and Ca transient. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48 (2010) 112–121.

[2] **T. O’Hara, L. Viràg, A. Varrò, Y. Rudy.** Simulation of the Undiseased Human Cardiac Ventricular Action Potential: Model Formulation and Experimental Validation.

PLoS Comput Biol 7.5: e1002061. doi:10.1371/journal.pcbi.1002061

[3] **J. Carro, J. F. Rodríguez, P. Laguna and E. Pueyo.** A human ventricular cell model for investigation of cardiac arrhythmias under hyperkalaemic conditions.

Phil. Trans. R. Soc. A 2011 369, 4205-4232 doi: 10.1098/rsta.2011.0127

[4] **M.R. Franz, C. D. Swerdlow, L. Bing Liem, and J. Schaefer.** Cycle Length Dependence of Human Action Potential Duration In Vivo. Effects of Single Extrastimuli, Sudden Sustained Rate Acceleration and Deceleration, and Different Steady-State Frequencies.

[5] **Noble D.** A modification of the Hodgkin-Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pacemaker potentials. *J Physiol.* 160:317-352, 1962.

[6] **Hodgkins, Huxley, Katz.** Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. *Arch Sci Physiol* 3:129-150, 1949.

[7] **Hodgkin and Huxley.** The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol.* 116:473-496, 1952a.

- [8] **Hodgkins, Huxley, Katz.** Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. Arch Sci Physiol 3:129-150, 1949.
- [9] **Rudy Y. & J.R Silva.** Computational biology in the study of cardiac ion channels and cell electrophysiology. Q Rev Biophys 2006 February; 39(1):57-116.
- [10] **Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW.** Shaker potassium channel gating III: Evaluation of kinetic models for activation. Journal of general physiology, 103:321-362. [PubMed: 8189208] 1994.
- [11] **Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW.** Shaker potassium channel gating III: Evaluation of kinetic models for activation. Journal of general physiology, 103:321-362.[PubMed: 8189208] 1994.
- [12] **Armstrong CM, Bezanilla F.** Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. Journal of general Physiology; 70:567-590 [Pubmed: 591912] 1977.
- [13] **Bezanilla F Armstrong C.M.** Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. Journal of general Physiology; 70:567-590 [Pubmed: 591912] 1977.
- [14] **Silverman WR, Roux B, Papazian.** Structural basis of two stage voltage dependent activation in K⁺ channels. Proceeding of the National Academy of Science 100: 2935-2940 , USA 2003.
- [14] **Marban E.** Cardiac channelopathies. Nature. 415:213-218, 2002.
- [15] **M. R. Franz, C. D. Swerdlow, L. Bing Liem, and J. Schaefer.** Cycle Length Dependence of Human Action Potential Duration In Vivo.

- [16] **E. Carmeliet.** Intracellular Ca^{2+} concentration and rate adaptation of the cardiac action potential *Cell Calcium* 35 (2004) 557–573.
- [17] **D. A. Eisner, K. M. Dibb and A.W. Trafford.** The mechanism and significance of the slow changes of ventricular action potential duration following a change of heart rate *Exp Physiol* 94.5 pp 520–528.
- [18] **Richard E. Klabunde, Ph.D.** Cardiovascular Pharmacology Concepts.
- [19] **A. Zaza.** Basi fisiopatologiche delle aritmie e della loro terapia.
- [20] **Katz A.** Physiology of the Heart. Raven Press, New York, 1992.
- [21] **Marban E., T. Yamagishi, G. F. Tomaselli.** Structure and function of voltage gated sodium channels. *J Physiol. (Lond)*. 508:647-57, 1998.
- [22] **Zeng J., Y. Rudy.** Early after depolarizations in cardiac myocytes: mechanism and rate dependence. *Biophys J*. 68:949-64, 1995.
- [23] **Bers DM.** Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Kluwer Academic Pub, Dordrecht, Netherlands 2001.
- [24] **Nabauer M., D. J. Beuckelmann, E.Erdmann.** Characteristics of transient outward current in human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res*. 73:386-394, 1993.
- [25] **Collier M., P. Levesque, J. Kenyon, J. Hume.** Unitary Cl^- channels activated by cytoplasmic Ca^{2+} in canine ventricular myocytes. *Circ Res*. 78:936-944, 1996.

[26] **Yue D. T. and E. Marban.** A novel cardiac potassium channel that is active and conductive at depolarized potentials. *Pflugers Arch.* 413: 127-33, 1988.

[27] **J. M . Morgan, M.B., D. CunninghamM, Phd. E.Rowland.** Dispersion of Monophasic Action Potential Duration Demonstrable in Humans After Premature Ventricular Extrastimulation but Not in Steady State *JACC Vol 19 n° 6*, pp 1244-53, 1992.

[28] **Lookfordiagnosis (<http://www.lookfordiagnosis.com/>).** La membrana cellulare.

[29] **Medicinapertutti(<http://medicinapertutti.altervista.org/>).** Canali del sodio.

[30] **Medicinapertutti(<http://medicinapertutti.altervista.org/>).** Canali del potassio.

[31] **Wikipedia.** Potenziale d'azione.