

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**ESTRAZIONE AUTOMATICA DI
PARAMETRI FISIOLGICI DA
REGISTRAZIONI DI POTENZIALI
D'AZIONE CARDIACI**

Elaborato in:

LABORATORIO DI BIOINGEGNERIA

Relatore

Prof. Ing. Stefano Severi

Presentata da

Luca Fabbri

Correlatore

Dott.sa Chiara Bartolucci

Sessione III

Anno Accademico 2012-2013

A Gessica e Gianni

INDICE

INTRODUZIONE.....	7
-------------------	---

Capitolo 1

Fisiologia delle cellule miocardiche	9
1.1 La membrana lipidica e i canali ionici	9
1.1.1 I canali ionici	10
1.1.2 Proteine trasportatrici.....	12
1.2 Il potenziale d'azione cardiaco	14
1.2.1 Dinamica del potenziale d'azione cardiaco	15
1.2.2 Accoppiamento eccitazione – contrazione cardiaca	18
1.2.3 Variabilità dei potenziali d'azione nelle diverse regioni del cuore	20

Capitolo 2

Analisi e modellistica cardiaca	23
2.1 Tecniche di indagine elettrofisiologiche	23
2.1.1 Il Patch Clamp	23
2.1.2 Voltage Clamp, Current Clamp e AP Clamp.....	25
2.1.3 Dynamic Clamp	27
2.2 La modellistica cardiaca	31
2.2.1 storia dei modelli cellulari	32
2.2.2 Il modello di Hodgkin-Huxley e i modelli Markoviani.....	33
2.2.3 il modello Luo-Rudy di miocita ventricolare	38

Capitolo 3

Il modello I_{Kr} e sue applicazioni	41
3.1 Il modello I_{Kr} e la sperimentazione in dynamic clamp	41
3.2 Risultati ottenuti	44

Capitolo 4

Implementazione in Matlab	47
4.1 La matrice 3D	47
4.1.1 Gestione delle tracce e della matrice 3D	51
4.2 Determinazione del picco di potenziale e algoritmi per la stima della fine delle regioni 3 e 4.....	53
4.2.1 Stima dell' APD90	53
4.2.2 Stima del ritorno a condizioni di riposo.....	55
4.3 Algoritmo per la determinazione della regione lineare.....	56
4.3.1 Determinazione dei punti centrali del flesso ripolarizzante e del plateau	56
4.3.2 Valor medio del vettore degli scarti, tra potenziale e tangente ad esso, come parametro decisionale di linearità.....	58
4.3.3 Calcolo della tangente alla curva in modo iterativo	60
4.3.4 Differenze tra il ciclo per il calcolo della tangente sul plateau e sul flesso.....	63
4.4 Estrazione dei parametri di interesse	63
4.5 Costruzione delle matrici dei risultati	66

Capitolo 5

Risultati Ottenuti dalla Elaborazione Automatica	69
CONCLUSIONI.....	79
BIBLIOGRAFIA	81
APPENDICE	83

INTRODUZIONE

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di realizzare un software applicativo che permetta l'analisi di potenziali d'azione cardiaci e in particolare di estrarne parametri caratteristici attraverso condizioni standardizzate e in modo automatico, con l'obiettivo finale di semplificare e velocizzare l'acquisizione di dati sensibili dai quali è possibile valutare la variabilità che le cellule ventricolari di *guinea pig*, oggetto di studio, offrono in risposta alla variazione di parametri caratteristici del modello matematico che descrive la ionica rapida di potassio I_{Kr} , simulando la corrente reale bloccata farmacologicamente, e iniettata nella cellula attraverso la tecnica di Dynamic Clamp.

Questo elaborato vuole fornire una panoramica del contesto in cui viene implementato questo strumento software, cercando di chiarire aspetti generici inerenti alle proteine delle membrane cellulari e alla generazione di potenziali d'azione nel cuore, alle tecniche di indagine che permettono di analizzare i segnali elettrici di origine biologica e ai principali modelli di simulazione cardiaci, quale quello di Hodgkin e Huxley introducendo aspetti specifici alla sperimentazione fatta per ottenere i tracciati di potenziali d'azione e delle corrispondenti correnti, che vengono poi analizzati con questo progetto.

L'elaborato è strutturato in cinque capitoli pensati per guidare il lettore attraverso una prima comprensione del potenziale d'azione passando poi ad una parte di metodi e modelli cardiaci atti al loro studio e analisi cercando di entrare sempre più nello specifico del tema trattato fino ad acquisire le conoscenze di base per affrontare l'analisi di questi dati.

Il primo capitolo si occupa di introdurre le proprietà fisiologiche delle cellule cardiache, con particolare riferimento alle proprietà di membrana e quindi alla generazione dei potenziali d'azione cardiaci, spiegando come questi generano la contrazione cardiaca e definendo quali sono i criteri che descrivono la variabilità tra i diversi potenziali d'azione.

Nel secondo capitolo vengono introdotte le tecniche di analisi elettrofisiologiche che permettono di interfacciare il materiale biologico alla strumentazione elettronica e quelle tecniche sviluppate per lo studio dei potenziali d'azione e delle

correnti che li generano; passando poi alla definizione dei modelli cardiaci e del loro scopo introducendo i modelli che seguono i formalismi di Hodgkin e Huxley e i modelli markoviani, giungendo in fine alla definizione del modello di Luo-Rudy che sta alla base dell'elaborazione descritta nel capitolo 3.

Il terzo capitolo descrive il lavoro svolto dalla Dott.ssa Chiara Bartolucci e dalla Dott.ssa Claudia Altomare per ottimizzare il modello Luo-Rudy e in particolare per descrivere in modo migliore una delle correnti ioniche responsabili della ripolarizzazione a fine del potenziale d'azione; lavoro a seguito del quale è stato possibile generare i tracciati dei quali vogliamo valutare la variabilità in risposta a variazioni dei parametri del modello, scopo per il quale si è deciso di creare un programma di calcolo automatico.

Il quarto capitolo presenta il tool sviluppato, a partire dalle scelte fatte per caratterizzare e descrivere un potenziale d'azione fino a descrivere gli algoritmi implementati per ottenere una caratterizzazione standardizzata delle regioni in cui si è scelto di suddividere il tracciato del potenziale, presenta il calcolo dei parametri di interesse e la loro gestione in matrici di dati.

Infine nel quinto capitolo vengono illustrati i risultati ottenuti dall'elaborazione automatica e ne viene fatto un confronto con quelli ottenuti dall'elaborazione manuale, per valutare similitudini e differenze.

CAPITOLO 1

Fisiologia delle cellule miocardiche

Questo capitolo ha come scopo di introdurre i concetti alla base di questo elaborato, ovvero cos'è un potenziale d'azione, quali sono i meccanismi alla base delle funzionalità cardiache per andare cosa sono l'APD (*action potential duration*) e BVR (*beat to beat variability*). In particolare in relazione a cellule cardiache ventricolari oggetto di questo studio.

1.1 La membrana lipidica e i canali ionici

Le membrane cellulari sono composte da un doppio strato di fosfolipidi nelle quali sono incastonate diversi tipi di proteine, le quali possono affacciarsi ad un solo lato della membrana (proteine periferiche), e queste hanno in genere funzioni enzimatiche, oppure possono anche occupare per intero tutto lo spessore della membrana (proteine integrali).

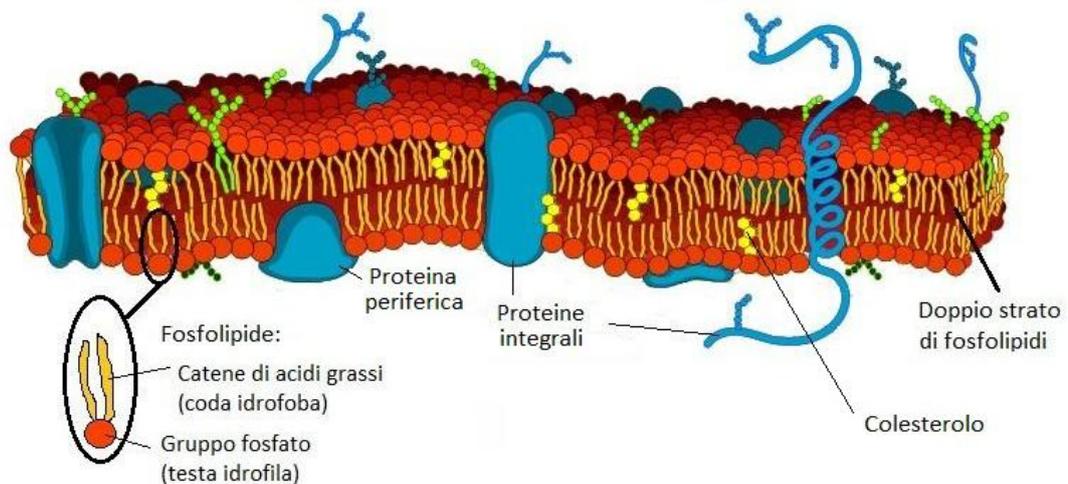


Figura 1.1- Membrana Cellulare[1].

Fra queste tipologie di proteine vi sono alcune che permettono il passaggio di sostanze tra i due ambienti separati dalla membrana il liquido extracellulare e quello intracellulare (citosol). Esse vengono chiamate proteine di trasporto e possono essere distinte in base al tipo di energia che sfruttano per far muovere le sostanze, ovvero vengono definite di trasporto passivo se sfruttano il gradiente chimico e/o elettrico della sostanza da trasportare, come i canali ionici, oppure

vengono definite di trasporto attivo se sfruttano l'ATP come fonte di energia per il trasporto delle sostanze.

Molte di queste proteine hanno la caratteristica di modificare la propria forma in funzione di stimoli esterni, come molecole, o di una variazione del potenziale di membrana. Grazie a queste caratteristiche le proteine di membrana svolgono un ruolo essenziale nella modifica delle proprietà elettriche e meccaniche dei vari tipi di cellule.

Segue ora una breve panoramica dei principali trasportatori di Na^+ , K^+ e Ca^{2+} che sono i principali attori nel generare i potenziali d'azione cardiaci.

1.1.1 I canali ionici

Le proteine canale sono costituite da subunità di proteine transmembrana che formano un agglomerato con un tunnel al centro. Quando i canali ionici sono aperti decine di milioni di ioni al secondo possono attraversarli rapidamente senza ostacoli.

I canali ionici hanno due fondamentali proprietà: la permeazione ionica e la capacità di controllo del flusso ionico (*gating*).

La permeabilità selettiva, dei canali ionici, a specifici ioni è un metodo di classificazione di queste proteine. I canali ionici possono essere specifici per uno ione, oppure possono consentire il passaggio a ioni simili per dimensioni e valenza; la loro selettività è determinata dal diametro del suo poro centrale e dalla carica elettrica degli amminoacidi che delimitano il lume del canale.

Alcuni di questi canali sono sempre aperti, mentre altri sono muniti di “cancelli” che possono aprirsi o chiudersi in risposta a diversi stimoli, possono in questo modo regolare il flusso di ioni che li attraversano. I cancelli dei canali ionici altro non sono che parte della proteina che in seguito a sollecitazioni (chimiche, elettriche o meccaniche) cambia la propria conformazione assumendo uno stato che occlude o libera il canale ionico. La maggioranza dei canali ionici cardiaci è di tipo voltaggio dipendente, ma ve ne sono anche di ligando-dipendenti come i canali per lo ione K^+ attivati dall'acetilcolina, situati dunque nelle regioni sinaptiche tra neurone e fibra muscolare; ne esistono anche di dipendenti da stiramenti meccanici e quindi sensibili alle contrazioni cardiache.

L'analogo elettrico di un canale ionico è una resistenza e il suo inverso è dunque una conduttanza in accordo con la legge di Ohm $I = \Delta V/R = \Delta V G$, dove ΔV

indica il potenziale di membrana e I la corrente che attraversa la membrana. In termini elettrici quando si ha l'apertura di un certo numero di canali ionici si ha quindi un incremento della conduttanza elettrica di membrana che coincide con un aumento di permeabilità della stessa per lo specifico ione o ioni a cui i canali permettono il transito.

Tra i più importanti canali ionici nelle cellule del cuore vi è sicuramente il canale per lo ione Na^+ la cui struttura è mostrata in figura 1.2. Questa proteina è costituita da una subunità α che a sua volta è formata da quattro domini, ognuno fatto da sei strutture elicoidali, denominati segmenti da S1 a S6, che attraversano la membrana cellulare e formano al centro un poro selettivo al solo ione sodio. L'apertura e chiusura di questo canale ionico è sensibile alle variazioni di potenziale elettrico transmembrana e il sensore di voltaggio è identificato nell'elica S4 di ognuno dei 4 domini che costituiscono la proteina; il funzionamento di tale sensore è dovuto al fatto che l'elica S4 contiene residui amminoacidi carichi positivamente. Il sensore una volta attivato si sposta permettendo il passaggio degli ioni, mentre un altro lembo della proteina ne occlude il lume ma con maggiore lentezza; i due apparati vengono chiamati anche cancello di attivazione e di inattivazione rispettivamente. Affinché agli ioni sia permesso il transito occorre che entrambi i cancelli siano aperti, mentre la cinetica di attivazione degli stessi è alla base della regolazione dei flussi ionici attraverso il canale.

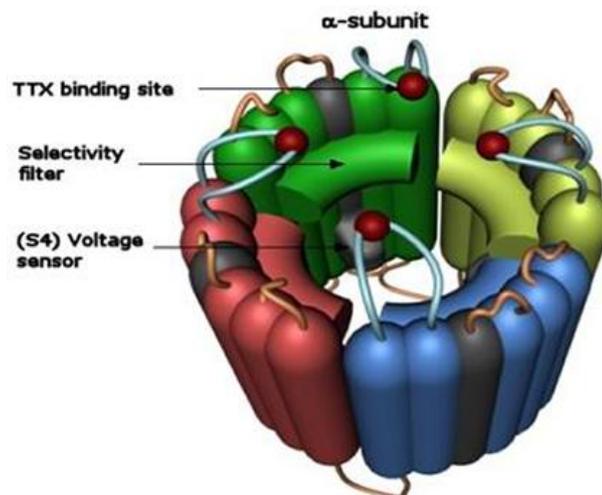


Figura1.2- Struttura del canale per il Na^+ [2].

Nel muscolo cardiaco esistono due tipi di canali del Ca^{2+} che trasportano lo ione nelle cellule: il tipo L (*low threshold type*) e il tipo T (*transient type*). La struttura

risulta simile a quella del canale del sodio (4 domini di 6 segmenti transmembrana ciascuno) nonostante questa famiglia di canali sia composta da un numero maggiore di differenti subunità. Lo ione calcio è responsabile dell' accoppiamento eccitazione contrazione del miocardio oltre alla regolazione di attività enzimatiche e di altri canali ionici tra cui gli stessi canali del calcio.

Per quanto riguarda i canali dello ione K^+ a livello cardiaco essi possono essere classificati in tre ampie categorie: i canali voltaggio dipendenti che si attivano in risposta ad un potenziale d'azione e danno un contributo di corrente uscente dalla cellula (I_{to} , I_{Kr} e I_{Ks}), i canali responsabili di correnti rettificanti in ingresso (I_{KAch} e I_{KATP}) e quelli che danno un contributo pressoché costante durante l'attività elettrica della cellula (I_{Kp}). La struttura dei canali voltaggio dipendenti per lo ione potassio è tetramerica con quattro identiche subunità α , ognuna delle quali composta da sei segmenti transmembrana. I canali del potassio sono altamente regolati e sono alla base di cambiamenti nei potenziali cardiaci in risposta a variazioni della frequenza cardiaca.

1.1.2 Proteine trasportatrici

Questa tipologia di proteine, chiamate carrier, si legano a substrati specifici e li trasportano attraverso la membrana cambiando conformazione. Un carrier che trasporta un solo tipo di molecola viene detto uniporto, ma di maggiore interesse sono i carrier che trasportano più soluti contemporaneamente; se i soluti si muovono nella stessa direzione attraverso la membrana si ha un carrier simporto, mentre se i soluti viaggiano in direzioni opposte si ha un carrier antiporto.

Diverse tipologie di carrier possono operare per diffusione facilitata ovvero sfruttando il gradiente di concentrazione delle molecole che trasportano, oppure per trasporto attivo quando trasportano soluti contro il proprio gradiente. Il trasporto attivo può essere primario nel caso venga utilizzata l'ATP come fonte di energia, o secondario quando si sfrutta il gradiente di un soluto per trasportare anche un altro soluto contro il proprio gradiente.

Al contrario dei canali ionici, i carrier operano più lentamente e in relazione alla generazione di potenziali d'azione, la loro funzione principale è quella di ristabilire e mantenere il potenziale di riposo al termine della ripolarizzazione.

Esempi di carrier che rivestono un ruolo nella gestione delle concentrazioni ioniche sono:

- Ca^{2+} - ATPasi responsabile del trasporto attivo dello ione calcio fuori dal sarcolemma o dentro il reticolo sarcoplasmatico in cui viene accumulato, in ogni caso contro il suo gradiente di concentrazione.
- Lo scambiatore $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ (NCX) il quale sfrutta il gradiente che spinge tre ioni sodio ad entrare nella cellula per espellere uno ione calcio, compiendo dunque un trasporto attivo secondario.
- $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - ATPasi o pompa sodio potassio, la quale compie un trasporto attivo primario trasportando tre ioni sodio fuori dalla cellula e due ioni potassio all'interno, contro i propri gradienti di concentrazione, con funzione dunque di antiporto.

La pompa sodio potassio è tra le principali proteine responsabili del mantenimento del potenziale di equilibrio nelle cellule, il suo funzionamento è illustrato nella figura 1.3.

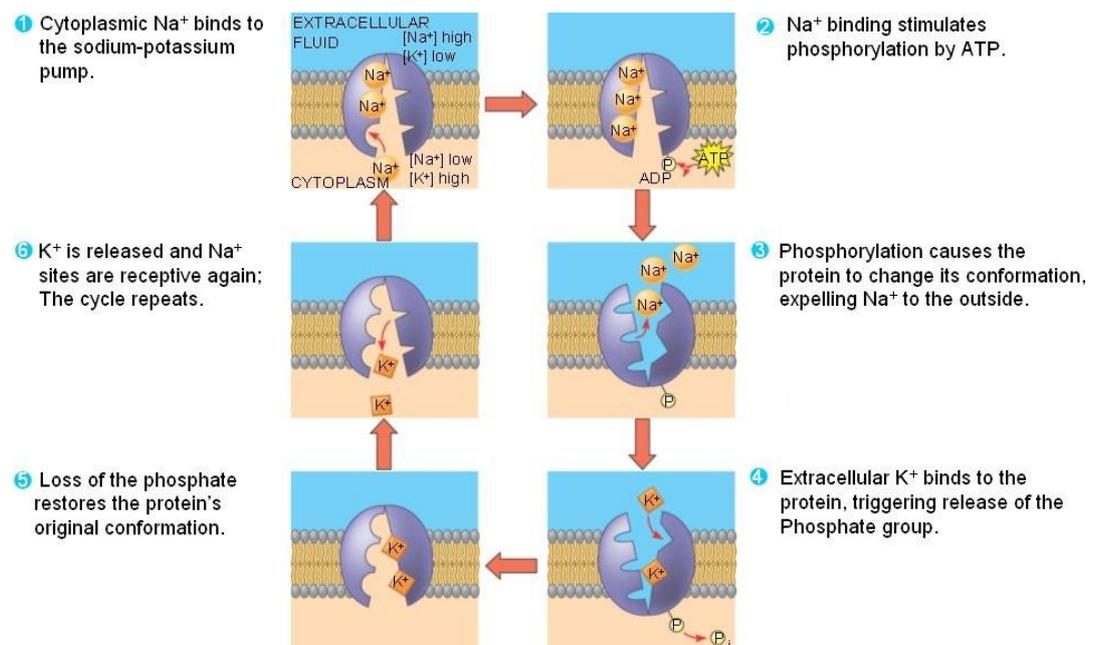


Figura1.3 - Funzionamento schematico della pompa sodio potassio[3].

Il sodio citoplasmatico si lega alle aree di legame della proteina che, in seguito anche al legame dell'ATP e alla fosforilazione, cambia conformazione e riversa gli ioni sodio all'esterno della cellula rendendo disponibili dei siti di legame per il potassio. In seguito il potassio extracellulare si lega alla proteina che con un'ulteriore perdita di un gruppo fosfato cambia ancora conformazione per tornare alla struttura originale e riversare quindi gli ioni potassio all'interno della cellula.

1.2 Il potenziale d'azione cardiaco

Il potenziale a cavallo di una membrana cellulare è determinato dalla distribuzione degli ioni ai due lati della membrana lipidica in un dato istante.

Tramite l'equazione di Nernst è possibile approssimare il potenziale di membrana, in particolare per lo ione potassio si ha:

$$E_K = -\frac{RT}{vF} \ln \left(\frac{[K^+]_{in}}{[K^+]_{out}} \right)$$

in cui le indicazioni 'in' e 'out' stanno ad indicare le concentrazioni intra ed extracellulari dello ione potassio, mentre 'v' indica la valenza dello ione. R è la costante universale dei gas perfetti ($8,314472 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), F la costante di Faraday ($96485,309 \text{ C mol}^{-1}$) e T è la temperatura assoluta espressa in Kelvin.

E_K è definito potenziale di Nernst, o potenziale di inversione per lo ione potassio, chiamato in questo modo perché se il potenziale di membrana, durante una sua variazione, incrocia questo valore si ha un'inversione del verso di percorrenza degli ioni, specifici per quel potenziale, nell'attraversamento della membrana lipidica e si ha dunque un'inversione della corrente ionica. Il potenziale di Nernst equivarrebbe al potenziale di membrana nel solo caso in cui ci fosse un unico ione diffusibile (lo ione potassio in esempio), questo perché l'equazione di Nernst non tiene conto delle altre specie ioniche e della loro permeabilità di membrana.

Una valutazione più accurata può essere fatta, in funzione delle concentrazioni delle diverse specie ioniche e delle loro permeabilità, tramite l'equazione di Goldman-Hodgkin-Katz.

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{\sum_i^N P_i [M_i^+]_{out} + \sum_j^M P_j [A_j^-]_{in}}{\sum_i^N P_i [M_i^+]_{in} + \sum_j^M P_j [A_j^-]_{out}} \right)$$

Nella formula di Goldman si noti come i cationi 'M⁺' e gli anioni 'A⁻' diano contributi opposti nel definire il potenziale di membrana.

1.2.1 Dinamica del potenziale d'azione cardiaco

Tutte le cellule sono capaci di generare potenziali elettrici a riposo a cavallo delle membrane cellulari e sono in grado di cambiare la loro permeabilità ai vari ioni. Ci sono però alcune cellule, dette cellule eccitabili che non rispondono solo passivamente a stimoli elettrici ma rispondono attivamente generando una risposta attiva che va sotto il nome di potenziale d'azione.

Il potenziale d'azione (AP) consiste in una rapida variazione del potenziale di membrana che termina quando esso torna al valore di riposo. In generale un potenziale d'azione è descrivibile tramite fasi caratterizzate dalla variazione della conduttanza di membrana ad alcuni ioni presenti nell'ambiente intra ed extra cellulare, in particolare gli ioni Na^+ , K^+ e Ca^{2+} .

Affinché si sviluppi un potenziale d'azione occorre che la membrana si depolarizzi fino ad un valore soglia (differente per tipo di cellula) tale per cui alcune proteine canale, voltaggio dipendenti, permettano il passaggio di ioni Na^+ all'interno della cellula responsabili della rapida depolarizzazione della stessa.

Il potenziale d'azione delle cellule cardiache ha caratteristiche peculiari rispetto a quelli di altre cellule, esso è caratterizzato da cinque fasi:

0. Questa è una fase di rapida depolarizzazione, causata quasi esclusivamente all'ingresso di Na^+ provocato da un repentino aumento della conduttanza di membrana a tale ione. A partire da uno stimolo sopra soglia (circa -60 mV) si ha l'apertura di canali per il sodio voltaggio dipendenti e il sodio segue il suo gradiente elettrochimico. L'ingresso di sodio nella cellula provoca una progressiva depolarizzazione del potenziale di membrana che a sua volta causa un aumento del numero di canali che si aprono, i quali, a loro volta, contribuiscono alla depolarizzazione secondo un meccanismo a feedback positivo. Questo meccanismo è alla base della rapidità della fase 0 che porta il potenziale da circa -80 mV a circa 35-50 mV nel giro di 1-2 ms.
1. La fase 0 termina con un picco massimo nella depolarizzazione del potenziale, che corrisponde al momento in cui la corrente depolarizzante è controbilanciata da quella ripolarizzante di ioni K^+ uscenti dal cardiomiocita, in figura 1.4 questa corrente è chiamata I_{to1} . A seguire il picco massimo di depolarizzazione si ha quindi una breve ripolarizzazione dovuta in parte alla chiusura ritardata dei canali del sodio precedentemente

apertisi, ed in misura maggiore dovuta all'apertura di canali per il potassio. Questa fase viene spesso definita di ripolarizzazione transiente.

2. La fase 2 è la più caratteristica del potenziale d'azione cardiaco; essa è chiamata fase di plateau perché il potenziale di membrana si mantiene pressoché costante e lo stato depolarizzato risulta perciò prolungato nel tempo, ciò è dovuto all'equilibrio tra fuoriuscita di ioni K^+ e ingresso di ioni Ca^{2+} nel cardiomiocita tramite canali detti L-type, ovvero dotati di una buona conduttanza, ma lenti e attivati da depolarizzazioni pronunciate, che iniziano ad aprirsi quando la depolarizzazione arriva intorno ai -10mV già nella fase 0, ma che mostrano il loro effetto solo in questa fase. Per quanto riguarda la corrente in uscita essa è data da tre contributi: I_{K1} , I_{Ks} e I_{Kr} ; la prima detta anche corrente rettificante in ingresso, mentre le altre due sono le componenti della corrente rettificante ritardata. Questa fase, non presente nei muscoli scheletrici, ha lo scopo di impedire lo sviluppo di vie di conduzione anomale e quindi meccanismi aritmogeni di rientro; il perdurato stato di depolarizzazione permette inoltre il rilassamento della contrazione prima del battito successivo, prevenendo la tetanizzazione del muscolo cardiaco che si verrebbe a causare per sommazione di AP successivi, così come può avvenire nel muscolo scheletrico. La tetanizzazione nel miocardio risulterebbe svantaggiosa impedendo un efficace riempimento dei ventricoli in fase diastolica.
3. La terza fase segue il plateau e corrisponde alla fase di ripolarizzazione nella quale l'ingresso di Ca^{2+} non controbilancia più la fuoriuscita di K^+ e si ha quindi il progressivo ritorno al valore del potenziale di riposo. Questa fase è causata dalla sincronia fra diminuzione della conduttanza al calcio e aumento della conduttanza al potassio che è sostenuta dalla ripolarizzazione stessa secondo un meccanismo a feedback positivo per cui la ripolarizzazione apre sempre più canali per il potassio.
4. La quarta fase corrisponde al periodo tra un potenziale d'azione e il successivo nella quale il valore del potenziale si mantiene sul valore di riposo (circa -80 mV).

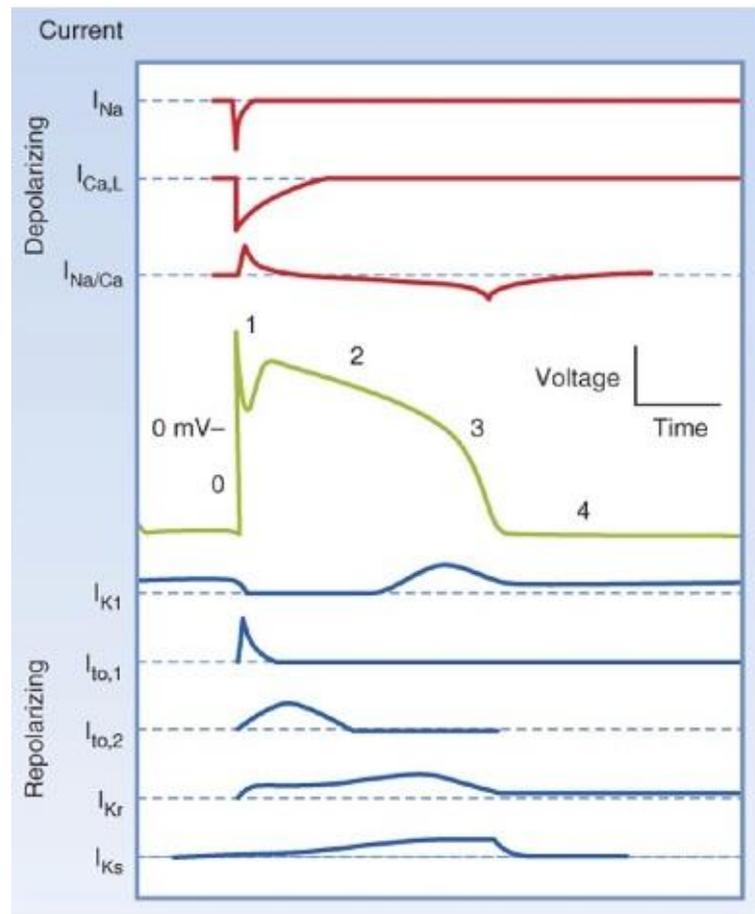


Figura 1.4- Correnti ioniche in relative ad un AP[4]

In figura 1.4 vengono mostrate le correnti ioniche responsabili dell'andamento di un potenziale d'azione, in rosso si ha le correnti che causano depolarizzazione e in blu quelle che sono responsabili della ripolarizzazione. Le correnti $I_{to,1}$ ed $I_{to,2}$ sono responsabili della breve ripolarizzazione della fase 1 e fanno riferimento agli ioni K^+ e Cl^- rispettivamente. Queste correnti sono anche chiamate correnti transienti in uscita e sono generate dall'apertura di canali veloci per i rispettivi ioni, infatti si manifestano subito dopo la fase 0. Le correnti I_{Kr} e I_{Ks} sono invece le principali responsabili della ripolarizzazione della fase 3 e come le precedenti sono correnti in uscita di ioni potassio ma i loro canali ionici sono più lenti e i loro effetti si manifestano infatti nella fase finale del potenziale d'azione. La corrente I_{K1} è responsabile del mantenimento del potenziale di riposo, al contrario delle altre correnti di potassio questa è una corrente entrante

1.2.2 Accoppiamento eccitazione – contrazione cardiaca

Il potenziale d'azione cardiaco è il segnale elettrico che comanda il ciclo di contrazione e rilassamento del muscolo cardiaco; quando esso giunge ad una cellula contrattile diffondendo lungo il sarcolemma e nei tubuli T induce l'apertura di canali per il Ca^{2+} a voltaggio dipendente di tipo L. Lo ione calcio, in corrispondenza della fase 2 di plateau, diffonde dentro la cellula e promuove l'apertura dei recettori-canali per la rianodina (RyR) nel reticolo sarcoplasmatico. Quando i canali RyR si aprono, il Ca^{2+} immagazzinato esce dal reticolo sarcoplasmatico ed entra nel citosol, generando una scarica di Ca^{2+} .

Lo ione calcio diffonde nel liquido intracellulare verso gli elementi contrattili, dove gli ioni si legano alla troponina e danno inizio alla creazione dei ponti trasversali necessari allo scorrimento dei filamenti di actina e miosina responsabile della contrazione, la quale, nel muscolo cardiaco, segue lo stesso meccanismo che avviene nel muscolo scheletrico.

Il rilassamento della cellula miocardica avviene nel momento in cui la concentrazione di calcio citoplasmatico diminuisce, il Ca^{2+} si stacca dalla troponina, la miosina rilascia l'actina e i filamenti contrattili scorrono indietro alla posizione di riposo. Come nel muscolo scheletrico, il Ca^{2+} è ritrasportato nel reticolo sarcoplasmatico con delle Ca^{2+} - ATPasi; tuttavia nel miocardio il calcio viene anche rimosso dalla cellula tramite lo scambiatore Na^+ - Ca^{2+} (NCX), col quale ogni ione calcio esce dalla cellula contro il proprio gradiente elettrochimico scambiandosi con tre ioni sodio in ingresso che seguono invece il proprio gradiente [5]. Sono questi due scambiatori a fare diminuire la concentrazione di calcio progressivamente e permettere dunque il distacco dello ione dalla troponina.

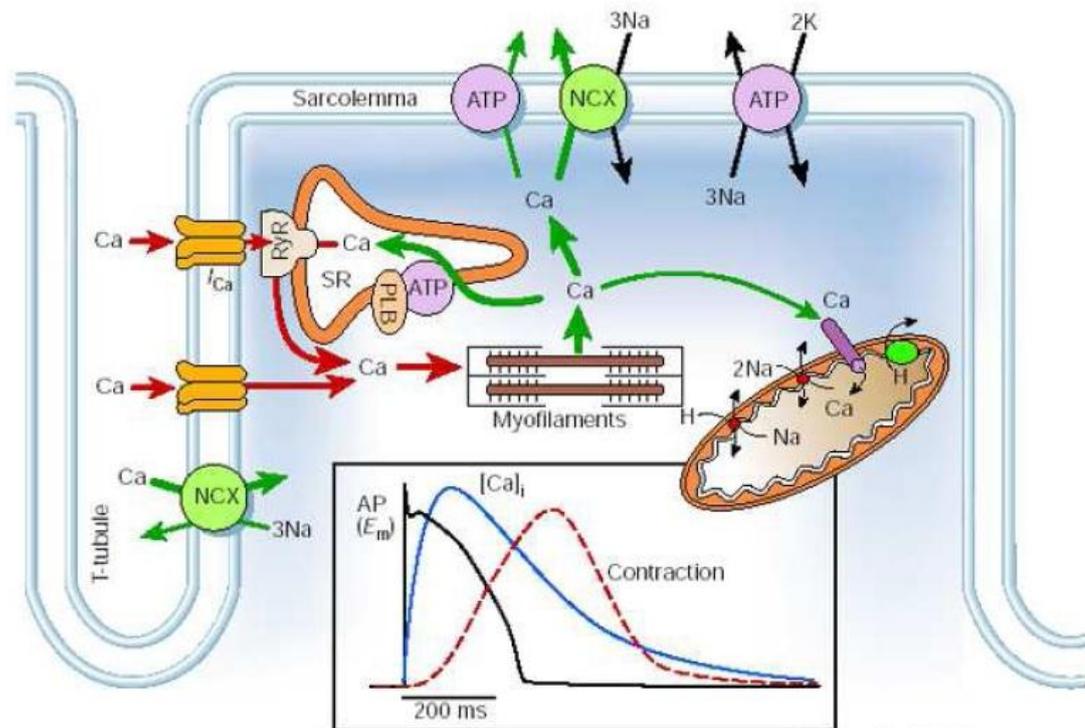


Figura 1.5- Accoppiamento Eccitazione-Contrazione [6].

Il segnale originale che comanda la contrazione dell'intero muscolo cardiaco nasce da un gruppo di cellule poste sull'atrio destro dietro la vena cava superiore. Questo gruppo di cellule, che viene chiamato nodo seno atriale (SA), hanno la caratteristica peculiare di avere un potenziale di membrana 'instabile' ovvero oscillante in continuazione senza mai raggiungere una vera e propria condizione di riposo. L'attività elettrica del SA viene imposta alle altre cellule del tessuto cardiaco attraverso tessuto specializzato nella conduzione di segnali elettrici, come il fascio di His nel setto intraventricolare e le fibre del Purkinje, ma viene anche passato fra cellule adiacenti grazie al fatto che esse sono un sincizio; il SA ha quindi funzione di pacemaker primario, dettando il ritmo delle contrazioni cardiache. Nel cuore anche altre cellule hanno la capacità di autogenerare potenziali elettrici, ma avendo una frequenza più bassa esse sono costrette a subire il ritmo del nodo seno atriale; tra queste cellule vi è il nodo atrioventricolare (AV) posto sul fondo dell'atrio destro all'imbocco del fascio di His. Il nodo AV è anche chiamato pacemaker secondario, è infatti lui a dettare il ritmo cardiaco nel caso il nodo SA per qualche motivo non funzionasse correttamente; in situazioni non patologiche ha invece funzione di rallentare la conduzione del potenziale d'azione

quando deve passare dagli atri ai ventricoli, permettendo l'alternanza tra contrazione atriale e ventricolare.

1.2.3 Variabilità dei potenziali d'azione nelle diverse regioni del cuore

Nel cuore esistono due principali tipologie di potenziale d'azione, esse si distinguono essenzialmente per la forma e per l'ampiezza dell'AP. Una delle tipologie viene definita risposta lenta ed è caratteristica del SA, pacemaker primario del cuore, del nodo AV e del tessuto specializzato per la conduzione che origina nel nodo SA e termina nel nodo AV. L'altra tipologia è denominata risposta rapida ed è caratteristica delle cellule miocardiche e delle fibre del Purkinje.

I tracciati della risposta lenta e veloce appaiono anche visivamente differenti, come si può vedere nella figura 1.8; infatti oltre ad avere una morfologia differente anche il potenziale di riposo e il valore di picco e la loro durata sono diversi. Un AP nodale varia tra -60 mV e 10mV, mentre un AP miocardico avviene tra -80mV e 35-50mV.

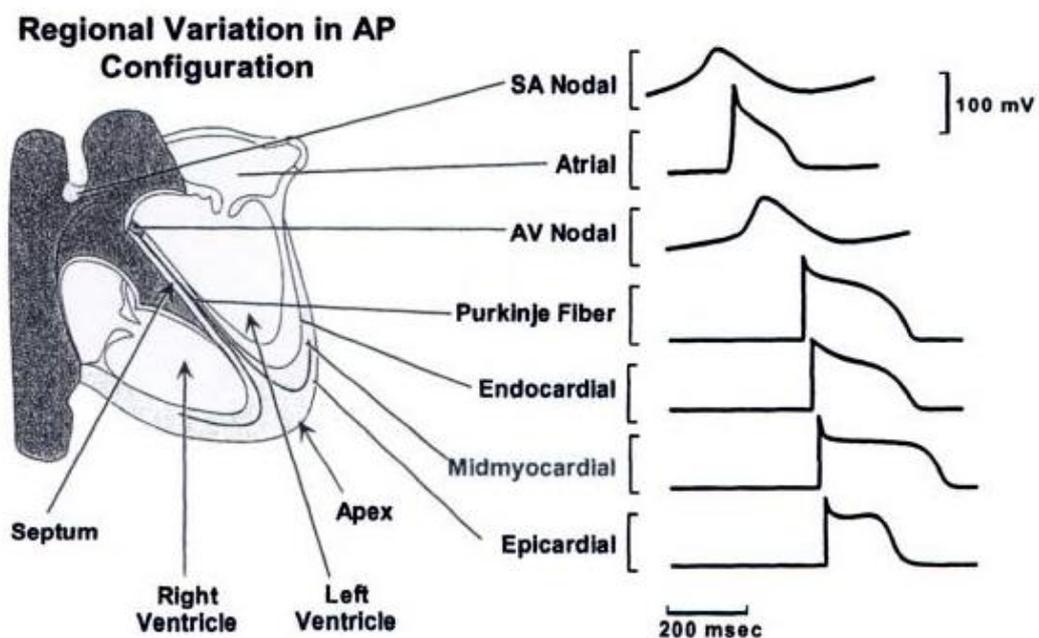


Figura1.6- Potenziali d'azione cardiaci [7].

Oggetto di questo studio sono stati i cardiomiociti ventricolari, pertanto i potenziali d'azione di cui si ha interesse sono gli ultimi tre in figura 1.6.

Come si vede dalla figura tra gli AP delle cellule ventricolari ci sono comunque differenze tra cellule dell'epicardio, mid-miocardio ed endocardio. Le cellule epicardiche hanno una fase 1 più accentuata e una durata del potenziale d'azione (APD) minore rispetto alle altre, mentre l'APD maggiore si ha nelle cellule del mid-miocardio. Le differenze nella durata dei potenziali d'azione sono da attribuire in larga parte alla diversa concentrazioni di canali del potassio da cellula a cellula; in particolare ai canali ionici responsabili delle correnti I_{Ks} e I_{Kr} .

Un aspetto di fondamentale importanza di questo lavoro è quello di definire numericamente la variabilità fra i vari potenziali d'azione; in particolare in riferimento ai potenziali consecutivi che posso avere su una singola cellula oggetto di studio, piuttosto che la variabilità tra cellule appartenenti a diverse regioni del cuore.

I parametri che riportano una stima della variabilità sono l'APD, già introdotta in precedenza, e la variabilità battito-battito (BVR); essa è definita come:

$$BVR = \sum_n \frac{|APD90_{n+1} - APD90_n|}{nbeats * \sqrt{2}}$$

Dove 'APD90' è la durata del potenziale d'azione valutata al 90% del valore di ripolarizzazione, 'n' identifica l'n-esimo potenziale d'azione e 'nbeats' rappresenta il numero totale di battiti presi come campione.

CAPITOLO 2

Analisi e modellistica cardiaca

Questo capitolo ha la funzione di introdurre le tecniche di misurazione delle correnti ioniche e potenziali d'azione, e i principali modelli cardiaci in grado di simulare il funzionamento cellulare; terminando con una breve illustrazione del modello Luo-Rudy di cardiomiocita ventricolare in quanto modello alla base dello studio fatto.

2.1 Tecniche di indagine elettrofisiologiche

Con la scoperta delle proprietà elettriche delle cellule, è stato necessario sviluppare protocolli e strumentazione idonei allo studio delle correnti ioniche che attraversano le membrane. A partire dalle tecniche di interfacciamento tra materiale biologico e acquisizione di segnali elettrici fino a metodi per la simulazione della normale attività elettrica delle cellule miocardiche in situazioni fisiologiche con l'obiettivo di affinare sempre meglio le conoscenze in campo elettrofisiologico.

2.1.1 Il Patch Clamp

Per studiare queste correnti è necessario, per prima cosa, stabilire un collegamento elettrico tra la cellula e la strumentazione elettronica, ciò viene fatto per mezzo di una micropipetta di vetro al cui interno sono posti un elettrodo (Argento – Cloruro d'argento) e una soluzione ionica. La pipetta viene fatta aderire alla membrana cellulare tramite una leggera suzione che permette la formazione di un sigillo tra pipetta e membrana. Questa operazione fa sì che si venga a formare una resistenza elettrica dell'ordine dei $G\Omega$ fra l'elettrodo interno alla pipetta e il liquido extracellulare, in questo modo la stragrande maggioranza della corrente di membrana fluisce all'interno della pipetta e non all'esterno. Questa tecnica di interfacciamento denominata *Patch Clamp*, può essere attuata in quattro varianti: *Cell-Attached (CA)*, *Inside-Out Patch (IOP)*, *Whole-Cell (WC)* ed *Outside-Out patch (OOP)*.

La tecnica di *Cell Attached* corrisponde alla fase iniziale di tutte le tecniche di *Patch Clamp*, ovvero consiste nel collegamento della pipetta alla membrana con la formazione del *giga-seal*. Questo approccio permette di studiare una porzione della membrana senza romperla o strapparla alla cellula.

Dalla configurazione CA si solleva la micropipetta strappando una porzione di membrana cellulare; la pipetta viene poi esposta all'aria dove i lembi di membrana, che non sono a bagno del liquido della stessa, si seccano e si staccano, lasciando la sola porzione di membrana interna alla pipetta. Rimettendo ora a bagno l'elettrodo nel liquido di perfusione si ha la porzione che precedentemente si affacciava sul citoplasma risulta ora esposta alla soluzione extracellulare; per questo motivo questa configurazione è chiamata Inside-Out ed essa è usata nello studio delle proprietà di un singolo canale ionico.

La configurazione *Whole-Cell* consente di misurare la variazione di corrente attraverso l'intera cellula. A partire dalla CA si rompe la porzione di membrana nella pipetta attraverso una suzione più forte o attraverso un breve impulso di tensione. Questa tecnica, mettendo in comunicazione diretta il citoplasma col liquido all'interno della pipetta, soffre di un disturbo chiamato *run-down* o *wash-out* dovuta alla diluizione delle due soluzioni, la quale causa la variazione della corrente di membrana nel tempo e ciò impone un limite temporale alle registrazioni. Per risolvere questo problema è stato messo a punto una tecnica denominata *perforated patch* che consiste, a partire dalla configurazione CA, nell'utilizzare degli antibiotici nel liquido interno alla micropipetta in vetro che formano dei pori sulla membrana cellulare, senza però romperla, permettendo così la diffusione di ioni monovalenti e garantendo un collegamento elettrico, ma limitando il passaggio a molecole di dimensioni maggiori. In questo modo è possibile effettuare registrazioni più prolungate rispetto alla WC tradizionale.

La configurazione *Outside-Out Patch* si ottiene partendo dalla configurazione WC sollevando la pipetta e strappando i lembi di membrana attaccati alla stessa. I lembi si richiudono poi a formare una vescicola, in questo modo la parte esterna della membrana ricostruitasi sulla pipetta si trova a contatto col liquido extracellulare. Questa configurazione è utilizzata nelle proprietà di singolo canale ionico attivato da ligando.

In figura 2.1 sono mostrate le tipologie di *Patch Clamp* appena descritte e schematicamente illustrate le metodiche con cui si ottengono.

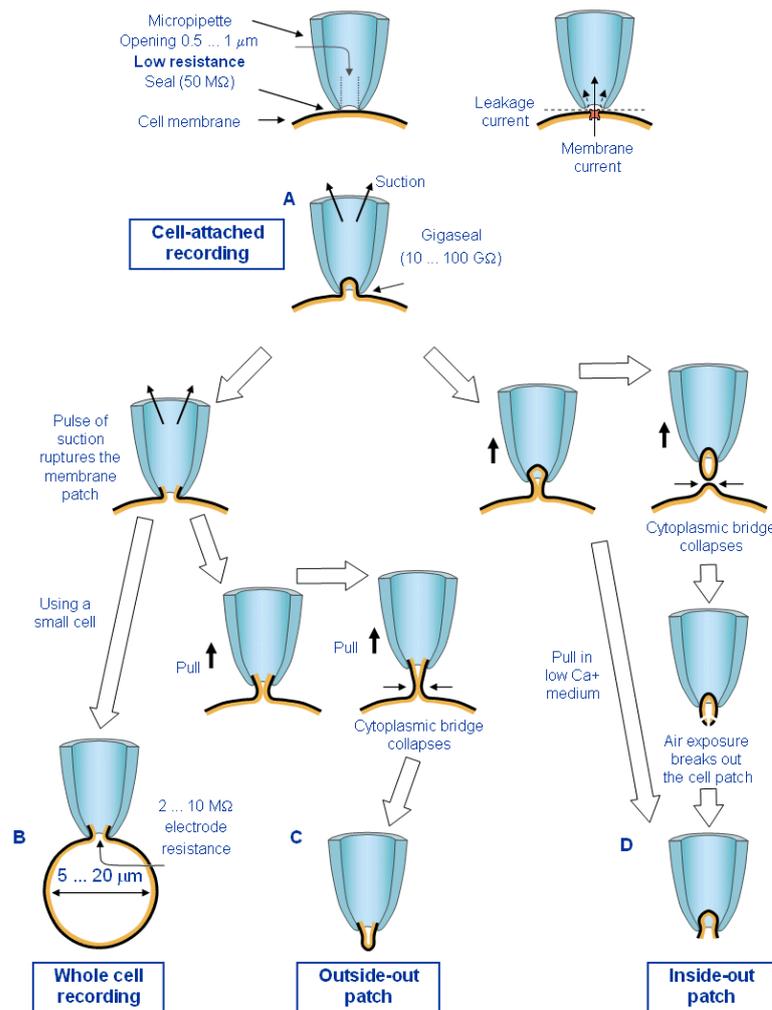


Figura2.1 – Patch clamp[8].

2.1.2 Voltage Clamp, Current Clamp e AP Clamp

È possibile ora procedere in diversi modi a seconda della necessità di studiare l'intera cellula (*Whole Cell*) o solo una porzione di membrana (*Inside Out Patch* o *Outside Out Patch*) ed eseguire quindi il protocollo scelto.

Il protocollo di *Voltage Clamp* è stato il primo ad esser realizzato nel 1947 da Cole su un assone di calamaro gigante, ma solo Hodgkin e Huxley, tra il '48 e il '50 si resero conto delle potenzialità di questa tecnica e fornirono, grazie ad esso, una completa descrizione quantitativa delle variazioni della permeabilità della membrana cellulare a sodio e potassio.

La tecnica di *Voltage Clamp* consiste nell'imporre al potenziale di membrana un andamento specifico, come un gradino di potenziale, misurando poi la corrente da iniettare nella cellula per mantenere il valore di potenziale costante. Il *Voltage Clamp* è un test che viene utilizzato per determinare quando i canali ionici si

aprono o chiudono; infatti l'apertura dei canali ionici, essendo voltaggio dipendente, può esser controllata attraverso la manipolazione del potenziale permettendo l'analisi della cinetica dei cambiamenti di stato di questi canali; ciò è dovuto al fatto che la corrente registrata è una corrente ionica e fornisce quindi una misura diretta dei cambi di permeabilità di membrana ai vari tipi di ioni.

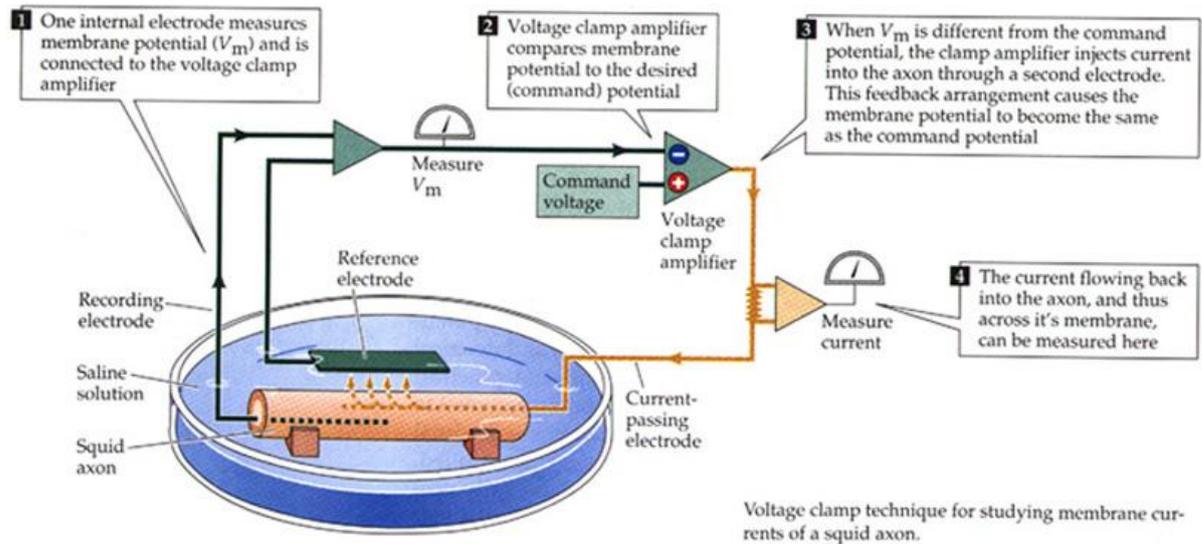


Figura2.2 – Tecnica di *Voltage Clamp* su assone di calamaro[9].

La corrente applicata alla cellula equivale alla corrente ionica netta (somma delle correnti ioniche entranti e uscenti) che attraversa la membrana cellulare e costituisce dunque l'informazione che si ottiene da tale metodica. Questa equivalenza è dovuta al fatto che per un potenziale costante la corrente capacitiva è nulla e quindi la corrente di membrana è solo quella ionica. La corrente di membrana può essere espressa infatti come:

$$I_m = I_i + I_c = I_i + C_m \left(\frac{dV_m}{dt} \right)$$

dove I_i rappresenta la corrente ionica, I_c rappresenta la corrente capacitiva, C_m è la capacità di membrana e V_m è il suo potenziale. Si ha una corrente capacitiva solo nell'istante iniziale e finale del gradino di potenziale, ma per il resto dell'impulso essa è nulla mantenendosi costante il potenziale.

Per valutare un solo tipo di corrente ionica alla volta è possibile bloccare alcuni canali ionici con farmaci o tossine, oppure è possibile effettuare una sostituzione ionica nel liquido di perfusione, per esempio sostituendo il cloruro di sodio con cationi non permeanti che bloccano la corrente entrante degli ioni Na^+ .

In modalità di *Current Clamp*, al contrario del *Voltage Clamp*, viene imposta la corrente e registrato il potenziale di membrana. La cellula viene stimolata tramite un treno di impulsi rettangolari in corrente le cui grandezze caratterizzanti sono l'ampiezza dello stimolo, la frequenza e il duty cycle. Attraverso una compensazione circuitale, della resistenza della pipetta, è possibile valutare la resistenza di membrana e quindi il suo inverso la conduttanza, in accordo con la legge di Ohm.

La tecnica dell'*AP Clamp* può essere intesa come una variante del *Voltage Clamp* in cui il potenziale di comando non è più un gradino di un prestabilito valore, ma bensì un potenziale d'azione preregistrato dalla cellula stessa in condizioni basali. Questo tipo di protocollo rende possibile osservare l'andamento della corrente in relazione ad un comportamento fisiologico del potenziale di membrana. Se si registra l'andamento della corrente prima e dopo l'applicazione di un bloccante è inoltre possibile fare un confronto e ottenere quindi informazioni più dettagliate.

2.1.3 Dynamic Clamp

Con il termine generico *Dynamic Clamp* si intende in realtà un insieme di tecniche strettamente collegate fra loro sviluppate nell'ambito dell'elettrofisiologia cardiaca e sono state inizialmente create per simulare giunzioni virtuali tra miociti isolati. Il *Dynamic Clamp* è basato sul più tradizionale *Current Clamp*, con la differenza che la corrente iniettata nel miocita non è nota a priori; essa è infatti ricalcolata da un calcolatore ciclicamente, il quale utilizza come dato di partenza il potenziale di membrana registrato in tempo reale per poi iniettare la corrente nella cellula tramite l'amplificatore collegato in *Patch Clamp*.

Con queste tecniche viene simulata dunque la conduttanza di membrana e iniettata una corrente nella cellula in funzione del valore di conduttanza dato, la quale varia nel tempo.

Il primo ad utilizzare il *Dynamic Clamp* fu Scott nel '79 con l'intento di studiare la sincronizzazione fra due cellule cardiache autoeccitabili. Scott creò un sistema in cui due cellule isolate, non fisicamente in contatto, possono essere accoppiate elettricamente a qualunque valore di conduttanza intercellulare desiderato tramite un circuito esterno che continuamente applica ad entrambe le cellule una corrente variante nel tempo del segno e ampiezza che avrebbero avuto se le cellule fossero

state fisicamente collegate da una *gap-junction*. In figura 2.3 è riportata la configurazione circuitale, usata da Scott, chiamata “Ersatz Nexus” dove variando la resistenza di connessione tra le due cellule (NEXUS) è possibile variare la corrente generata che è esprimibile tramite la legge di Ohm come: $I_N = (V_{m1} - V_{m2})/R_N$, nella quale V_{m1} e V_{m2} indicano i potenziali di membrana delle due cellule; la corrente I_N è poi iniettata in una cellula con segno positivo e nell’altra con segno negativo.

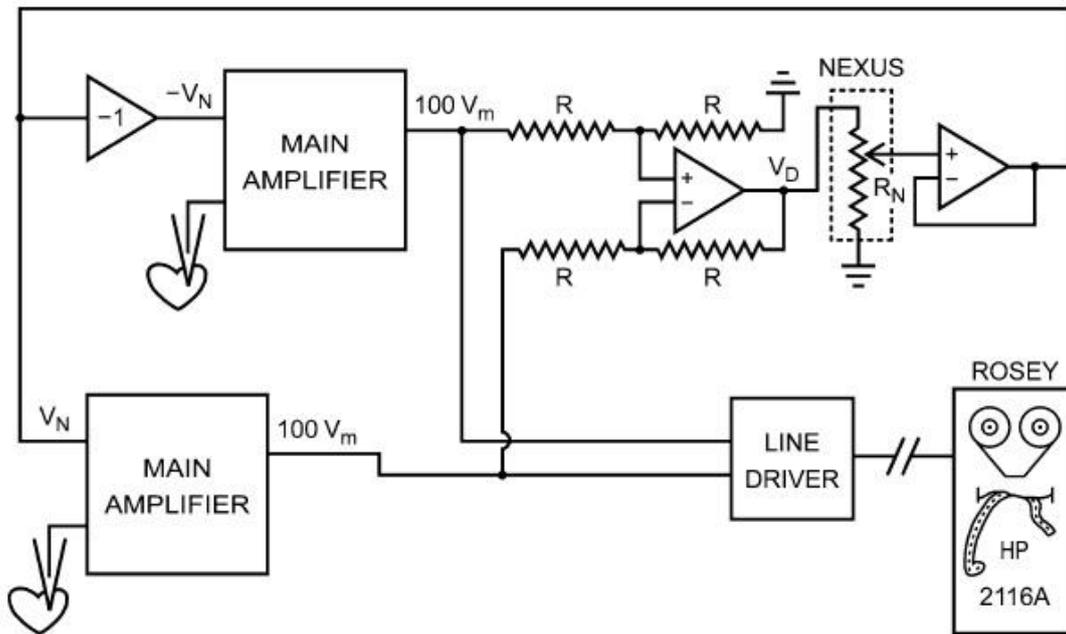


Figura 2.3 – Schema del circuito usato da Scott per studiare la sincronizzazione tra cellule miocardiche chiamato “Ersatz Nexus” [10].

Ad oggi in elettrofisiologia cardiaca possono essere distinte tre differenti configurazioni di *Dynamic Clamp*:

1. *Coupling Clamp*
2. *Model Clamp*
3. *Dynamic AP Clamp*

Il *Coupling Clamp* altro non è che la versione odierna per l’analisi della sincronizzazione tra cellule miocardiche, per la quale Scott implementò il suo “Ersatz Nexus”. Le differenze stanno nel fatto che i sistemi attuali sono digitali e che quindi i potenziali di membrana, sempre acquisiti in tempo reale, sono digitalizzati e gestiti da un apposito applicativo su personal computer il quale calcola poi la corrente da iniettare sulle singole cellule. Siccome i

potenziali di membrana possono cambiare molto rapidamente, questi sistemi digitali necessitano di una alta capacità di acquisizione, elaborazione dati e di iniezione della corrente, tipicamente questo ciclo deve esser compiuto in almeno 100 μ s.

Il *Dynamic Clamp* può anche essere utilizzato per simulare una conduttanza di membrana addizionale in un singolo cardiomiocita isolato. In questa configurazione, chiamata *Model Clamp*, il potenziale di membrana viene campionato in continuazione e mandato su un personal computer che calcola la corrente in funzione del potenziale acquisito, per mandare poi un comando di tensione ad un amplificatore il quale provvede poi a iniettare la corrente calcolata nel miocita. Il calcolo della corrente viene fatto sulla base di un modello matematico prestabilito. Questa tecnica può esser utilizzata per iniettare nella cellula una specifica corrente, che vuole essere il più simile possibile (in base al modello matematico) ad una componente della corrente di membrana totale come può essere la I_{Na} , I_{Kr} o la I_{Ks} . Un ulteriore utilizzo di questa tecnica è quello nel quale la corrente iniettata nel miocita rappresenta la corrente che fluisce tramite *gap-junction* da un altro miocita che è però simulato virtualmente.

L'ultima tecnica di più recente sviluppo è quella del *Dynamic AP Clamp* grazie alla quale è possibile lo studio di una singola corrente ionica in un contesto più fisiologico rispetto l'*AP Clamp*. Volendo ad esempio studiare l'alterazione di una corrente, in un cardiomiocita, dovuta alla mutazione del canale ionico associato, si può simulare la mutazione del canale bloccandolo farmacologicamente nel cardiomiocita e sostituendo la sua corrente con una registrata da una cellula HEK-293 in regime di *AP Clamp* col potenziale d'azione proprio del miocita. L'effetto ottenuto è quello di sottoporre i canali ionici mutati nella cellula HEK al potenziale d'azione del cardiomiocita e di iniettare quindi la corrente mutante registrata dalla cellula HEK nel miocita. Per fare questa manipolazione occorre che il cardiomiocita sia sottoposto a *Current Clamp* e la cellula HEK ad *AP Clamp*. Il vantaggio di questa tecnica è che la corrente mutante è effettivamente presente nella membrana del cardiomiocita come se fosse stata sostituita alla corrente fisiologica, avendo inoltre la possibilità di registrare la corrente al passaggio sul calcolatore

elettronico e di poterla studiare durante un potenziale d'azione che essa stessa contribuisce a generare.

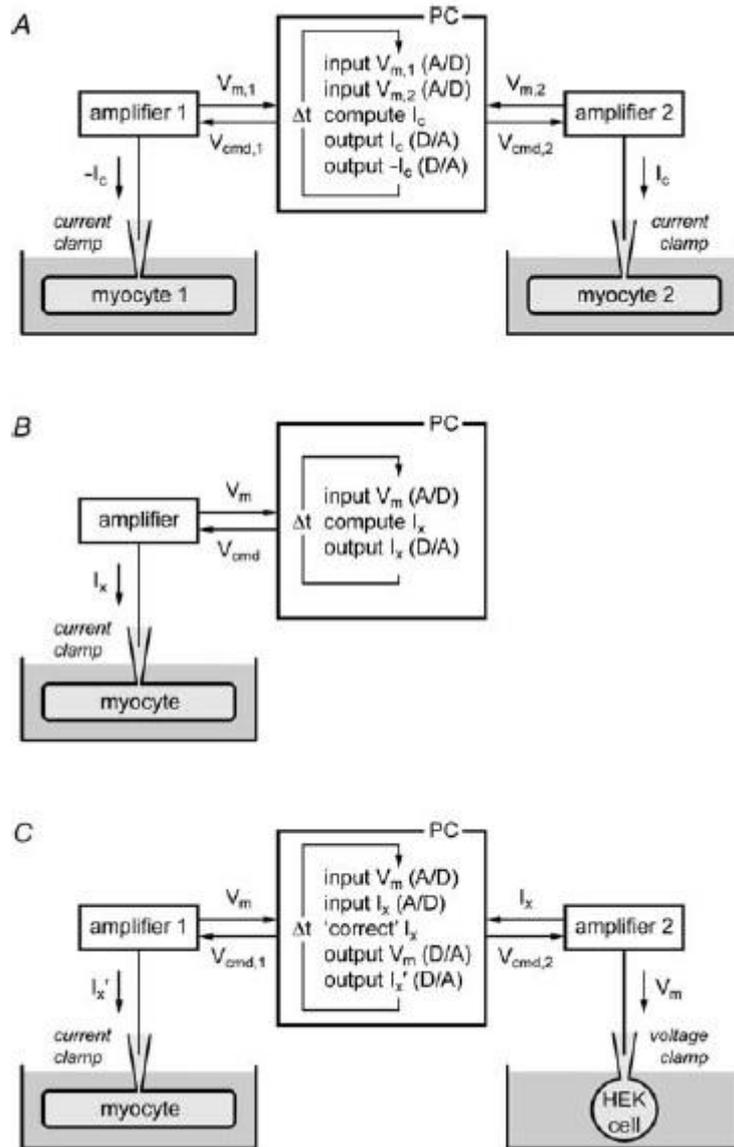


Figura 2.4 – Le diverse configurazioni di *Dynamic Clamp*[10].

In figura 2.4 sono mostrate gli schemi funzionali delle configurazioni precedentemente descritte, in A si ha la tecnica di *coupling clamp*, in B la configurazione *model clamp* mentre in C si ha la *dynamic AP clamp*.

Nell'utilizzo e implementazione delle diverse tecniche di *Dynamic Clamp* ci sono degli aspetti critici di cui bisogna tener conto affinché il sistema che si va ad utilizzare sia il migliore e consenta quindi uno studio che si cerca sempre di far tendere ad un errore nullo o quantomeno limitato.

Una prima scelta a cui si va incontro nell'implementare questa tecnica è scegliere se utilizzare un hardware dedicato al proprio scopo oppure scegliere un'implementazione via software. Un hardware dedicato può avere il vantaggio di avere un'alta velocità di lavoro con un ritardo minimo da ingresso a uscita di 20µs, ma hanno il difetto di rendere difficoltose le modifiche in corso d'opera, che invece è molto facile fare se si implementa il sistema via software, ciò lo rende preferibile nonostante sia meno prestante in termini di ritardo ingresso uscita, in larga parte dovuto alle conversioni A/D e D/A. Un altro aspetto importante da considerare è la risoluzione delle correnti iniettate che è ovviamente una problematica dei soli sistemi digitali; al fine di minimizzare gli errori introdotti dalla quantizzazione sono necessari almeno 16 bit, ovvero 2^{16} livelli di quantizzazione. Per implementare un sistema software non è necessaria una moltitudine di sistemi hardware basta avere un'interfaccia tra ambiente analogico e ambiente digitale ovvero una scheda di acquisizione dati (DAQ) che compie le conversioni A/D e D/A, occorre inoltre un'interfaccia tra ambiente biologico e ambiente elettrico analogico e questa è data da un elettrodo collegato in patch clamp; da ciò si deduce facilmente anche che i costi per implementare un sistema software siano inferiori rispetto ad un sistema hardware dedicato.

Il limite principale delle tecniche di *Dynamic Clamp* consiste nel fatto che sebbene possa essere simulato l'effetto delle correnti ioniche sulle cellule in esame, non può invece essere riprodotto l'effetto che le correnti fisiologiche hanno sulle concentrazioni ioniche intracellulari. Una seconda limitazione è l'errore che può essere introdotto a causa dell'inevitabile ritardo tra il segnale ricevuto in ingresso e quello in uscita. Un'ulteriore limitazione vi può essere in particolare nel *model clamp* dove le correnti iniettate sono descritte da equazioni che sono quindi delle approssimazioni matematiche delle correnti reali[10].

2.2 La modellistica cardiaca

Il modello è un'entità che viene sviluppata per rappresentare una situazione reale più complessa, in modo tale da approssimare quanto meglio possibile la realtà; essi sono poi usati per capire, predire, simulare, fare ipotesi e definire l'entità originale a cui il modello è ispirato.

Le tipologie di modello di interesse in elettrofisiologia sono di tipo matematico, ovvero un insieme di equazioni che descriva il comportamento di una parte o di

tutta la cellula cardiaca. Data la complessità delle strutture cardiache, del loro funzionamento e della loro reciproca influenza, a livello cellulare e non, le equazioni che descrivono la situazione reale possono risultare troppo complesse per esser utilizzate o anche solo definite; è pertanto necessario, nello sviluppo di un modello, considerare il livello di dettaglio al quale si vuole far tendere il proprio modello.

In seguito i dati che si ottengono dalle tecniche di indagine elettrofisiologiche, oltre che poter esser semplicemente interpretati, possono servire per la modifica dei modelli precedentemente usati o per crearne di nuovi. Confrontando i dati che ci si attende dal modello e i dati sperimentali si è infatti in grado di valutare le scelte fatte, se si è ben compreso il fenomeno fisico che si vuol modellare e se sono state fatte le scelte giuste nelle approssimazioni introdotte e nelle valutazioni in fase di sviluppo del modello. Viceversa osservando le lacune mostrate dal modello si è in grado di decidere sulle modalità dei futuri esperimenti.

Queste interazioni tra esperimenti e simulazioni sono fondamentali per incrementare le conoscenze sui meccanismi alla base del potenziale d'azione delle cellule eccitabili.

2.2.1 storia dei modelli cellulari

Uno dei primi modelli cellulari ad esser stato sviluppato fu il modello Hodgkin – Huxley (HH); negli anni '50, lavorando in collaborazione con Katz, su un assone di calamaro gigante attraverso la tecnica di *voltage clamp*; i due riuscirono a caratterizzare la dipendenza del potenziale di membrana dalle proprietà cinetiche delle correnti ioniche. Tramite i loro esperimenti, intuirono come una corrente in ingresso di ioni sodio fosse responsabile della forte deflessione positiva del potenziale di membrana dell'assone e che una corrente in uscita dalla cellula di ioni potassio fosse invece la causa della ripolarizzazione che segue lo stato depolarizzato in un AP. A partire da questi risultati HH costruirono un modello matematico che testasse come i flussi degli ioni di sodio e potassio potessero generare la morfologia del potenziale d'azione che essi avevano registrato nell'assone.

Dopo HH la storia dei modelli cardiaci prosegue con modelli di crescente complessità dovuta all'aumento del numero di variabili, necessaria alla sempre

maggior importanza data alla dinamica del calcio, e all'utilizzo di nuovi paradigmi di modellazione quali quelli di Markov.

I primi modelli di AP cardiaci vennero formulati da McAllister et al.(1975) e da Beeler & Reuter (1977), rispettivamente un modello di cellula del Purkinje e uno di miocita ventricolare; entrambi i modelli erano basati sui formalismi introdotti da HH, per descrivere le correnti ioniche, e come il loro modello assumono che le concentrazioni ioniche rimangano costanti durante l'AP [11].

In seguito risultò importante considerare che nella realtà si ha una grossa variazione delle concentrazioni ioniche durante il potenziale d'azione, in particolare per lo ione Ca^{2+} che attraverso il suo ingresso nella cellula innesca il rilascio da parte del reticolo sarcoplasmatico. Al fine di riprodurre con maggior fedeltà la morfologia di un AP vennero sviluppati nuovi modelli chiamati di seconda generazione che tenessero in considerazione anche gli effetti dovuti alle variazioni delle concentrazioni ioniche. Il primo modello cardiaco di seconda generazione che incorporasse informazioni dettagliate riguardo le variazioni dinamiche degli ioni fu quello di DiFrancesco-Noble (DiFrancesco & Noble 1985) che modellava l'AP di una cellula di Purkinje di cui Rasmusson et al.(1990) svilupparono una versione simile per una cellula atriale di rana. Un ulteriore modello di seconda generazione è il modello dinamico Luo-Rudy (LRd) di una cellula ventricolare di *guinea pig* (Luo & Rudy 1994).

Il carattere innovativo di questa nuova classe di modelli deriva dal fatto che venne incluso nei modelli il reticolo sarcoplasmatico come compartimento interno alla cellula e quindi il sistema di gestione del calcio intracellulare; per considerare le variazioni di concentrazioni ioniche fu necessario modellare anche gli effetti delle pompe e degli scambiatori responsabili del loro controllo.

2.2.2 Il modello di Hodgkin-Huxley e i modelli Markoviani

Il modello di HH è descritto dal circuito in figura 2.5, nel quale la membrana lipidica è rappresentata da una capacità C_m ai cui capi si ha il potenziale di membrana V_m , la membrana può esser rappresentata in questo modo notando come le concentrazioni ioniche si accumulano ai suoi bordi in quanto elettricamente isolante.

Vengono inoltre rappresentate le correnti ioniche di sodio e potassio più una corrente di perdita (corrente di *leakage*, I_L) che descrive il movimento

complessivo di altri anioni; tutti questi flussi ionici sono originati nel cercare di raggiungere il proprio potenziale di equilibrio, rappresentato nel circuito da un generatore di tensione e calcolabile a partire dall'equazione di Nernst, ma la forza complessiva che spinge gli ioni ad attraversare la membrana è data dalla differenza tra il potenziale di membrana e dal proprio potenziale di equilibrio; questa forza viene denominata *driving force*.

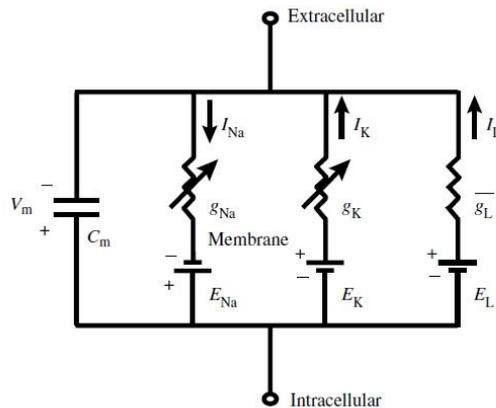


Figura2.5 – Analogo elettrico del modello di membrana di Hodgkin e Huxley [11].

Nota la *driving force* per ogni tipologia ionica è possibile esprimere la propria corrente come:

$$I_{ion} = g_{ion} (V_m - E_{ion})$$

in cui ' g_{ion} ' rappresenta la conduttanza di membrana al generico ione; nel circuito tale parametro è rappresentato tramite il suo reciproco ovvero una resistenza di membrana.

Hodgkin e Huxley hanno poi valutato la conduttanza di membrana dei singoli ioni come il prodotto fra la conduttanza massima e una variabile definita di *gating* che esprime la probabilità degli ipotetici cancelli (*gate*) di essere aperti, oppure la si può pensare anche come la frazione di cancelli sul totale dei *gate* di canale, aperti in un dato istante; in ogni caso la variabile di *gating* esprime un valore adimensionale compreso fra 0 (tutti i *gate* chiusi) e 1 (tutti i *gate* aperti), il quale moltiplicato per la conduttanza massima produce una diminuzione della stessa. Si ottiene quindi che la corrente ionica espressa in precedenza diviene:

$$I_{ion} = X \overline{g_{ion}} (V_m - E_{ion})$$

nella quale ‘ X ’ esprime la generica variabile di *gating* e ‘ $\overline{g_{ion}}$ ’ è la conduttanza massima che si ha ovviamente quando tutti i canali sono aperti simultaneamente. Le variabili di *gating* hanno una dipendenza temporale esprimibile tramite un’equazione differenziale del primo ordine del tipo:

$$\frac{dX}{dt} = \alpha (1 - X) - \beta X$$

nella quale può essere espressa la variazione temporale della variabile di *gating* in funzione di due costanti (α e β) che rappresentano i ratei cinetici di transizione fra gli stati di apertura e di chiusura del *gate* (ms^{-1}), calcolati in funzione del potenziale di membrana, mentre X e $(1 - X)$ rappresentano rispettivamente la probabilità di apertura o chiusura dei canali ionici.

Una formulazione alternativa e più moderna per la variabile di *gating* è:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{X_{\infty} - X}{\tau_X}$$

nella quale X_{∞} rappresenta il valore di *steady-state*, ovvero il valore che verrebbe raggiunto dopo un tempo proporzionale alla costante di tempo τ_X mantenendo condizioni costanti nel sistema. Il valore di *steady-state* e la costante di tempo vengono valutati a partire dai risultati forniti dagli esperimenti di *clamp* tramite delle procedure di *fitting*, in modo tale che vengano determinati i coefficienti che permettono una migliore somiglianza con i dati sperimentali.

Si noti come ci si possa ricondurre alla precedente formulazione ponendo:

$$X_{\infty} = \frac{\alpha}{(\alpha + \beta)} \qquad \tau_X = \frac{1}{\alpha + \beta}$$

Nel modello di Hodgkin e Huxley la corrente di attivazione dello ione sodio, responsabile della rapida depolarizzazione in un AP, viene modellata attraverso tre identici *gate* di attivazione che si muovono dalla posizione di chiusura a quella di apertura quando il potenziale di membrana è depolarizzato. La probabilità che i cancelli di attivazione siano aperti è espressa dalla variabile di *gating* ‘ m ’. Se si può assumere che le transizioni dei *gate* siano indipendenti allora la probabilità che tutti e tre i *gate* siano aperti è ‘ m^3 ’.

Attraverso le misurazioni in *voltage clamp* si vide anche come la corrente del sodio diminuisse poco dopo l’attivazione in un processo che venne chiamato inattivazione, tale processo fu modellato utilizzando un singolo *gate* di

inattivazione con probabilità di apertura ‘ h ’. Quando la membrana è depolarizzata il *gate* di inattivazione si chiude causando la diminuzione di corrente di membrana. Siccome ‘ h ’ è indipendente da ‘ m ’ la probabilità che il canale del sodio sia aperto è dato da ‘ m^3h ’ per cui la conduttanza dello ione è espressa da ‘ $g_{Na} = \overline{g_{Na}} m^3h$ ’.

Per quanto riguarda la conduttanza allo ione potassio poté essere modellata osservando che la fase di inattivazione non era presente, e che quindi il miglior modo di adattare questo comportamento era di considerare quattro variabili di *gating* indipendenti ‘ n ’, ottenendo così una probabilità di apertura del canale pari a ‘ n^4 ’; la conduttanza del potassio divenne quindi ‘ $g_K = \overline{g_K} n^4$ ’ [11].

La conduttanza di *leakage* fu invece assunta costante e si poté quindi esprimere la corrente complessiva del modello come:

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

Al crescere delle informazioni ottenute sul *gating* dei canali ionici fu chiaro come servissero dei modelli che esprimessero direttamente gli stati dei canali invece che gli stati dei singoli ipotetici *gate*.

Un particolare aspetto che non poteva essere espresso dalla formulazione di Hodgkin e Huxley era che l’inattivazione del canale del sodio è più probabile che si verifichi quando esso è nello stato aperto. Si rese quindi necessaria una classe di modelli che rappresentasse la dipendenza delle transizioni di stato del canale in funzione del suo stato attuale, ma non in funzione degli stati precedentemente assunti [11]; questo nuovo approccio è dato dai modelli markoviani.

Un semplice modello markoviano che rappresenta un ipotetico canale con solo due stati, aperto o chiuso, può esser descritto dalle equazioni differenziali del primo ordine:

$$\frac{dC}{dt} = -\alpha C + \beta O \qquad \frac{dO}{dt} = \alpha C - \beta O$$

dove O e C sono la probabilità che ha il canale di essere rispettivamente nello stato aperto e chiuso; α e β sono invece i ratei cinetici di transizione voltaggio dipendenti da uno stato all’altro.

Un altro esempio di modello markoviano può essere sviluppato considerando che in generale i canali ionici possono esser sottoposti a degli stati di inattivazione che implicano la chiusura dei canali pur restando la fase depolarizzata di membrana.

Considerando questa situazione si costruisce un modello a quattro stati due inattivi e gli stati di apertura e chiusura con i ratei α e β che descrivono i movimenti tra gli stati di apertura e chiusura e fra i due stati inattivati, mentre con i ratei γ e δ si descrivono le transizioni tra lo stato inattivato e il rispettivo stato di apertura o di chiusura.

Le equazioni differenziali che descrivono la permanenza nei vari stati sono:

$$\begin{aligned} \frac{dC}{dt} &= \beta O + \delta I_C - (\alpha + \gamma)C & \frac{dO}{dt} &= \alpha C + \delta I_O - (\beta + \delta)O \\ \frac{dI_C}{dt} &= \beta I_O + \gamma C - (\alpha + \delta)I_C & \frac{dI_O}{dt} &= \alpha I_C + \gamma O - (\beta + \delta)I_O \end{aligned}$$

Entrambi gli esempi sono illustrati nella figura 2.6 (a e b), nella quale si nota che questi modelli possono essere rappresentati con i formalismi dei modelli HH; non è sempre vero però che da una formulazione sia possibile ricondursi all'altra, ciò è possibile solamente sotto l'ipotesi di indipendenza tra le transizioni dei *gate*. I modelli markoviani pertanto permettono una rappresentazione più simile alla realtà permettendo anche di descrivere transizioni dipendenti fra loro. Ciò si evince anche dalle equazioni differenziali dei modelli markoviani descritti precedentemente che mostrano i legami tra stati adiacenti legati proporzionalmente ai propri ratei di transizione.

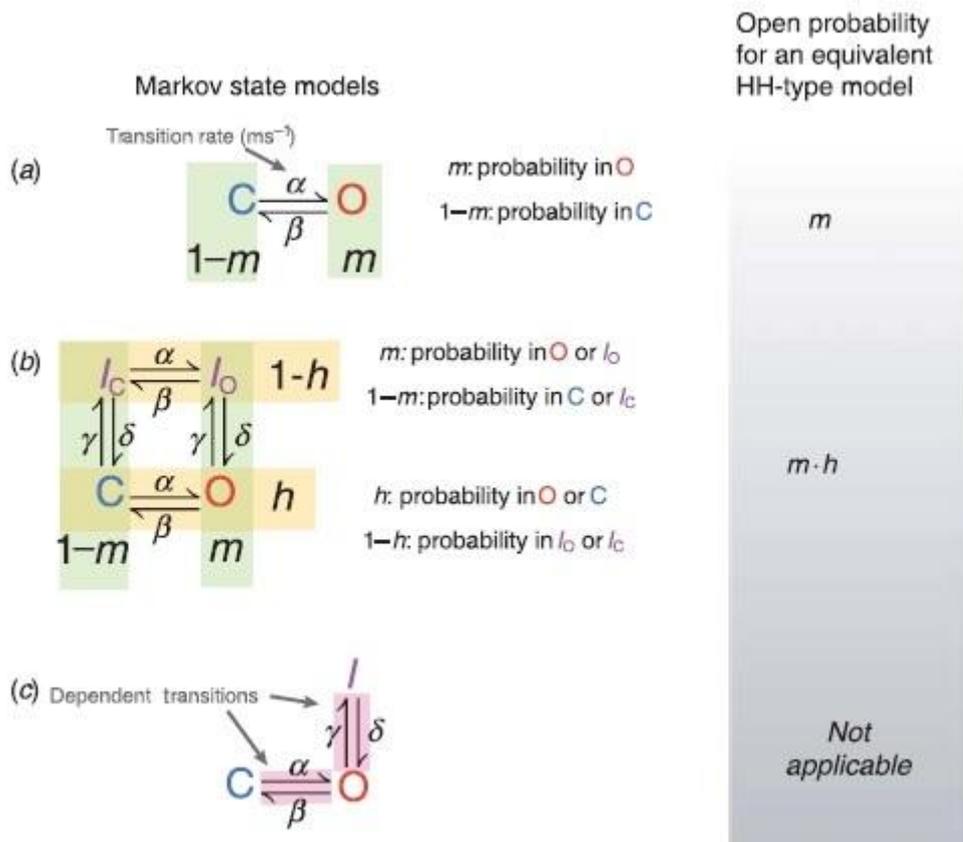


Figura 2.6 - Esempi di modelli Markoviani e equivalenze col modello di Hodgkin e Huxley [11].

Il terzo esempio di modello markoviano in figura 2.6c consiste in un particolare modello di cui non è possibile la rappresentazione tramite formalismo di HH. Questo è un esempio di modello che mostra come i processi di attivazione e inattivazione possano essere descritti come dipendenti fra loro. In questo schema lo stato inattivato I può avvenire solo a partire dallo stato aperto O, e quindi l'attivazione e l'inattivazione del canale non avvengono attraverso transizioni indipendenti. In questo modello essendo quindi le transizioni dipendenti non è possibile applicare i formalismi di HH in termini di variabili di *gating*.

2.2.3 il modello Luo-Rudy di miocita ventricolare

Viene ora brevemente presentato il modello Luo-Rudy (LRd) del 1991 utilizzato come modello di partenza per l'analisi dei dati fatta.

Il modello di Luo-Rudy è basato sul modello di Beeler & Reuter (B-R), ma al contrario di questo che considera le concentrazioni ioniche costanti, il modello LRd introduce la dipendenza delle correnti del potassio dalla propria

concentrazione ionica, questo perché i cambiamenti della concentrazione extracellulare del potassio esercitano un forte effetto sul decorso della fase di ripolarizzazione; non vengono però tenuti in considerazione né la dinamica del calcio né tantomeno gli effetti dovuti a pompe e scambiatori.

L'approccio generale con cui è costruito il modello LRd è basato su una ricostruzione numerica dell'AP ventricolare usando i formalismi di HH; l'equazione che descrive la variazione del potenziale di membrana è quindi data da:

$$\frac{dV}{dt} = -\frac{1}{C} (I_i + I_{st})$$

dove con V e C sono indicati il potenziale di membrana e la sua capacità, I_{st} indica la corrente di stimolo e I_i è la somma di sei correnti ioniche: I_{Na} una corrente rapida del sodio, I_{si} una corrente lenta in ingresso, I_K una corrente tempo dipendente del potassio, I_{K1} una corrente tempo indipendente del potassio, I_{Kp} una corrente di potassio di plateau e I_b che è una corrente di background tempo indipendente [12].

Le correnti ioniche sono determinate attraverso delle variabili di *gating* la cui equazione è espressa secondo la formulazione moderna dei formalismi di HH riportata precedentemente. Queste equazioni vengono risolte tramite algoritmi specifici, mentre i ratei che compaiono nell'equazione dello *steady-state* e della costante di tempo τ delle singole variabili di *gating* sono ottenuti attraverso una stima dei parametri con metodo dei minimi quadrati.

La particolarità di questo modello rispetto a quello B-R è che delle sei correnti ioniche nel modello LRd alcune vengono riformulate ovvero I_{Na} , I_K e I_{K1} , mentre le restanti restano fedeli al modello B-R.

In particolare la corrente rapida del sodio è inattivata da due processi uno veloce e uno lento, espressi rispettivamente tramite le variabili di *gating* h e j ; l'equazione che descrive questa corrente diviene dunque:

$$I_{Na} = \overline{G_{Na}} m^3 h j (V - E_{Na}).$$

Attraverso le correnti I_K e I_{K1} viene invece espressa la dipendenza del modello dalla dinamica della concentrazione ionica del potassio.

In particolare, rispetto al modello B-R, si ha che per le correnti I_K e I_{K1} la conduttanza massima è espressa proporzionalmente alla $\sqrt{[K]_o}$, dove $[K]_o$ indica la concentrazione extracellulare dello ione K^+ . Inoltre sempre per entrambe le correnti il potenziale di Nernst, responsabile della *driving force*, è anch'esso funzione della concentrazione extracellulare dello ione potassio; anche se per la corrente I_K si ha che esso viene calcolato anche in funzione della concentrazione dello ione sodio moltiplicato per il rapporto tra le permeabilità degli ioni sodio e potassio.

Le due correnti risultano pertanto espresse come:

$$I_K = \overline{G_K} X X_i (V - E_K)$$

$$I_{K1} = \overline{G_{K1}} K1_\infty (V - E_{K1})$$

dove le variabili di *gating* X e X_i indicano rispettivamente per la corrente I_K un *gate* di attivazione tempo dipendente e uno di inattivazione tempo indipendente, entrambi indipendenti dalla concentrazione di potassio extracellulare. La variabile di *gating* $K1$ è approssimata nella formula di I_{K1} con il suo valore di *steady-state*, questo è possibile perché ha una costante di tempo molto piccola; questa variabile esprime un *gate* di inattivazione dipendente dal potenziale di Nernst e quindi dalla concentrazione dello ione potassio [12].

Questo modello è nato per investigare gli effetti che la corrente rapida del sodio in ingresso e la corrente di potassio in uscita hanno sull' AP del miocita, in particolare sulla fase di depolarizzazione e sulla fase di ripolarizzazione (fase 0 e fase 3). Tramite esso si constatò come i principali effetti della simulazione di cambiamenti nella concentrazione extracellulare dello ione potassio si mostrarono sull'APD e sul valore di potenziale a riposo; in particolare all'aumentare della concentrazione del potassio extracellulare si ha una diminuzione dell'APD e un decremento del valore assoluto del potenziale di riposo che tende quindi a valori meno negativi.

CAPITOLO 3

Il modello I_{Kr} e sue applicazioni

In seguito alla pubblicazione del primo modello di Luo-Rudy (LRd) ulteriori studi sui miociti ventricolari di *guinea-pig* hanno permesso di scomporre la corrente I_K nelle sue componenti I_{Kr} e I_{Ks} entrambe correnti ripolarizzanti, rispettivamente di attivazione veloce e lenta; le quali vennero poi sostituite alla I_K nel modello.

I_{Ks} è fra le due la corrente predominante nella fase di plateau del potenziale d'azione ed un eventuale blocco di essa o di I_{Kr} contribuisce al prolungamento dell'APD [13].

La corrente I_{Kr} in particolare riveste un ruolo importante nella fase di ripolarizzazione e le sue variazioni sono causa di modificazioni in questa fase, mentre a livello macroscopico essa gioca un ruolo fondamentale nella genesi di aritmie generiche e di tachicardie ventricolari.

Oggetto dello studio svolto è stato quello di valutare la dipendenza dell'APD e della BVR dalla corrente I_{Kr} in cellule ventricolari di *guinea pig*; per valutare tali effetti è stata utilizzata una tecnica innovativa (dynamic clamp) attraverso la quale è possibile sostituire la corrente nativa con una modellata a partire dal miocita stesso. In questa procedura il potenziale di membrana è registrato dal miocita e attraverso un calcolatore è usato per generare la corrente secondo le equazioni imposte dal modello, la quale viene poi iniettata nel miocita stesso contribuendo alla generazione dell' AP e quindi di se stessa in un ciclo continuo in real-time.

Tramite questo studio si è visto come gli effetti prodotti su APD e BVR con I_{Kr} bloccata potessero essere invertiti dall'iniezione nel miocita di un adeguata corrente di modello, a dimostrazione dell' efficacia del modello creato; si è osservato inoltre come i cambiamenti nella conduttanza massima di I_{Kr} abbiano un effetto maggiore sulla BVR e effetti minimi sull'APD, a dimostrazione che la corrente di modello I_{Kr} può modulare la BVR indipendentemente dall'APD nonostante la dipendenza dei due parametri [15].

3.1 Il modello I_{Kr} e la sperimentazione in dynamic clamp

I modelli di correnti ioniche sono in larga parte basati su esperimenti fatti in voltage clamp, che utilizzando impulsi di tensione rettangolari non fisiologici

permettono lo studio delle proprietà biofisiche delle correnti, e sono formulati a partire dai formalismi di HH.

Un approccio innovativo è quello di utilizzare la tecnica dell' AP-clamp per analizzare le correnti in un contesto più fisiologico, in quanto si utilizza un AP della stessa cellula registrato precedentemente invece del più generico impulso rettangolare di tensione.

Utilizzando il bloccante E-4031 per la corrente I_{Kr} in soluzione con la cellula, è possibile registrare, attraverso AP clamp, la corrente I_{E4031} , questa corrente è rappresentativa della corrente I_{Kr} che si avrebbe senza bloccante.

A partire dallo stesso potenziale d'azione utilizzato in AP-clamp e dal modello LRd si è valutata la corrente simulata I_{Kr} , la quale confrontata con la corrente I_{E4031} mostrava una differenza significativa, per cui è stato necessario modificare il modello per ottimizzare la corrente di potassio e renderla più simile a quella registrata in AP clamp con il bloccante aggiunto.

La corrente I_{Kr} del modello LRd è espressa dall'equazione:

$$I_{Kr} = G_{Kr} X_r R (V - E_{Kr})$$

dove le variabili di *gating* X_r e R esprimono rispettivamente il *gate* di attivazione tempo dipendente e il *gate* di inattivazione tempo indipendente, mentre le altre variabili in equazione hanno lo stesso significato delle precedenti formulazioni di HH viste.

Per rendere questa corrente più somigliante alla corrente I_{E4031} si sono perfezionate le formulazioni dei valori di *steady-state* di attivazione e inattivazione e della costante di tempo, attraverso la minimizzazione di una funzione costo basata sulla differenza dei minimi quadrati tra la I_{Kr} simulata e quella registrata I_{E4031} ; in questo modo è stata ottenuta una corrente di modello ottimizzata ai valori registrati in AP clamp. Agire su questi parametri significa agire sulle variabili di *gating*, in quanto si ricorda come esse vengono espresse da equazioni del tipo:

$$\frac{dX_r}{dt} = \frac{X_{r\infty} - X_r}{\tau_{Xr}}$$

in cui è riportata l'equazione della variabile di attivazione.

In figura 3.1 è mostrata la differenza fra la corrente I_{Kr} del modello Luo-Rudy in nero, quella registrata in blu e quella del modello ottimizzato in rosso; come si può vedere il modello ottimizzato genera una corrente molto più simile a quella registrata in AP clamp.

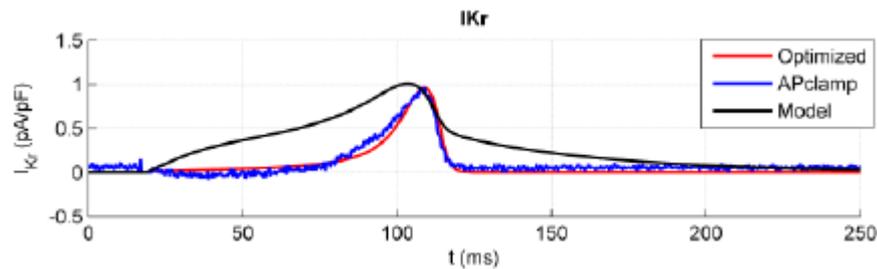


Figura3.1 - Confronto fra correnti I_{Kr} [14].

Ora che il modello è stato ottimizzato è possibile sostituire la corrente I_{Kr} generata dallo stesso a quella nativa del miocita, bloccata tramite bloccante E-4031 come accennato in precedenza, e valutare in questo modo il potenziale d'azione della cellula e in particolare la variabilità dell'APD e della BVR fra lo stato in cui non è aggiunto l'agente bloccante, denominato stato di controllo, lo stato in cui la corrente I_{Kr} naturale è bloccata e lo stato in cui essa è sì bloccata, ma sostituita da quella computata in real-time dal modello.

Per fare ciò occorre collegare il miocita ventricolare in modalità di dynamic clamp e in particolare di model clamp, durante la quale il potenziale della cellula è continuamente campionato e usato dal modello per generare la corrente simulata che viene poi iniettata nella stessa.

Il sistema di dynamic clamp è implementato utilizzando un amplificatore connesso tramite una scheda di acquisizione dati ad un personal computer sul quale l'interfaccia real-time (RTXI) provvede alla computazione della corrente di modello secondo lo schema in figura 3.2. La strumentazione elettronica è quindi connessa al materiale biologico attraverso la modalità di whole-cell.

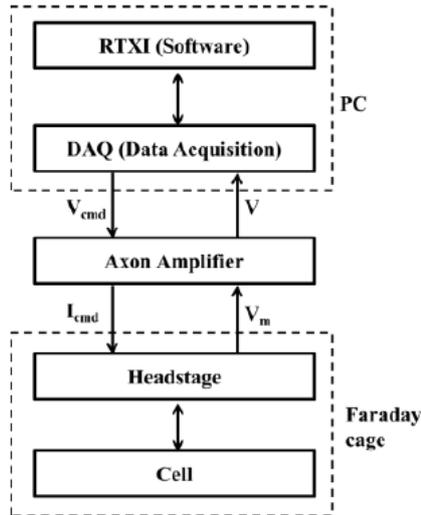


Figura3.2 – Schema di acquisizione dati in dynamic clamp [14].

3.2 Risultati ottenuti

Come si può vedere dai grafici in figura 3.3 si ha che la corrente del modello compensa in modo ottimale la corrente bloccata I_{Kf} : infatti nel primo grafico in alto a sinistra, dove si ha in nero l'AP della cellula nello stato di controllo, ovvero in assenza di bloccante, e in verde l'AP ottenuto iniettando la corrente di modello, si vede come le due curve siano praticamente coincidenti, mentre l'AP registrato col bloccante aggiunto in soluzione, in rosso, risulta prolungato.

Il grafico di sinistra al centro mette a confronto la corrente di modello in verde e quella registrata a bloccante aggiunto in rosso, mentre il grafico in basso a sinistra mostra la relazione tra corrente e potenziale di membrana per le due correnti precedenti.

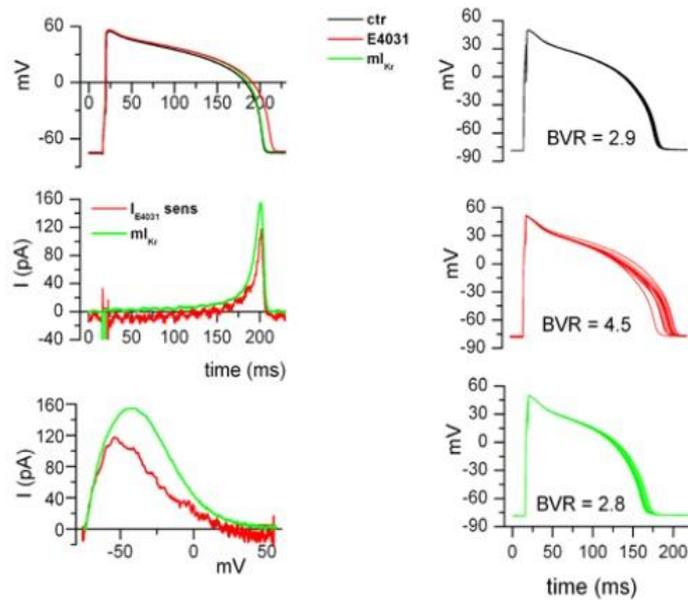


Figura3.3 – Confronto fra AP prima e dopo la sostituzione con la I_{Kr} del modello [15].

I grafici di destra sono ottenuti dalla misurazione di 10 AP consecutivi ed anche attraverso essi si può vedere l'affidabilità del modello realizzato nel confronto fra la BVR di tre situazioni: in alto si ha la BVR di controllo, al centro si ha quella ottenuta dopo l'iniezione del bloccante e infine in basso si ha il parametro calcolato quando nella cellula ventricolare è iniettata la corrente del modello in sostituzione di quella bloccata. Come si nota la sostituzione della corrente originaria con quella di modello riporta il parametro BVR ad un valore prossimo a quello di controllo testimoniando la correttezza del modello.

Il vantaggio di utilizzare una corrente di modello è nella facilità di poterne modificare i parametri caratteristici ed eseguire quindi test differenti; in figura 3.4 è mostrato l'effetto che si ha su APD e BVR se si cambia la conduttanza massima della corrente; in figura ogni grafico fa riferimento alla variazione di conduttanza che vi è indicata sopra.

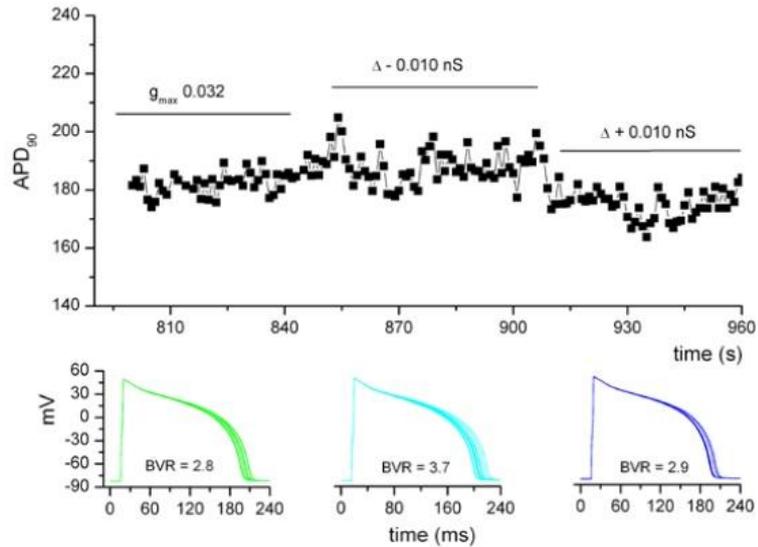


Figura3.4 – Variazione della conduttanza massima della corrente di modello [15].

Come accennato in precedenza una variazione della conduttanza massima della corrente di modello genera un effetto di maggiore rilevanza sulla BVR che ha ampia variazione in particolare per una conduttanza ridotta, mentre rimane pressoché costante se la conduttanza viene aumentata della stessa quantità. Per quanto riguarda la variabilità dell'APD si vede come un decremento della conduttanza non ha effetti significativi sulla durata dell'AP, mentre un leggero calo viene misurato per una conduttanza incrementata rispetto al valore basale. Ciò implica che la conduttanza massima della corrente di modello sia un parametro significativo nella modulazione della BVR.

CAPITOLO 4

Implementazione in Matlab

In questo capitolo viene descritto come si è scelto di procedere per lo sviluppo del software applicativo, oggetto del mio lavoro di tesi, in grado di automatizzare l'analisi dei segnali cardiaci registrati nell'ambito dall'analisi descritta nel capitolo precedente attraverso la tecnica di dynamic clamp, con l'obiettivo di standardizzare la valutazione dei parametri di interesse (marker) e di velocizzarne la computazione permettendo quindi l'analisi di un maggior numero di dati.

I tracciati che ho avuto modo di analizzare sono stati forniti dalla dott.ssa Claudia Altomare del dipartimento di biotecnologie e bioscienze dell'università degli studi Milano-Bicocca.

Ogni parte del software elaborato è qui descritta in modo dettagliato, illustrando le problematiche riscontrate e le metodiche implementative scelte per risolverle.

Per la visualizzazione dell'intero codice si veda l'appendice A.

4.1 La matrice 3D

Il primo passo da compiere nell'implementazione di questo strumento è definire una struttura dati che deve servire alla raccolta e alla memorizzazione dei marker di volta in volta calcolati, in modo da renderli disponibili per successive elaborazioni.

Noto che ogni singolo parametro che si intende estrapolare è dipendente dalla particolare sperimentazione effettuata e, all'interno di questa categoria, da una dei suoi generici tracciati, la struttura dati deve avere forma tridimensionale ed essendo gestita attraverso Matlab essa è quindi una matrice 3D.

Matlab è un linguaggio di programmazione per il calcolo e l'analisi numerica e tutte le variabili che si possono creare, a prescindere dalle loro dimensioni e strutture, sono in realtà sempre di tipo matriciale; ciò implica che le dimensioni delle diverse variabili che si vogliono utilizzare devono essere note al momento della loro creazione. Una matrice 3D, nonostante la sua complessità, è una variabile come le altre per Matlab e pertanto occorre conoscerne le dimensioni per poterla generare.

Al fine di determinare le dimensioni della matrice 3D, nella quale solo successivamente verranno memorizzati i marker relativi ad ogni singola coppia di tracciati di potenziale d'azione e corrispondenti correnti, occorre conoscere le dimensioni del file excel che contiene i dati originali. La matrice 3D deve avere le dimensioni massime tale da rendervi possibile la scrittura dei parametri estrapolabili da tutti i possibili tracciati esistenti nel file excel originale; questo è dovuto alla possibilità che il numero di tracciati sia difforme fra le diverse sperimentazioni effettuate, occorre quindi considerare il numero massimo di tracciati disponibili e lasciare il valore non assegnato NaN (*Not a Number*) dove il numero di tracce è inferiore al massimo.

Viene ora descritto come vengono valutate le dimensioni della matrice 3D a partire dal numero di righe di cui deve essere costituita.

La funzione di Matlab:

```
[STATUS, SHEETS] = xlsfinfo(FILENAME)
```

riporta nella variabile `STATUS` la dicitura "Microsoft Excel Spreadsheet" se il file dato alla funzione è effettivamente un file excel e può quindi essere letto; tale variabile non riporta comunque informazioni utili alla determinazione delle dimensioni del file excel ed è stata chiamata 'y' come tutte le variabili di cui non si ha un interesse.

La variabile `SHEETS` ha la forma di un vettore di stringhe ognuna delle quali contiene il nome dei vari fogli di lavoro del file excel.

Misurando la lunghezza del vettore `SHEETS` sono in grado di quantificare il numero di fogli di lavoro del file originale che esprime il numero di sperimentazioni effettuate; tale valore corrisponde quindi al numero di righe che costituisce la matrice 3D. La misura della lunghezza di un vettore può esser fatta con la semplice funzione 'length': `jmax=length(sheets);`

Prima di andare a definire la dimensione delle colonne occorre specificare come si è scelto di suddividere ed identificare le aree caratteristiche dell' AP e quindi della corrente corrispondente.

In figura 4.1 è rappresentato un generico AP suddiviso in quattro diverse fasi o regioni ognuna delle quali rappresenta una porzione caratteristica dello stesso. La regione descritta tra il picco del potenziale e la fine del plateau è chiamata fase di plateau o regione 1, a seguire si ha la fase di gomito o regione 2, che rappresenta il tratto non lineare tra la fase di plateau, e la regione a maggior linearità data da una fase di flesso causato dalla ripolarizzazione o regione 3, infine si ha la regione 4 che descrive la zona in cui il potenziale torna al suo valore di riposo.

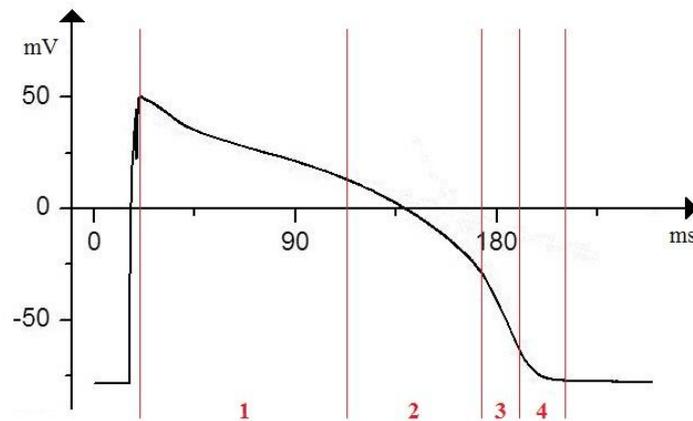


Figura 4.1 - Schema delle fasi/regioni in cui si è suddiviso l'AP.

In base a questa suddivisione, che viene poi estesa al tracciato della corrente corrispondente all' AP avendo le due la stessa base temporale, è possibile ora definire i marker, che si vogliono misurare per ogni coppia di potenziale d'azione e corrente.

Il numero di colonne della matrice 3D è posto uguale al numero di parametri i quali sono elencati nell'ordine di inserimento nella struttura dati:

1. tempo a cui vi è il picco dell' AP (inizio della regione 1)
2. tempo di fine plateau (inizio regione 2)
3. tempo di inizio flesso finale (inizio regione 3)
4. tempo a cui si ha APD90 (inizio regione 4)
5. tempo di ritorno alla situazione di riposo (fine della regione 4)
6. potenziale di picco dell' AP
7. potenziale di fine plateau
8. potenziale di inizio flesso
9. potenziale al 90% del valore di riposo

10. potenziale di riposo
11. integrale della corrente nella regione 1
12. percentuale dell'area della regione 1 sull'area totale
13. integrale della corrente nella regione 2
14. percentuale dell'area della regione 2 sull'area totale
15. integrale della corrente nella regione 3
16. percentuale dell'area della regione 3 sull'area totale
17. integrale della corrente nella regione 4
18. percentuale dell'area della regione 4 sull'area totale

Per conoscere il numero di piani che compone la matrice 3D si deve conoscere il numero di tracce massime che può contenere il singolo foglio del file excel dei dati originali; per fare ciò utilizzo l'iterazione:

```
kmax=1;
for j=1:jmax
    file=xlsread('ex_traces.xlsx',j);
    siz=size(file);
    n=siz(1,2);
    n=(n-1)/2;
    if kmax<n
        kmax=n;
    end
end
```

la funzione `file=xlsread('ex_traces.xlsx',j);` scrive nella variabile `file` il contenuto del `j`-esimo foglio del file excel dato, la funzione `siz=size(file);` riporta nella variabile 'siz' il numero di righe che compongono il foglio di lavoro e il numero di colonne dello stesso; è di interesse il solo numero di colonne che è dato dalla somma di tutti i potenziali e tutte le correnti più il vettore base dei tempi di acquisizione dei segnali, pertanto questo numero viene ridotto di uno e diviso per due per ottenere il numero di coppie potenziale-corrente.

Ad ogni ciclo il numero trovato viene confrontato col massimo ottenuto fino a quel momento e se superiore viene sostituito ad esso; una volta controllati tutti i fogli del file excel nella variabile 'kmax' rimane il valore cercato corrispondente quindi al numero di piani che costituirà la matrice 3D.

Noti quindi il numero di righe 'jmax', il numero di colonne pari al numero dei marker, ovvero 18 e il numero di piani 'kmax' è possibile costruire la matrice 3D, che nel software Matlab è stata chiamata con la variabile 'DB'.

In primis DB viene creata come matrice di valori uno delle dimensioni desiderate per poi assegnare ad ogni cella della stessa il valore 'NaN'.

```
DB=ones(jmax,18,kmax);  
DB(:)=NaN;
```

L'assegnazione del valore 'NaN' deve esser fatta affinché, al termine dell'estrazione dei parametri di interesse, nella matrice rimangano solo valori numerici con significato e alcuni 'NaN'.

4.1.1 Gestione delle tracce e della matrice 3D

Per scrivere i parametri cercati nella matrice 3D occorre analizzare un foglio di lavoro e una coppia potenziale-corrente per volta e scrivere ad ogni ciclo i marker calcolati nelle posizioni corrispondenti nella matrice 3D.

Si utilizzano quindi due cicli iterativi uno dentro l'altro.

Il ciclo più esterno gestisce i fogli di lavoro e quindi anche le righe della matrice 3D, mentre quello interno gestisce le coppie potenziale-corrente e la scrittura dei marker calcolati nella matrice 3D. All'interno del ciclo interno vi è inoltre tutta la parte di valutazione e calcolo dei parametri che sarà descritta in seguito.

```
for j=1:jmax  
    file=xlsread('ex traces.xlsx',j);  
    siz=size(file);  
    t=file(2:length(file),1);  
    dt=t(3,1)-t(2,1);  
    sig=file(2:length(file),2:siz(1,2));  
    M=(siz(1,2)-1)/2;  
  
    for k=1:M  
        p=sig(:,k);    % potenziale e corrispondente corrente  
        I=sig(:,M+k)*20;
```

Nel ciclo esterno viene copiato, dal file excel originale, il contenuto del j-esimo foglio di lavoro nella variabile 'file', utilizzando la funzione 'xlsread' già usata in precedenza, la quale viene scomposta nel vettore dei tempi denominato 't', corrispondente alla prima colonna di 'file', mentre il resto viene copiato in una

variabile 'sig', la quale contiene l'insieme dei potenziali e delle correnti del j-esimo foglio del file excel originale.

La variabile 'dt' è l'incremento temporale da un punto al successivo nel campionamento di potenziali e correnti fatto in fase di acquisizione del segnale.

Dalla variabile 'file', nel creare 't' e 'sig' viene scartata la prima riga in quanto contiene dei codici identificativi per riconoscere il potenziale e la corrispondente corrente; questo perché per l'accoppiamento tra potenziale e corrispondente corrente, fatta nel ciclo interno, si utilizza una simmetria presente nei dati originali: ovvero notando che nella prima metà delle colonne sono presenti i potenziali, mentre nella seconda sono presenti le correnti; in particolare al primo potenziale corrisponde la prima corrente e così via...

Con un semplice calcolo è possibile dunque scrivere nella variabile 'M' il numero di coppie potenziale-corrente.

Il ciclo interno scorre quindi una per una tutte le coppie di tracce ed ha l'importante compito di riportare nella matrice 3D i marker estratti ad ogni iterazione.

Il potenziale è salvato nella variabile 'p' e in 'I' vi è la corrispondente corrente, essa è moltiplicata per 20 pA/mV in quanto il dato originale è acquisito come una tensione proporzionale alla corrente misurata con questa costante di proporzionalità di origine strumentale.

Al termine dell'analisi della k-esima traccia i marker calcolati sono inseriti nella matrice 3D con espressioni del tipo:

$$DB(j, 1, k) = t_p;$$

in cui viene mostrata la scrittura del tempo di picco nella colonna 1, della j-esima riga, del k-esimo piano, della matrice 3D denominata 'DB'.

La stessa operazione viene effettuata per gli altri marker in seguito alla loro estrazione dai tracciati.

4.2 Determinazione del picco di potenziale e algoritmi per la stima della fine delle regioni 3 e 4

In questo paragrafo viene descritto come si valuta il picco del potenziale d'azione che definisce l'inizio della regione 1, viene inoltre spiegato con che criteri si è scelto di definire la fine della fase del flesso di ripolarizzazione (regione 3) e la fine della fase 4 col ritorno del potenziale al suo valore di riposo e infine descritta la loro implementazione; per la definizione di questi limiti in particolare è stato necessario scegliere dei criteri standardizzati validi per qualunque AP.

Per l' identificazione del picco e quindi del suo istante temporale è sufficiente utilizzare la funzione `max` di Matlab, tale funzione permette di localizzare il massimo valore e la sua collocazione all'interno di un generico array di dati permettendo quindi una rapida e sicura localizzazione di tale punto; infatti il picco generato dalla rapida depolarizzazione è senza alcun dubbio il valore massimo in un AP. La scrittura che implementa tale funzione è:

```
[picco, tp1]=max(p);
```

in cui la variabile 'picco' contiene il potenziale di picco, mentre la variabile 'tp1' contiene l'indice che identifica la posizione del picco all'interno del vettore 'p' che si ricorda contenere i valori dell' AP.

Per quanto riguarda la definizione della fine della regione 3 si è scelto di utilizzare il superamento del 90% della ripolarizzazione, ovvero l'istante finale che definisce l'APD al 90% (APD90), mentre per definire la fine della regione 4 è stato necessario definire quando effettivamente si raggiunge il potenziale di riposo, che è stato definito quando si raggiunge il valore di riposo sommato ad un certo termine di incertezza. I due algoritmi per la stima di questi limiti vengono presentati di seguito.

4.2.1 Stima dell' APD90

Per riuscire a valutare l'istante finale della fase 3 è necessario come prima cosa definire il valore che assume il potenziale al 90% della ripolarizzazione; questo può essere valutato noto il potenziale di picco dell'AP e il suo potenziale di riposo.

Il potenziale di picco è già noto, come la sua posizione, in quanto sono stati calcolati in precedenza.

Calcolare il potenziale di riposo nota la posizione del picco dell' AP è banale idealizzando la morfologia di un potenziale d'azione in cui la fase 0 di depolarizzazione rapida è descrivibile tramite una retta verticale di cui la sommità è il picco, allora tutti i valori presi prima di questo istante equivalgono a quello di riposo. Ovviamente i tracciati a disposizione sono dati reali e quindi la fase 0 dell'AP non può essere intesa come una retta verticale anche se molto ripida; per ottenere il valore di riposo sarà sufficiente tenersi ad una adeguata distanza dal picco avendo così la certezza di selezionare il punto ottimale. Si è scelto di estrarre il valore di riposo da uno dei primi punti che compongono il vettore del potenziale, assicurando così la certezza di essere adeguatamente lontano dal valore di picco, in particolare si è preso il secondo punto; una possibile scelta alternativa poteva essere quella di prendere tale valore in coda al vettore del potenziale, in quanto quelle posizioni assicurano la certezza che l'AP si è concluso ed il potenziale è tornato al valore di riposo.

Ottenuto il potenziale di riposo è possibile ora calcolare il potenziale al 90% della ripolarizzazione; questo viene fatto calcolando il 10% della differenza di potenziale tra il valore di picco e quello di riposo e sommandolo poi al potenziale di riposo stesso. Questo valore è memorizzato nella variabile 'V90' e viene usato come valore limite per definire la fine della regione 3 attraverso un semplice ciclo iterativo che si interrompe quando il valore del potenziale scende al di sotto di questa soglia incrementando un indice ad ogni iterazione; questo indice è stato chiamato 'iend' e quando il ciclo si interrompe in esso rimane salvato il valore che indica la fine della fase 3.

Il codice che implementa questo algoritmo è:

```
Vrest=p(2,1);
V90=((picco-Vrest)/10)+Vrest;
iend=tp1;
while p(iend)>=V90
    iend=iend+1;
end
```

all'inizio del ciclo iend è inizializzato a tp1 che si ricorda essere l'indice che identifica la collocazione del picco di potenziale, si è scelto questo valore in quanto unico indice noto. La scelta di un'altra inizializzazione per iend non

modifica il risultato che si ottiene se non in termini di una variazione del tempo computazionale, purché il valore a cui si inizializza sia un valore che si trovi con certezza in anticipo rispetto all'indice cercato, pena la fuoriuscita immediata dal ciclo con conseguente calcolo errato dell'istante di fine fase 3. Un indice che porterebbe ad una maggior rapidità di calcolo sarebbe quello di centro plateau o di centro flesso o qualunque indice che fosse più vicino alla fine della ripolarizzazione. Nelle fasi iniziali di sviluppo dell'intero software questa parte di codice era una delle ultime ad essere implementate e si potevano usare quindi gli indici citati in precedenza invece di 'tp1', in seguito mi sono reso conto della necessità di conoscere in anticipo l'indice di fine fase 3 al fine di valutare proprio gli indici di centro plateau e centro flesso, di cui è indispensabile la conoscenza per implementare il seguito del software, è pertanto dovuto a questo la scelta obbligata di inizializzazione per 'iend'.

4.2.2 Stima del ritorno a condizioni di riposo

L'algoritmo per l'identificazione dell'istante a cui viene raggiunto il potenziale di riposo è molto simile a quello descritto precedentemente, con alcune differenze concettuali. Per garantire che il potenziale di riposo venga raggiunto occorre, come nel precedente algoritmo, garantire che superi una certo limite; ciò viene fatto utilizzando una soglia data dal potenziale di riposo calcolato precedentemente sommato ad un certo termine di incertezza che diminuisce il valore assoluto della somma, essendo il potenziale di riposo negativo, in questo modo il potenziale che continua a calare fino al suo valore di riposo è costretto a superare questa soglia. L'incertezza introdotta è dell'ordine di qualche millivolt ed è stato valutata in modo tale che la somma delle durate di fase 3 e della fase 4 tornasse pari al valore che veniva calcolato in precedenza prima dello sviluppo di questo software. La variabile che esprime il termine di incertezza è chiamata 'eps' e il valore assegnatovi è 2.6 mV, di seguito è riportato il codice che implementa quanto descritto:

```
iorest=iend;  
eps=2.6;  
while p(iorest)>= Vrest+eps  
    iorest=iorest+1;  
end
```

la variabile 'irest' è l'indice che mi permette di scorrere lungo l'AP e che al termine del ciclo indica la posizione a cui termina la regione 4, essa è inizializzata a iend perché è l'indice noto più vicino a quello che cerco e che certamente vi è antecedente; la sua scelta è quindi, al contrario di prima, la migliore possibile.

4.3 Algoritmo per la determinazione della regione lineare

Implementare una tecnica che permetta di stimare gli estremi del plateau e del flesso di ripolarizzazione, in base ad un parametro standardizzato a tutti i possibili tracciati di AP, è stato oggetto della maggiore difficoltà del mio lavoro di tesi nonché il punto principale.

In questo paragrafo vengono illustrate le metodiche sviluppate atte a risolvere la problematica dell'individuazione, dei limiti di linearità di quei tratti di AP approssimabili come rette: ovvero la zona di plateau e la zona di ripolarizzazione.

Definire i limiti di queste aree è essenziale per definire la regione 2 del plateau e la 3 del gomito di un AP, in particolare per definirne rispettivamente il limite inferiore e il limite superiore.

4.3.1 Determinazione dei punti centrali del flesso ripolarizzante e del plateau

I punti centrali del plateau e del flesso finale sono essenziali, nell'ottica dell'algoritmo che verrà presentato nel seguito del capitolo, per stabilire da dove partire nel valutare le tangenti al flesso e al plateau che a loro volta servono a definire i limiti di linearità di queste due regioni e poter quindi valutare i marker di interesse.

Inizialmente per valutare tali punti si è deciso di stimare il centro del flesso attraverso la derivata del potenziale, in quanto in tale punto si ha un minimo nella derivata che è facilmente valutabile attraverso la funzione `min`, analoga della funzione `max` vista in precedenza. Questo è facilmente implementabile attraverso:

```
h=1;  
s1=p(h+1:length(p));  
s0=p(1:length(p)-h);  
ds=(s1-s0)/(h*dt);  
[y,tf]=min(ds);
```

In seguito però ci si è accorti di come la derivata fosse troppo sensibile ad eventuali artefatti sul potenziale causati da disturbi e errori in fase di acquisizione che erano difficilmente eliminabili anche stringendo il vettore alla sola porzione di AP evitando le regioni prima del picco e dopo la ripolarizzazione più soggette ad artefatti.

La soluzione escogitata è stata quella di localizzare il punto centrale del flesso attraverso l'indice di fine regione 3 in quanto tale punto non è molto distante da quello cercato. L'indice è deciso arbitrariamente sottraendo 20 punti all'indice di fine fase 3, che per una frequenza di campionamento di 5KHz, quale quella dei tracciati a disposizione, equivale a 4 ms.

In questo modo si risolve il problema della derivazione anche se il punto di centro flesso identificato è meno preciso, ma ciò influisce relativamente poco sul risultato finale in quanto l'algoritmo presentato nel seguito per la caratterizzazione della regione lineare compensa questa imprecisione. La codifica implementata è quindi:

```
tf=iend-20;
```

in cui 'tf' è per l'appunto l'indice di centro flesso.

Per trovare l'indice di centro plateau occorre invece scegliere un punto tra il punto di centro flesso 'tf' e il punto del picco 'tp1' e anche per questo punto non è indispensabile una grande precisione per lo stesso motivo del precedente.

L'idea iniziale è stata quella di scegliere un punto medio tra i due ma in questo modo il punto centrale veniva preso a valle della regione più lineare del plateau causando un calcolo errato della tangente.

Sperimentalmente ho trovato che il punto doveva essere tra 1/3 e 1/2 della distanza tra 'tp1' e 'tf' a partire da 'tf'; in seguito ai primi calcoli dei periodi ho stimato questo valore facendo il rapporto tra il periodo totale da 'tp1' a 'tf' e il periodo da 'tp1' a 'ti' (indice di centro plateau) entrambi valutati come valore medio fra tutti potenziali a disposizione; calcolando quindi questo parametro a posteriori ho ottenuto il risultato 2.88. Questo valore è stato determinato a partire dai 'tf' calcolati tramite derivata, ma si è dimostrato valido anche con i nuovi valori di centro flesso determinati a partire dalla fine della regione 3. Il valore di 'ti' è quindi calcolato tramite:

```
ti=ceil((tp1+tf)/2.88);
```

La variabile 'ti' è l'indice da cui iniziare la stima della tangente sul plateau; la funzione ceil approssima il risultato all'intero successivo, questo perché occorre un indice intero per gestire un array.

4.3.2 Valor medio del vettore degli scarti, tra potenziale e tangente ad esso, come parametro decisionale di linearità

Quello che si desidera ottenere è un calcolo ricorsivo della tangente alla curva fino a che essa non si stacca visibilmente dalla curva, e non si ha più quindi una buona rappresentazione del potenziale tramite la sua tangente.

Inizialmente avevo deciso di utilizzare il coefficiente di determinazione R^2 , calcolato in relazione al potenziale e alla sua tangente, come parametro decisionale in grado di discriminare numericamente qual è il grado di distacco tra potenziale e tangente.

Per il calcolo del coefficiente R^2 si utilizza la funzione di Matlab:

```
[B,BINT,R,RINT,STATS] = regress(Y,X)
```

in cui le prime quattro variabili in output non sono di interesse, mentre la variabile STATS contiene un vettore di quattro elementi di cui il primo è proprio il parametro R^2 .

Col coefficiente R^2 non si riusciva ad ottenere il risultato cercato in quanto non era possibile che tale valore, all'aumentare dei punti dati in pasto alla funzione, cresceva in una direzione, mentre diminuiva nella direzione opposta.

Ho deciso quindi di usare il valore medio del vettore degli scarti tra la tangente e la curva come parametro decisionale.

Per il calcolo di tale parametro si utilizza sempre la funzione `regress` nella forma:

```
[B,BINT,R] = regress(Y,X)
```

in cui la variabile R contiene il vettore dei valori residui, mentre le altre due variabili non sono di interesse; valutando poi la media tra i valori assoluti dei residui ottengo il parametro decisionale cercato.

```
Rm=mean(abs(R([1:Piniz end-Piniz+1:end])));
```

Il valore medio è ottenuto a partire da un numero di punti pari a quelli iniziali, presi per metà in testa al vettore dei residui R e per metà in coda allo stesso; ciò è fatto affinché il valore medio non risenta della lunghezza, crescente ad ogni iterazione, del vettore R, ma sia valutato su un numero di punti costante; ciò permette una maggiore affidabilità di tale parametro essendo valutato sui soli punti più estremi della tangente.

La funzione `regress` richiede in ingresso: come Y la tangente calcolata ad ogni iterazione e come X la porzione di potenziale centrata nel punto iniziale scelto ('ti' per il plateau e 'tf' per il flesso).

Per calcolare la tangente si usano le istruzioni 'polyfit' e 'polyval': la funzione `polyfit` calcola i coefficienti del polinomio interpolante e in ingresso vuole il vettore dei tempi e la porzione di curva su cui interpolare ,entrambi i vettori devono avere la stessa lunghezza per cui il vettore dei tempi è preso da una porzione del tempo totale, prendendo gli stessi punti utilizzati per interpolare; inoltre come ultimo input vuole il grado del polinomio interpolante che in questo caso è '1' volendo generare una retta tangente.

La funzione `polyval` genera la tangente vera e propria dandogli in ingresso i coefficienti del polinomio interpolante calcolati in precedenza con `polyfit` e il vettore dei tempi utilizzato in precedenza con `polyfit`.

Il codice risulta pertanto:

```
q=p(ti-Piniz-im:ti+Piniz+ip);  
t1=t(ti-Piniz-im:ti+Piniz+ip);  
pol=polyfit(t1,q,1);  
tan1=polyval(pol,t1);  
[y,y,R]=regress(tan1,q);  
Rm=mean(abs(R([1:Piniz end-Piniz+1:end])));
```

- la variabile 'q' contiene la porzione di potenziale in un intorno del punto centrale.

- ‘Piniz’ è il numero di punti iniziali che scelgo di dare al fine di poter calcolare la tangente, i quali sono dati in egual misura a destra e a sinistra del punto iniziale.
- ‘im’ e ‘ip’ sono indici crescenti all’interno della ricorsione per il calcolo della tangente, che servono ad aggiungere punti ad ogni ciclo, rispettivamente a sinistra e a destra.
- ‘t1’ è la porzione di vettore dei tempi ‘t’ lungo quanto ‘q’.
- ‘pol’ contiene i coefficienti del polinomio interpolante.
- ‘tan1’ è la tangente calcolata con la funzione `polival` a partire da ‘pol’ e ‘t1’.
- ‘R’ è il vettore degli scarti tra curva e tangente calcolata automaticamente dalla funzione `regress`.
- ‘Rm’ è il valor medio del vettore degli scarti ovvero il parametro decisionale che si voleva ottenere.

4.3.3 Calcolo della tangente alla curva in modo iterativo

Prima della descrizione del ciclo e del suo funzionamento occorre descrivere come le variabili utilizzate vengono inizializzate:

- $R_m=0$, altrimenti verrebbe meno la condizione iniziale di ingresso nel ciclo.
- $kl=0$, questo parametro è un flag che può assumere solamente i valori 0 e 1 e mi permette di discriminare l’aggiunta di punti a destra o a sinistra, con questa inizializzazione per default l’algoritmo parte aggiungendo un punto a sinistra
- $ip=0$, $im=-1$, siccome, per costruzione del ciclo, all’avvio si avrebbe l’incremento di un punto a sinistra occorre assegnare il valore -1 a ‘im’, così che alla prima iterazione la tangente calcolata prenda solo i punti iniziali.
- $fsx=0$, $fdx=0$, sono indici che vengono incrementati di un’unità ogni qual volta la soglia viene superata, con questa inizializzazione si indica che non è mai stata superata la soglia limite.

- Piniz=50, punti iniziali a sinistra e a destra del centrale scelti sperimentalmente in seguito a numerose prove.
- Rlimit=0.218, valore soglia scelto in modo tale che i risultati ottenuti coincidessero con quelli sperimentali antecedenti lo sviluppo del presente algoritmo.

Il valor medio del vettore degli scarti R, come già detto, viene ricalcolato ad ogni ciclo in seguito all'incremento di punti sui quali viene di volta in volta ricalcolata la tangente alla curva.

L'esecuzione del ciclo è espressa dalle seguenti fasi:

1. Fino a che il parametro 'Rm' resta sotto il limite prestabilito si aggiunge un punto a destra o a sinistra, dei punti iniziali, alternativamente ad ogni iterazione attraverso l'incremento degli indici 'ip' e 'im'.
2. Quando il parametro Rm supera la soglia viene registrata la direzione nella quale è avvenuto il sorpasso della stessa, attraverso l'incremento di 'fsx' o 'fdx', e viene rimosso l'ultimo punto aggiunto; da questo momento ad ogni successiva iterazione viene aggiunto un punto alla volta nella sola direzione in cui **non** è avvenuto il superamento della soglia.
3. Qual'ora si superasse ulteriormente la soglia, viene eliminato l'ultimo punto e si riprova nella direzione opposta, la stessa in cui è avvenuto il sorpasso della soglia la prima volta, aggiungendo sempre un punto alla volta. Questo perché aggiungendo punti in un'unica direzione potrebbe essere che la tangente si sia spostata anche se di poco e che quindi non causi più il superamento della soglia; questo è quindi un controllo per una maggiore affidabilità dell'algoritmo.
4. Infine quando la soglia viene superata ulteriormente, per un totale quindi di due volte in una delle due direzioni di accrescimento, si esce dal ciclo e l'ultima tangente calcolata è quella definitiva.

Il codice utilizzato è:

```
while Rm<=Rlimit && fdx<2 &&fsx<2
    if (kl==0 && fdx==0 && fsx==0) ||fdx==1
        im=im+1;
```

```

        kl=1;
elseif (kl==1 && fdx==0 && fsx==0) ||fsx==1
    ip=ip+1;
    kl=0;
end

q=p(ti-Pinizsx-im:ti+Pinizdx+ip);
t1=t(ti-Pinizsx-im:ti+Pinizdx+ip);
pol=polyfit(t1,q,1);
tan1=polyval(pol,t1);
[y,y,R]=regress(tan1,q);
Rm=mean(abs(R([1:Piniz end-Piniz+1:end])));

if Rm>Rlimit && fsx<2 && fdx<2
    Rm=0;
    if kl==1
        fsx=fsx+1;
        im=im-1;
    else
        fdx=fdx+1;
        ip=ip-1;
    end
end

end
end

```

Si noti all'interno del ciclo il codice per il calcolo della tangente, a conferma che essa viene ricalcolata ad ogni iterazione e su essa ricalcolato il parametro decisionale 'Rm' di volta in volta.

Gli indici e i flag inizializzati precedentemente hanno i seguenti comportamenti durante il ciclo:

- Gli indici 'im' e 'ip' vengono in generale incrementati di un' unità ad ogni iterazione in funzione della fase del ciclo che si sta eseguendo, ma possono anche essere decrementati, sempre di un'unità, solo quando 'Rm' supera la soglia per eliminare il punto che causa l'errore.
- 'kl' permette di alternare l'aggiunta di un punto a destra o a sinistra attraverso la continua oscillazione tra 0 e 1 del suo valore che viene variato ad ogni iterazione in seguito all'incremento degli indici 'ip' o 'im'. L'attività di questa variabile permette l'esecuzione della fase 1 del ciclo.
- 'fsx' e 'fdx' come già detto sono indici che vengono incrementati di un'unità ogni qual volta la soglia viene superata, in particolare qual'ora la soglia venisse superata in seguito dell'aggiunta di un punto a sinistra allora

fsx incrementerebbe di 1; lo stesso avviene per fdx. Queste due variabili, in base ai valori assunti, permettono al ciclo di aggiungere punti in unica direzione nella fase 2 e 3; infatti in seguito alla fase 1, l'alternanza della stessa viene by-passata dal nuovo valore di queste due variabili. L'intero ciclo termina quando una di queste due variabili assume il valore '2', ciò significa che la soglia è stata superata due volte in quella direzione.

4.3.4 Differenze tra il ciclo per il calcolo della tangente sul plateau e sul flesso

La procedura per il calcolo delle due tangenti è diversa e quindi sono necessari accorgimenti specifici. Il ciclo presentato nella trattazione fino a questo momento fa riferimento al calcolo della tangente nella zona di plateau del potenziale.

Il funzionamento del ciclo per il flesso segue essenzialmente la stessa logica fin qui descritta con alcune differenze:

- Il punto iniziale è ovviamente un altro: 'tf' e non 'ti'.
- I punti iniziali 'Piniz' sono per questo ciclo 5, un numero molto ridotto rispetto ai 50 punti iniziali del ciclo sul plateau per due motivi:
 - La zona del flesso è in generale più ristretta del plateau, necessita quindi di un minor numero di punti iniziali.
 - La zona del flesso è soggetta a minori errori strumentali e un minor numero di punti iniziali è sufficiente per caratterizzare una tangente, ed è questo il motivo principale di tale scelta.
- 'Rlimit' è differente fra i due cicli, per entrambi è stato valutato separatamente al fine di ottenere risultati coincidenti con quelli sperimentali ottenuti in precedenza. Tali valori sono: 0.218 per il ciclo del plateau e 0.8 per il ciclo del flesso finale.

4.4 Estrazione dei parametri di interesse

Al termine della caratterizzazione delle regioni in cui si è suddiviso l'AP è possibile distinguere, valutare e memorizzare i parametri di interesse nella matrice 3D. Alcuni marker sono già stati calcolati durante la fase di elaborazione precedente e richiedono quindi la sola memorizzazione altri necessitano invece di esser calcolati o estrapolati prima di poter esser salvati.

I primi marker ad essere estrapolati sono quelli relativi agli istanti temporali che descrivono l'inizio e la fine delle 4 regioni; di questi parametri sono già noti gli indici che puntano all'istante di tempo nel vettore 't' e da questo possono essere facilmente estrapolati attraverso la scrittura: $t_p = t(t_{p1})$ in cui è mostrata l'extrapolazione del tempo di picco dell' AP. Come il tempo di picco anche il tempo a cui si ha il 90% della ripolarizzazione e il tempo in cui il potenziale torna al valore di riposo, rispettivamente 't90' e 'trest', sono estrapolati allo stesso modo noti i propri indici calcolati in precedenza.

Il tempo che descrive la fine della fase di plateau e l'inizio di quella di flesso invece possono essere estrapolati dai vettori dei tempi parziali 't1' e 't2', che sono utilizzati in fase di analisi della linearità di queste regioni. I vettori 't1' e 't2' altro non sono che parti del vettore dei tempi 't' e contengono quindi gli stessi valori; per costruzione degli algoritmi è più semplice extrapolare gli istanti temporali da questi array in quanto l'istante di fine plateau risulta essere semplicemente l'ultimo valore di t1, mentre l'istante di fine flesso coincide col primo valore di t2.

```
tdx=t1(length(t1),1);
tsf=t2(1,1);
```

le variabili 'tdx' e 'tsf' rappresentano rispettivamente i valori temporali appena descritti, nel frammento di codice riportato viene mostrato come essi vengono estrapolati.

In seguito tutti i valori temporali vengono salvati nella matrice 3D nella propria posizione prestabilita attraverso scritture del tipo: $DB(j,2,k)=tdx$; in cui si riporta il salvataggio del valore temporale di fine fase di plateau o regione 1.

Per quanto riguarda i potenziali relativi agli istanti temporali precedenti, alcuni possono essere scritti direttamente nella matrice 3D perché già calcolati come il valore del picco di potenziale, il valore di riposo e V90. I restanti due invece, ovvero il potenziale di fine plateau e di inizio flesso devono essere estrapolati dal vettore 'p' che contiene i valori di potenziale di tutto il tracciato; per fare ciò occorre conoscere gli indici a cui trovare i valori, essi possono essere calcolati dal rapporto fra il loro tempo relativo estratto precedentemente e il passo di campionamento; questo rapporto deve essere poi convertito in integer per poter essere usato come indice numerico di scorrimento dell'array 'p'. A seguire è

riportata la porzione di codice che mostra l'identificazione dell'indice e l'estrapolazione del valore di potenziale cercato il quale è direttamente salvato nella corretta posizione nella matrice 3D.

```
idx=int16(tdx/dt);  
DB(j,7,k)=p(idx);
```

l'esempio si riferisce al potenziale di fine regione di plateau.

I prossimi marker ad esser memorizzati richiedono prima di essere calcolati a partire dal vettore della corrente 'I' e dagli indici calcolati in precedenza e in parte durante le diverse fasi di elaborazione del software.

I primi ad esser calcolati sono gli integrali della corrente riferiti alle diverse regioni con cui si ha suddiviso l'AP ed estese anche al tracciato della corrispondente corrente, un modo semplice di calcolare un integrale in Matlab è utilizzare la funzione `trapz`.

La funzione calcola una stima dell'integrale approssimato ad un trapezoide; essa richiede in ingresso un array che descriva il periodo temporale di interesse e un array che contenga i valori del segnale (in questo caso la corrente) riferiti allo stesso periodo temporale, i due vettori devono quindi avere la stessa lunghezza.

Per ottenere un vettore che contenga il periodo di interesse mi basta prendere la porzione di 't' fra gli indici che limitano tale regione; con gli stessi indici posso prendere la porzione di corrente di interesse a partire dal vettore 'I'.

```
tz1=t(tp1:idx);  
I1=I(tp1:idx);  
A1=abs(trapz(tz1,I1));
```

Nell'esempio 'tp1' e 'idx' indicano rispettivamente gli indici di picco e di fine plateau e descrivono pertanto la prima regione, in seguito al calcolo l'area viene salvata nella matrice 3D. La funzione `abs` ha la sola funzione di prendere il valore assoluto di tale integrale ignorandone il segno.

Al termine del calcolo dei marker di integrale della corrente è possibile calcolare la percentuale che queste aree hanno sull'area totale che comprende tutte e 4 le regioni di suddivisione. Per calcolare questi marker occorre in primo luogo calcolare l'area totale data dalla somma delle quattro aree calcolate in precedenza,

a seguire un semplice calcolo percentuale del rapporto tra una area parziale e quella totale restituisce il risultato voluto.

$$\begin{aligned} A_{tot} &= A1 + A2 + A3 + A4; \\ DB(j, 12, k) &= (A1 / A_{tot}) * 100; \end{aligned}$$

Nell'esempio è riportato il calcolo della percentuale della corrente della regione 1 quella di plateau che viene contemporaneamente memorizzato nella matrice 3D, dove A_{tot} indica la somma degli integrali della corrente nelle quattro regioni e $A1$ l'integrale della corrente nella regione 1.

4.5 Costruzione delle matrici dei risultati

Al termine dei cicli di gestione della matrice 3D, in cui si è calcolato e segnato nella stessa matrice tutti i marker di interesse, si costruisce una matrice, questa volta bi-dimensionale contenente i valori medi e le deviazioni standard di alcuni dati di interesse, in parte già calcolati come gli integrali e percentuali delle correnti e in parte da calcolare come la durata delle fasi caratteristiche del potenziale.

Questa nuova tabella è creata mediante la semplice scrittura:

$$MeSTD = \text{ones}(j_{max}, 24);$$

in cui viene creata una matrice di soli '1' delle dimensioni volute; sfruttando il fatto che il numero delle righe di cui deve essere costituita è pari al numero di righe della matrice 3D e quindi al numero di fogli excel contenente i dati originali e del numero di sperimentazioni effettuate variando uno dei parametri di modello. È quindi comodo gestire tale tabella tramite un ciclo 'for' calcolando ad ogni iterazione valori che si riferiscono ad una sola tipologia di sperimentazione per volta.

Per il calcolo delle medie e rispettive deviazioni standard si utilizzano una coppia di funzioni Matlab in grado di trascurare eventuali valori NaN nella matrice 3D, ed esse sono: 'nanmean' e 'nanstd' che rispettivamente calcolano media e deviazione standard.

I primi dati calcolati sono la durata delle quattro regioni: esse sono calcolate prima come differenza tra gli istanti temporali che ne caratterizzano l'inizio e la fine e su tale valore viene quindi calcolata la media e la deviazione standard.

Esempio di codice:

```
MeSTD(j,1)=nanmean(DB(j,2,:)-DB(j,1,:)); %durata 1a fase  
MeSTD(j,2)=nanstd(DB(j,2,:)-DB(j,1,:));
```

Nell'esempio è riportato il calcolo della durata della prima fase, si ricorda che a DB(j,2,:) e a DB(j,1,:) corrispondono tutti gli istanti temporali di fine plateau e di picco riferiti alla j-esima tipologia di sperimentazione. Tale tipologia di codice è del tutto equivalente a quella per il calcolo delle durate temporali delle altre tre regioni.

Per quanto riguarda gli integrali e le corrispondenti percentuali di corrente, essendo già state calcolate in fase di scrittura nella matrice 3D, occorre solo calcolarne media e deviazione standard tramite istruzioni del tipo:

```
MeSTD(j,11)=nanmean(DB(j,12,:)); %percentuale area fase 1  
MeSTD(j,12)=nanstd(DB(j,12,:));
```

in cui si mostra il calcolo riferito al solo integrale della corrente nella regione 1.

A partire da questa matrice di risultati appena descritta, si implementa una nuova matrice che contiene le sole medie trascurando le deviazioni standard. I valori medi che contiene la nuova matrice sono riferiti però alle singole cellule e non a tutte le sperimentazioni fatte, ciò significa che la nuova matrice di risultati ha un numero di righe tre volte inferiore a 'MeSTD', in quanto per ogni cellula si hanno tre sperimentazioni che corrispondono a tre variazioni del parametro di modello: al valore nominale del parametro di modello, ad un valore aumentato ed ad un valore diminuito rispetto al valore nominale; la nuova matrice ha inoltre un numero di colonne pari alla metà di quella di partenza, 12 invece di 24 (in quanto si ignorano le deviazioni standard).

La nuova matrice è stata chiamata ‘MedieCell’ ed è stata creata tramite:

```
MedieCell=ones (jmax/5,12);
```

La scrittura dei risultati in questa matrice è affidata a due cicli for: quello esterno che gestisce le righe incrementando una variabile ‘j’ da 1 a jmax/5 (dove jmax è il numero di righe di ‘MeSTD’) e quello interno che gestisce le colonne incrementando la variabile ‘i’ da 1 a 12. L’implementazione interna ai cicli per il calcolo e la scrittura dei risultati risulta:

```
MedieCell(j,i)=(MeSTD((j*3)-2,(i*2)-1)+MeSTD((j*3)-1,(i*2)-1)+MeSTD(j*3,(i*2)-1))/3;
```

in cui per leggere i dati su cui calcolare la media si sfruttano gli stessi indici ‘i’ e ‘j’, in particolare con ‘(i*2)-1’ si riesce a leggere le colonne dei valori medi di ‘MeSTD’ tralasciando quelle dei valori standard.

Per quanto riguarda le righe da cui prendere il dato iniziale in ‘MeSTD’, l’obiettivo è quello di leggere tre righe consecutive ad ogni iterazione che corrispondono, come detto in precedenza, alle tre sperimentazioni fatte su ogni cellula; ciò viene implementato moltiplicando l’indice ‘j’ per tre e sottraendogli 0,1 e 2 a seconda della riga che si vuole leggere.

Altre due tabelle di risultati sono poi create a partire dalle precedenti in esse è espressa la variazione percentuale dei soli valori medi della tabella ‘MeSTD’ del parametro di modello modificato rispetto al parametro di modello nominale, ciò è fatto su ogni cellula in una tabella e sull’intero set di cellule per l’altra tabella, per la loro parte di codice si veda l’appendice A.

La variazione percentuale è valutata tramite:

$$Var\% = durata1 \left(\left(\frac{Vatt}{\overline{Vatt}} \right) - 1 \right) * 100$$

in cui si mostra il calcolo della variazione percentuale della durata della prima regione, in relazione alla variazione del parametro di attivazione, dove $Vatt$ indica il parametro modificato e \overline{Vatt} il parametro al valore nominale.

CAPITOLO 5

Risultati Ottenuti dalla Elaborazione Automatica

In questo capitolo sono presentati i risultati preliminari ottenuti attraverso l'elaborazione automatica implementata nel capitolo precedente. L'analisi è stata fatta su un ampio set di dati che mi è stato fornito dalla Dott.sa Claudia Altomare dell'Università degli studi di Milano-Bicocca; questi dati sono stati registrati in seguito alle modifiche di alcuni parametri che descrivono la corrente I_{Kr} nel modello di Luo-Rudy modificato, descritto nel capitolo 3. In particolare i dati forniti sono originati dalla variazione dei parametri di steady-state della variabile di *gating* di attivazione e inattivazione, la variazione della conduttanza massima di membrana e della costante di tempo τ .

Per ognuno di questi quattro parametri mi è stato fornito un file excel che riporta le registrazioni degli AP e delle corrispondenti correnti di cinque diverse cellule, su ogni cellula il parametro è fatto variare in un intorno dal valore ottimale di modello.

La variabile di attivazione è fatta variare tra i valori di -20.6 , -35 e -5mV, quella di inattivazione assume invece i valori in un intorno di ± 15 mV da -30.7mV.

La conduttanza è traslata attraverso i valori di 0.022, 0.032 e 0.042S, ovvero in un intorno di circa $\pm \frac{1}{3}$ dal valore nominale (0.032S), mentre per quanto riguarda la costante di tempo essa è imposta ai valori di 100, 270 e 400ms.

I parametri calcolati tramite l'elaborazione automatica sono tutti calcolati a partire dalle durate e dagli integrali di corrente relativi ad ogni cellula, calcolati nella tabella 'MeSTD'; oltre a questi risultati sono stati ottenuti altri valori quali: i valori medi su tutto il set di cinque cellule, e le variazioni percentuali che ogni risultato ha rispetto al risultato ottenuto col valore nominale del parametro di modello.

In primis vengono mostrati degli esempi di tracciati e di dati ottenuti per la variazione del parametro di attivazione, mentre per gli altri parametri di modello i risultati ottenuti verranno solo discussi. I grafici sono ottenuti attraverso un programma in Matlab che sfrutta gli stessi criteri dello strumento implementato, e descritto nel capitolo 4, per definire le quattro regioni di suddivisione dell'AP, ma

al contrario questa versione del codice si limita a tracciare i grafici e non calcola alcun valore; questo codice è riportato in appendice B all'elaborato.

Nel seguito del capitolo verranno discussi i risultati generali ottenuti dall'elaborazione automatica facendone infine un confronto con le analisi fatte precedentemente tramite analisi manuale.

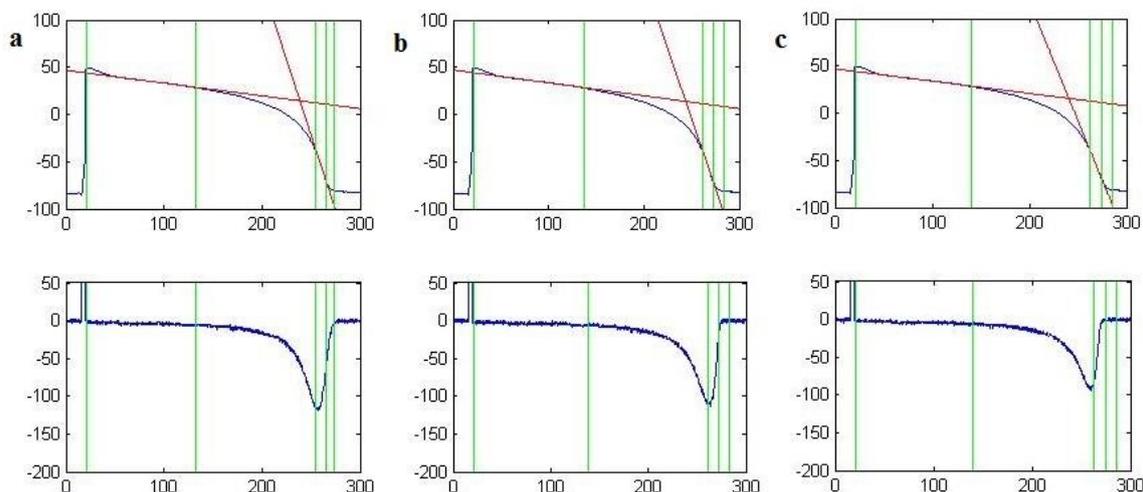


Figura 5.1 – Variazione del parametro di attivazione.

In figura 5.1 sono mostrati a titolo di esempio dei grafici ottenuti dalla variazione del parametro di attivazione, in particolare il grafico **a** riporta i tracciati risultanti dal decremento della variabile di attivazione al valore -35mV , il grafico **b** riporta i tracciati corrispondenti al valore nominale del parametro, ovvero -20.6 mV e infine il grafico **c** mostra cosa avviene ai tracciati incrementando il parametro di attivazione a -5mV ; tutti i grafici fanno riferimento alla stessa cellula per cui confrontandoli fra loro si potranno osservare quali effetti causa la variazione di questo parametro sul potenziale d'azione e sulla corrente ionica.

Dai grafici si può vedere come il picco negativo della corrente diminuisca all'aumentare del parametro, passando dal grafico **a** al grafico **c**.

Un modo più semplice di cogliere informazioni sulla variazione di potenziali e correnti è quello di guardare i risultati numerici calcolati dallo strumento implementato e descritto dal capitolo 4.

	Vatt	Durata Fase 1 (ms)		Durata Fase 2 (ms)		Durata Fase 3 (ms)		Durata fase 4 (ms)	
		Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD
sev37	-35	113,8	4,2	120,4	3,8	10,5	0,2	8,7	0,4
	-20,6	116,3	4,3	121,8	4,8	10,5	0,1	10,6	0,4
c5	-5	118,9	2,8	125,6	3,4	11,8	0,2	10,6	0,3

Tabella 5.1- Durate delle 4 fasi del potenziale d'azione.

In Tabella 5.1 è riportata una porzione dei dati ottenuti che fanno riferimento alla stessa cellula e quindi anche ai tracciati riportati in figura 5.1; da questa tabella si può notare che non ci sono grandi differenze in termini di variazioni delle durate delle 4 regioni del potenziale, infatti anche nelle figure non si notava un prolungamento né un accorciamento dell'AP.

Altri risultati, riportati in tabella 5.2, riferiti alle correnti misurate sulla stessa cellula, mostrano come la percentuale di carica aumenti in corrispondenza delle regioni 1 e 2 all'aumentare del parametro di attivazione a discapito delle regioni 3 e 4 su cui si registra invece un calo; ciò può essere notato attraverso l'andamento della percentuale di corrente di ogni fase sul totale, mentre l'integrale della corrente può avere un comportamento meno caratteristico. Ciò può essere visualizzato anche attraverso i grafici in figura 5.1, in cui si nota come il picco di corrente sembra traslare verso sinistra all'aumentare del parametro di attivazione.

In tabella 5.2 sono mostrate le sole medie dei risultati ottenuti dall'elaborazione delle correnti, ma come per le durate dei fasi del potenziale, anche per essi sono state calcolate anche le deviazioni standard.

	Vatt	Integrale Corrente Fase 1 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 1 (%)	
		Media	STD	Media	STD
sev37	-35	413,7	31,7	8,5	0,6
	-20,6	425,8	28,9	9,4	0,6
c5	-5	433,3	25,4	10,9	0,6

	Vatt	Integrale Corrente Fase 2 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 2 (%)	
		Media	STD	Media	STD
sev37	-35	3100,3	33,5	64,0	0,6
	-20,6	3207,1	47,4	70,6	0,6
c5	-5	3162,3	54,8	79,9	0,7

	Vatt	Integrale corrente Fase 3 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 3 (%)	
		Media	STD	Media	STD
sev37	-35	1118,1	26,2	23,1	0,5
	-20,6	890,6	14,3	19,6	0,4
c5	-5	361,5	11,3	9,1	0,3

	Vatt	Integrale corrente Fase 4 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 4 (%)	
		Media	STD	Media	STD
sev37	-35	213,1	5,1	4,4	0,1
	-20,6	18,3	1,3	0,4	0,0
c5	-5	2,4	1,4	0,1	0,0

Tabella5.2 – Medie su tutte le tracce registrate da una cellula degli integrali calcolati sulle correnti e delle corrispondenti percentuali sul totale per ogni regione in cui si è suddiviso il potenziale d'azione.

Ulteriori dati possono essere poi elaborati calcolando la media su tutte le cellule o altrimenti valutando la variazione percentuale rispetto alla condizione nominale di modello per ogni cellula oppure la variazione percentuale su tutto il set di cellule.

Vatt	Durata Fase 1 (ms)	Durata Fase 2 (ms)	Durata Fase 3 (ms)	Durata Fase 4 (ms)
-35	116,4	103,0	11,6	10,7
-20,6	119,2	112,6	10,6	11,8
-5	118,9	111,0	12,3	11,5

Tabella5.3 – Valori medi della durata delle quattro regioni su tutto il set di cellule.

In tabella 5.3 sono riportati i valori medi delle durate delle quattro fasi di tutte le cellule che compongono la sperimentazione relativa alla variazione del parametro di attivazione.

Come si può notare, confrontando questa tabella e la 5.1, la prima cellula analizzata ha la prima regione leggermente più corta e la seconda più lunga della media, mentre le altre regioni sono in linea coi valori medi. Anche attraverso questa tabella è possibile vedere come al variare del parametro di attivazione la durata delle quattro fasi non ne è influenzata.

Per quanto riguarda la variazione del parametro di inattivazione, dai risultati ottenuti si nota che la durata dell'intero AP sembra diminuire all'aumentare del

parametro del modello, in particolare diminuendo la fase 1 e 2, mentre le altre regioni restano costanti; gli integrali calcolati sulla corrente mostrano un aumento generale in tutte e 4 le regioni, ma una diminuzione in percentuale della fase 3 e 4; questo dimostra un incremento del flusso di carica uscente dalla cellula ed è quindi in accordo con una diminuzione della durata del potenziale.

La variazione della conduttanza massima di membrana mostra un comportamento altalenante difficilmente definibile da cellula a cellula, sia sulla durata del potenziale che sulla corrente; un aspetto questo che aveva sorpreso già durante l'analisi manuale di questi dati, e che quindi caratterizza la conduttanza massima di membrana come un parametro da studiare in modo più approfondito.

Infine la variazione del parametro della costante di tempo del modello non ha un grosso effetto sulla durata del potenziale d'azione che resta circa costante; allo stesso modo sembra influire anche poco sulla corrente.

I risultati che ho potuto confrontare fanno riferimento alla sola prima cellula ed alla variazione della variabile di attivazione, la stessa su cui ci si è incentrati in precedenza; il confronto tra questi e i risultati ottenuti dall'elaborazione automatica mostrano alcune lievi divergenze fra le due analisi, ma una buona parte di queste possono essere risolte da una taratura più efficace dei valori di soglia delle varie parti dello strumento implementato, anche se alcune differenze rimangono.

	Vatt	Durata Fase 1 (ms)		Durata Fase 2 (ms)		Durata Fase 3 + fase 4 (ms)	
		Media	STD	Media	STD	Media	STD
sev37	-35	108;113,8	4,2	129,2;120,4	3,8	16,3;19,1	0,6
	-20,6	109,9;116,3	4,3	123,9;121,8	4,8	24,02;21,1	0,5
c5	-5	110,8;118,9	2,8	130,6;125,6	3,4	12,32;22,4	0,5

	Vatt	Integrale Corrente Fase 1 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 1 (%)	
		Media	STD	Media	STD
sev37	-35	381,5;413,7	31,7	8,3;8,5	0,6
	-20,6	390;425,8	28,9	8,3;9,4	0,6
c5	-5	394;433,3	25,4	9,8;10,9	0,6

	Vatt	Integrale Corrente Fase 2 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 2 (%)	
		Media	STD	Media	STD
sev37 c5	-35	3151;3100	33,5	69;64	0,6
	-20,6	1350;3207	47,4	63;70,6	0,6
	-5	3089;3162	54,8	77,2;79,8	0,7

	Vatt	Integrale corrente Fase 3 + 4 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 3 + 4 (%)	
		Media	STD	Media	STD
sev37 c5	-35	1035;1331	31,3	22,6;27,5	0,6
	-20,6	1350;908,9	15,6	28,6;20,0	0,4
	-5	512;363,9	12,7	12,8;9,2	0,3

Tabella5.4 – Confronto fra l’analisi automatica e quella sperimentale.

In tabella 5.4 sono riportati i dati ottenuti dall’elaborazione automatica confrontati con i dati ottenuti dall’analisi manuale riportati in rosso.

Nelle quattro tabelle successive sono invece riportati i valori medi e la variazione standard di ogni parametro calcolato per ogni cellula analizzata, ognuna delle quali si riferisce alle variazioni di uno dei parametri di modello modificati e rispettivamente sono: la variazione della variabile di attivazione, quella di inattivazione, la variazione della conduttanza massima di membrana e la variazione della costante di tempo τ .

	Vatt	Durata Fase 1 (ms)		Durata Fase 2 (ms)		Durata Fase 3 (ms)		Durata Fase 4 (ms)		Integrale Corrente Fase 1 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 1 (%)		Integrale Corrente Fase 2 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 2 (%)		Integrale Corrente Fase 3 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 3 (%)		Integrale Corrente Fase 4 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 4 (%)	
		Medi	STD	Medi	STD	Medi	STD	Medi	STD	Medi	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD
5	-35	113.8	4.2	120.4	3.8	10.5	0.2	8.7	0.4	414	31.7	8.5	0.6	3100	33.5	64.0	0.6	1118	26.2	23.1	0.5	213	5.1	4.4	0.1
7	-20,6	116.3	4.3	121.8	4.8	10.5	0.1	10.6	0.4	426	28.9	9.4	0.6	3207	47.4	70.6	0.6	891	14.3	19.6	0.4	18	1.3	0.4	0.0
5	-5	118.9	2.8	125.6	3.4	11.8	0.2	10.6	0.3	433	25.4	10.9	0.6	3182	54.8	79.9	0.7	382	11.3	9.1	0.3	2	1.4	0.1	0.0
5	-35	104.0	2.0	86.2	1.6	15.8	0.5	21.8	0.6	760	37.8	10.4	0.4	3883	123.4	53.2	1.1	2254	68.6	30.9	1.2	407	6.9	5.6	0.1
7	-20,6	104.1	2.6	92.4	2.2	9.7	0.5	23.0	2.1	732	37.0	11.6	0.6	4749	74.6	75.1	1.5	823	86.1	13.0	1.3	19	3.9	0.3	0.1
6	-5	103.3	4.9	92.9	4.7	13.6	1.2	22.4	1.3	746	59.8	14.0	1.1	4376	113.4	82.1	2.1	201	92.9	3.8	1.7	5	2.9	0.1	0.1
5	-35	97.6	8.5	71.3	8.4	11.0	0.4	7.2	0.3	1451	234.6	13.2	2.4	6821	237.6	62.0	4.9	2500	616.9	22.3	5.0	273	90.1	2.4	0.8
8	-20,6	97.6	7.8	72.4	7.6	11.1	0.2	8.2	0.7	1492	220.8	13.9	2.0	7168	182.4	67.1	1.6	2013	65.2	18.8	0.7	17	1.7	0.2	0.0
4	-5	98.4	7.2	73.1	5.4	13.7	1.3	7.6	0.1	1441	171.9	16.0	1.8	6578	311.9	73.2	3.9	982	252.7	10.7	2.8	2	1.2	0.0	0.0
5	-35	93.7	1.9	81.4	1.2	9.3	0.4	6.7	0.3	578	25.0	10.2	0.4	3537	82.3	62.2	1.0	1336	56.5	23.5	1.1	239	6.4	4.2	0.1
8	-20,6	90.7	1.8	76.9	1.5	9.8	0.1	6.8	0.2	552	15.0	11.0	0.3	3211	44.1	64.1	0.4	1213	17.3	24.2	0.5	30	3.2	0.6	0.1
5	-5	92.0	1.8	78.3	1.6	10.9	0.3	6.9	0.2	564	23.6	12.8	0.3	3203	80.8	72.5	0.7	647	32.4	14.7	0.8	2	1.0	0.0	0.0
5	-35	173.1	7.1	155.6	9.2	11.5	0.2	9.2	0.1	815	73.2	17.9	1.6	3738	101.1	81.9	1.6	7	2.6	0.1	0.1	3	2.3	0.1	0.0
9	-20,6	187.5	7.0	199.5	9.5	12.0	0.1	10.5	0.3	683	73.0	11.5	1.3	5268	110.3	88.4	1.3	4	3.8	0.1	0.1	5	3.0	0.1	0.1
2	-5	182.1	10.8	185.0	11.6	11.7	0.2	9.9	0.2	640	58.6	12.0	1.2	4664	133.7	87.5	1.4	24	48.4	0.4	0.9	5	1.8	0.1	0.0

	Vinatt	Durata Fase 1 (ms)		Durata Fase 2 (ms)		Durata Fase 3 (ms)		Durata fase 4 (ms)		Integrale Corrente Fase 1 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 1 (%)		Integrale Corrente Fase 2 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 2 (%)		Integrale corrente Fase 3 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 3 (%)		Integrale corrente Fase 4 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 4 (%)			
		Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD
S																											
e	Δ-15	82,9	4,8	76,9	2,6	10,9	0,2	8,2	0,2	205	26,8	9,0	1,0	1366	43,2	59,8	0,8	657	11,6	28,8	1,0	58	2,3	2,5	0,1		
V																											
3	-30,7	75,5	6,8	65,6	6,0	11,3	0,5	8,0	0,2	418	61,3	11,1	1,6	2317	91,2	61,6	1,8	968	43,3	25,8	1,1	57	4,3	1,5	0,1		
C																											
2	Δ+15	77,7	8,4	66,1	13,3	11,3	0,6	8,3	0,4	506	439,2	11,5	4,9	2334	1204,5	61,0	2,1	908	297,3	25,9	4,8	52	3,7	1,7	0,6		
S																											
e	Δ-15	89,3	8,2	71,0	6,5	7,6	0,2	6,4	0,2	261	43,1	11,4	1,6	1401	77,5	61,4	1,8	554	13,3	24,3	1,2	65	5,4	2,8	0,2		
V																											
3	-30,7	74,0	10,8	68,5	9,5	7,8	0,2	6,2	0,3	443	128,9	11,5	3,3	2501	120,5	65,4	3,0	809	19,2	21,2	0,6	73	3,4	1,9	0,1		
C																											
8	Δ+15	52,9	5,8	60,9	6,9	8,2	0,3	5,9	0,2	722	166,8	12,1	2,9	4176	214,6	69,7	3,1	1021	41,1	17,1	0,6	67	3,3	1,1	0,1		
S																											
e	Δ-15	128,4	3,4	107,9	3,2	10,7	0,2	10,5	0,2	370	30,8	10,0	0,6	2440	70,1	65,9	0,6	847	16,7	22,9	0,7	46	2,7	1,2	0,1		
V																											
3	-30,7	118,4	3,3	99,3	4,2	10,8	0,2	10,6	0,5	812	39,0	12,8	0,5	4260	155,8	67,1	0,8	1220	19,9	19,2	0,7	54	5,1	0,8	0,1		
4																											
C																											
2	Δ+15	104,9	11,1	77,5	13,9	10,7	0,1	9,6	0,4	1705	667,7	18,1	4,1	5765	1679,8	64,9	0,9	1360	249,9	16,3	3,6	54	7,3	0,7	0,3		
S																											
e	Δ-15	82,7	7,7	69,6	8,4	8,6	0,3	5,9	0,1	137	25,7	9,4	1,7	882	43,1	60,7	2,3	402	12,5	27,7	1,2	32	3,1	2,2	0,2		
V																											
3	-30,7	73,1	9,3	69,5	8,8	9,7	0,2	5,7	0,1	297	65,7	11,2	2,4	1672	70,6	63,3	2,5	641	11,2	24,3	0,5	32	3,1	1,2	0,1		
4																											
C																											
4	Δ+15	54,6	2,1	67,5	1,8	9,9	0,1	5,7	0,2	520	22,2	11,7	0,4	3068	72,7	69,2	0,6	809	9,8	18,3	0,4	35	2,9	0,8	0,1		
S																											
e	Δ-15	108,5	7,5	89,0	4,8	7,2	0,0	4,8	0,1	180	34,5	10,3	1,7	1121	31,4	64,2	1,2	395	2,8	22,6	0,7	51	2,2	2,9	0,1		
V																											
3																											
5	-30,7	103,6	6,3	81,0	7,6	7,4	0,1	4,7	0,1	442	59,0	13,9	1,7	2104	76,4	66,2	1,9	574	4,7	18,1	0,3	57	3,5	1,8	0,1		
C																											
2	Δ+15	86,9	11,4	65,5	12,0	7,4	0,1	4,7	0,1	1034	244,9	19,4	4,7	3542	275,6	66,4	4,8	701	6,8	13,1	0,2	60	3,2	1,1	0,1		

	Gmax	Durata Fase 1 (ms)		Durata Fase 2 (ms)		Durata Fase 3 (ms)		Durata Fase 4 (ms)		Integrale Corrente Fase 1 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 1 (%)		Integrale Corrente Fase 2 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 2 (%)		Integrale corrente Fase 3 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 3 (%)		Integrale corrente Fase 4 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 4 (%)				
		Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	
S																												
e	0,022	138,9	4,2	115,0	2,7	10,8	0,1	12,7	1,1	641	20,8	13,1	0,3	3397	65,9	69,3	0,4	824	8,6	16,8	0,4	40	5,7	0,8	0,1			
V																												
3																												
4	0,032	144,3	4,0	119,2	4,0	10,7	0,2	13,5	0,8	873	39,5	13,1	0,5	4504	83,7	67,6	0,7	1224	30,1	18,4	0,4	65	4,9	1,0	0,1			
C																												
2	0,042	129,3	6,5	107,7	6,3	10,5	0,2	12,3	0,5	986	139,8	13,1	0,8	4950	512,0	65,8	1,6	1526	228,1	20,1	1,0	79	14,3	1,0	0,1			
S																												
e	0,022	100,5	1,7	82,4	1,2	11,8	0,2	8,2	0,2	441	10,1	11,3	0,2	2608	32,6	66,5	0,6	847	19,3	21,6	0,5	25	2,1	0,6	0,1			
V																												
3																												
3	0,032	93,9	1,2	74,4	1,3	12,6	0,3	8,2	0,1	680	89,3	10,8	1,3	3699	51,9	59,1	1,0	1832	37,9	29,3	0,8	45	4,4	0,7	0,1			
C																												
1	0,042	105,3	1,6	85,5	1,3	11,4	0,2	7,8	0,2	607	24,9	11,4	0,4	3357	48,5	62,9	0,6	1310	26,1	24,6	0,5	61	4,7	1,1	0,1			
S																												
e	0,022	86,5	6,3	73,7	5,4	11,2	0,4	8,3	0,2	413	39,7	12,5	1,0	2224	110,8	67,3	1,2	629	30,0	19,1	1,1	35	2,8	1,1	0,1			
V																												
3																												
3	0,032	78,4	3,4	59,3	3,9	11,5	0,5	7,8	0,3	545	64,9	12,9	1,1	2650	114,4	63,0	1,4	972	90,6	23,1	1,3	42	5,0	1,0	0,1			
C																												
2	0,042	73,7	7,4	65,6	6,9	11,5	0,2	8,1	0,2	556	99,2	11,0	1,9	3200	192,9	63,3	2,0	1242	22,5	24,6	1,1	55	3,8	1,1	0,1			
S																												
e	0,022	73,0	9,4	72,5	8,4	9,1	0,4	5,7	0,1	216	56,1	11,1	2,8	1296	57,1	66,7	2,4	407	19,0	21,0	1,3	24	2,4	1,2	0,1			
V																												
3																												
4	0,032	70,9	10,3	67,2	9,2	9,8	0,1	5,7	0,1	298	80,7	11,3	3,0	1655	76,7	63,0	3,1	644	9,7	24,5	0,4	31	2,7	1,2	0,1			
C																												
4	0,042	63,5	7,4	70,3	6,6	9,8	0,1	5,7	0,1	306	67,8	9,5	2,0	2017	80,8	62,6	2,2	857	8,7	26,6	0,6	45	3,1	1,4	0,1			
S																												
e	0,022	97,8	5,2	79,5	3,5	8,5	0,3	6,2	0,1	349	23,8	12,7	0,8	1955	52,9	70,8	1,0	459	15,0	15,9	0,6	17	2,4	0,6	0,1			
V																												
3																												
5	0,032	96,1	6,3	78,5	6,9	9,1	0,3	6,3	0,2	475	63,8	12,6	1,7	2571	102,5	68,2	1,6	698	28,9	18,5	0,8	25	1,9	0,7	0,0			
C																												
4	0,042	96,9	7,2	70,5	8,9	9,4	0,6	6,4	0,7	607	158,5	13,2	3,4	2955	149,6	64,6	3,2	972	37,6	21,3	0,9	41	30,9	0,9	0,7			

	Tau	Durata Fase 1 (ms)		Durata Fase 2 (ms)		Durata Fase 3 (ms)		Durata fase 4 (ms)		Integrale Corrente Fase 1 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 1 (%)		Integrale Corrente Fase 2 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 2 (%)		Integrale corrente Fase 3 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 3 (%)		Integrale corrente Fase 4 (pA*ms)		Percentuale Corrente Fase 4 (%)			
		Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD	Media	STD
S																											
e	100	80,9	3,7	54,8	2,7	11,2	0,1	7,2	0,2	320	37,5	11,8	1,4	1936	286,3	71,4	10,6	439	291,6	16,2	10,7	17	29,5	0,6	1,1		
v																											
4																											
O	270	76,5	3,3	54,5	3,3	10,8	0,2	7,0	0,1	284	29,8	10,5	1,1	1541	38,5	56,9	1,1	854	21,7	31,6	1,0	29	2,3	1,1	0,1		
C																											
2	400	82,1	3,0	57,4	1,6	10,7	0,1	7,3	0,1	315	21,9	10,8	0,7	1569	16,6	57,2	0,6	890	12,7	30,5	0,4	45	3,3	1,6	0,1		
S																											
e	100	129,1	2,7	98,3	2,8	17,3	0,3	13,0	0,7	402	24,5	10,8	0,5	2194	58,8	58,8	1,0	1125	26,0	30,2	0,9	11	3,4	0,3	0,1		
v																											
4																											
O	270	121,4	2,0	94,5	2,4	12,9	0,2	11,8	0,2	361	18,6	9,8	0,4	2234	43,7	60,6	0,8	1033	21,8	28,6	0,7	39	2,8	1,0	0,1		
C																											
4	400	129,3	3,9	105,2	3,2	13,3	0,3	12,7	0,2	402	21,0	9,7	0,4	2566	60,1	61,8	0,8	1128	33,1	27,2	1,0	57	3,2	1,4	0,1		
S																											
e	100	171,4	4,4	154,8	2,8	12,7	0,1	11,4	0,2	580	29,6	13,0	0,5	3845	77,5	86,0	0,5	41	3,0	0,9	0,1	6	2,6	0,1	0,1		
v																											
3																											
9	270	169,9	4,7	140,0	4,6	14,2	1,7	10,9	0,3	556	38,4	12,3	0,6	3611	192,5	80,1	3,4	336	145,8	7,5	3,3	5	2,6	0,1	0,1		
C																											
2	400	182,1	10,3	154,9	7,2	14,0	0,5	11,5	0,2	617	72,7	12,3	1,2	4059	77,6	80,8	1,3	342	50,8	6,8	1,0	7	2,7	0,1	0,1		
S																											
e	100	67,0	7,0	71,7	6,8	10,2	0,2	5,7	0,1	287	58,4	10,1	2,3	1777	282,0	67,0	11,6	539	254,8	20,2	9,4	76	99,0	2,8	3,6		
v																											
3																											
4	270	70,0	9,4	66,7	8,4	9,8	0,1	5,7	0,1	286	71,5	10,9	2,7	1669	75,8	63,4	2,9	645	11,1	24,5	0,4	32	2,6	1,2	0,1		
C																											
4	400	69,0	9,7	69,1	10,3	9,3	0,4	5,8	0,2	285	77,5	11,4	3,0	1609	313,6	64,7	12,4	481	163,9	19,4	6,6	112	141,5	4,5	5,8		
S																											
e	100	61,6	2,6	72,5	3,6	9,2	0,4	5,9	0,2	349	22,5	9,5	0,4	2497	134,3	68,0	1,5	797	36,0	21,8	1,5	27	2,7	0,7	0,1		
v																											
3																											
3	270	64,7	2,3	76,9	2,9	7,5	0,1	5,5	0,3	346	10,0	9,0	0,2	2627	84,6	68,2	0,6	793	14,8	20,6	0,5	84	4,5	2,2	0,1		
C																											
8	400	66,3	8,0	71,1	8,7	7,4	0,1	5,4	0,3	377	104,9	9,9	2,8	2507	145,0	66,1	2,9	809	13,1	21,4	0,7	98	6,8	2,6	0,2		

CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stato implementato uno strumento software col quale sono stati analizzati alcuni tracciati di potenziali d'azione e delle corrispondenti correnti, questi tracciati, registrati dalla Dott.ssa Claudia Altomare dell'Università degli studi di Milano-Bicocca, rappresentano diverse variazioni dei parametri del modello che descrive la corrente ionica I_{Kr} , in particolare la variabile di attivazione, di inattivazione, la conduttanza massima di membrana e la costante di tempo; Questo modello di I_{Kr} è stato realizzato dalla Dott.ssa Chiara Bartolucci ottimizzando il modello di cardiomiocita ventricolare di Luo-Rudy.

Lo strumento che è stato implementato si inserisce nel contesto di ricerca sui potenziali d'azione di cellule ventricolari di *guinea pig*, in particolare è stato in grado di valutare la variabilità dei potenziali d'azione e delle corrispondenti correnti in risposta alle variazioni del modello.

Questo strumento è stato creato implementando delle metodiche che standardizzano il calcolo di alcuni parametri indicativi della variabilità tra potenziali successivi; tra questi metodi il più importante è sicuramente l'algoritmo per la valutazione della regione lineare del plateau e del flesso di ripolarizzazione; questo metodo insieme a quelli per definire in che istante si ha il 90% del valore della ripolarizzazione e per definire l'istante a cui si raggiunge il valore di riposo hanno permesso di dividere il potenziale d'azione in 4 regioni che sono poi state estese alla corrispondente corrente e dalle quali è stato possibile calcolare i parametri di durata, quantità di carica che fluisce attraverso la membrana, calcolata come l'integrale della corrente e percentuale della carica sul totale per ognuna delle quattro regioni.

I risultati ottenuti sono in parte in accordo con quelli ottenuti dall'analisi manuale, salvo una più attenta calibrazione dello strumento, ma in ogni caso essendo l'analisi manuale fatta "ad occhio" questi risultati sono da trattare con maggiore attenzione e quindi maggiormente affetti da errore, mentre quelli ottenuti dall'analisi automatica utilizzano sempre gli stessi criteri per analizzare i tracciati e i suoi risultati sono quindi più affidabili.

A partire da questi risultati si è però giunti a conclusioni simili a quelle raggiunte in precedenza quali, la diminuzione della durata del potenziale d'azione

all'aumentare della variabile di inattivazione e l'incertezza introdotta dalla variazione della conduttanza massima.

Lo strumento è realizzato per analizzare dei tracciati registrati a 5KHz di frequenza di campionamento; pertanto quando nel codice Matlab si riporta lo spostamento lungo un vettore, quale quello dei tempi o quello del potenziale, di un numero definito di punti bisogna prestare attenzione. Questo numero infatti garantisce sicurezza per un tracciato acquisito con frequenza di campionamento pari a 5 KHz come quelli che ho potuto analizzare; per un'altra frequenza di campionamento tale numero potrebbe non garantire un corretto funzionamento dello strumento, tale aspetto costituisce dunque una criticità della quale è necessario prendere in considerazione qual'ora si utilizzasse un'altra frequenza di campionamento.

Una possibile soluzione a ciò può essere di imporre che lo spostamento venga espresso in termini di un tempo anziché di punti su un vettore, a prescindere dalla frequenza di campionamento.

Per esempio 50 punti ad una frequenza di 5KHz corrispondono a 10ms Ciò può essere implementato attraverso la sostituzione del semplice numero di punti con il rapporto tra 10 ms e il passo di campionamento che è salvato nella variabile 'dt'; il rapporto deve essere poi trasformato in integer affinché possa essere usato come indice di un array.

L'obiettivo di implementare uno strumento in grado di automatizzare il calcolo di alcuni parametri caratteristici del potenziale d'azione e della corrispondente corrente è stato quindi raggiunto e lo strumento realizzato si dimostra essere un valido aiuto nell'analisi di questi tracciati; infatti l'analisi attraverso esso risulta essere più precisa perché utilizza gli stessi criteri su tutti i tracciati e inoltre, calcolando in maniera automatica, riduce di molto i tempi di analisi.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Membrana Cellulare ([http://www.oilproject.org/sites/default/files/images/Membrana%20cellulare\(1\).png](http://www.oilproject.org/sites/default/files/images/Membrana%20cellulare(1).png)).
- [2] Canale del sodio (http://medicinapertutti.altervista.org/farmacologia/farmacologia_cellulare_e_molecolare/img_far_cel_e_mol/struttura_del_canale_del_sodio.jpg).
- [3] Schema pompa sodio potassio (http://ibbio.pbworks.com/f/1349911457/07_16SodiumPotassiumPump.jpeg).
- [4] Correnti ioniche in un AP (<http://www.pierluigimasini.it/med/wp-content/uploads/2013/01/grafico-potenziale-azione-miocardio-comune.jpg>).
- [5] Dee Unglaub Silverthorn, **Fisiologia Umana – un approccio integrato**, Pearson.
- [6] Schema accoppiamento eccitazione-contrazione (http://gae.unipa.it:81/scbiologiche/upload%5Clezione19_21%20IL%20cuore.pdf).
- [7] Donald M. Bers, **Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force**, Kluwer Academic Publishers.
- [8] Patch Clamp (<http://www.bem.fi/book/04/04x/0427x.gif>).
- [9] Voltage Clamp (<http://life.nthu.edu.tw/~g864264/Graph/clamp.jpg>).
- [10] R. Wilders, **Dynamic Clamp: a powerful tool in cardiac electrophysiology**, The Journal of Physiology, 2006.
- [11] Yoram Rudy Jonathan R.Silva, **Computational biology in the study of cardiac Ion channels and cell electrophysiology**, Quarterly Reviews of Biophysic, 2006.

- [12] C. Luo & Y.Rudy, **A Model of the Ventricular Cardiac Action Potential – Depolarization, Repolarization and Their Interaction**, Circulation Research, 1991.
- [13] J.Zeng K.R.Laurita D.S.Rosenbaum Y.Rudy, **Two Components of the Delayed Rectifier K⁺ Current in Ventricular Myocytes of the Guinea Pig Type – Theoretical Formulation and Their Role in Repolarization**, Circulation Research, 1995.
- [14] C.Bartolucci C.Altomare M.Bennati S.Furini A.Zaza S.Severi , **Combined Action Potential- and Dynamic-Clamp for Accurate Computational Modeling of the Kinetics of Cardiac I_{Kr} Current.**
- [15] C.Altomare L.Sala C.Bartolucci G.Mostacciuolo S.Severi A.Zaza , **I_{Kr} impact on repolarization and its variability assessed by Dynamic-Clamp.**

APPENDICE

A

```
clear all;close all;clc;
[y,sheets]=xlsfinfo('attivazione.xlsx');
jmax=length(sheets);
kmax=1;
for j=1:jmax
    file=xlsread('attivazione.xlsx',j);
    siz=size(file);
    n=siz(1,2);
    n=(n-1)/2;
    if kmax<n
        kmax=n;
    end
end
DB=ones(jmax,18,kmax);
DB(:)=NaN;
clear n sheets kmax

for j=1:jmax
    file=xlsread('attivazione.xlsx',j);
    siz=size(file);
    t=file(2:length(file),1);
    dt=t(3,1)-t(2,1);
    sig=file(2:length(file),2:siz(1,2));
    M=(siz(1,2)-1)/2;

    for k=1:M
        p=sig(:,k);           %potenziale e corrispondente corrente
        I=sig(:,M+k)*20;

        [picco,tp1]=max(p);

                                %calcolo dell'indice ad APD90
        Vrest=p(2,1);
        V90=(picco-Vrest)/10)+Vrest;
        iend=tp1;
        while p(iend)>=V90
            iend=iend+1;
        end

                                % calcolo dell'indice di riposo
        irest=iend;
        eps=2.6;
        while p(irest)>= Vrest+eps
            irest=irest+1;
        end

        tf=iend-20;
        ti=ceil((tp1+tf)/2.88);

        im=-1;                %inizio ciclo per tan su plateau
        ip=0;
        kl=0;
        Rm=0;
        fdx=0;
```

```

fsx=0;
Piniz=50;
Rlimit=0.218;

while Rm<=Rlimit && fdx<2 && fsx<2
if (kl==0 && fdx==0 && fsx==0)||fdx==1
    im=im+1;
    kl=1;
elseif (kl==1&& fdx==0 && fsx==0)||fsx==1
    ip=ip+1;
    kl=0;
end

q=p(ti-Piniz-im:ti+Piniz+ip);
t1=t(ti-Piniz-im:ti+Piniz+ip);
pol=polyfit(t1,q,1);
tan1=polyval(pol,t1);
[y,y,R]=regress(tan1,q);
Rm=mean(abs(R([1:Piniz end-Piniz+1:end])));

if Rm>Rlimit && fsx<2 && fdx<2
    Rm=0;
    if kl==1
        fsx=fsx+1;
        im=im-1;
    else
        fdx=fdx+1;
        ip=ip-1;
    end
end

end
end

im=-1;           %ciclo per la tan del flesso finale
ip=0;
kl=0;
Rm=0;
fdx=0;
fsx=0;
Piniz=5;
Rlimit=0.8;

while Rm<=Rlimit && fsx<2 && fdx<2
if (kl==0 && fdx==0 && fsx==0)||fdx==1
    im=im+1;
    kl=1;
elseif (kl==1&& fdx==0 && fsx==0)||fsx==1
    ip=ip+1;
    kl=0;
end

q=p(tf-Piniz-im:tf+Piniz+ip);
t2=t(tf-Piniz-im:tf+Piniz+ip);
poll=polyfit(t2,q,1);
tan2=polyval(poll,t2);
[y,y,R]=regress(tan2,q);
Rm=mean(abs(R([1:Piniz end-Piniz+1:end])));

```

```

if Rm>Rlimit && fsx<2 && fdx<2
Rm=0;
    if kl==1
        fsx=fsx+1;
        im=im-1;
    else
        fdx=fdx+1;
        ip=ip-1;
    end
end
end

tp=t(tp1,1); %istante picco
tdx=t1(end,1); %istante ultimo punto tan plateau
tsf=t2(1,1); %istante primo punto tan del flesso
t90=t(iend); %tempo ad APD90
trest=t(irest); %tempo di fine fase 4

idx=int16(tdx/dt);
isf=int16(tsf/dt);

DB(j,1,k)=tp; %tempo di picco
DB(j,2,k)=tdx; %tempo di fine plateau
DB(j,3,k)=tsf; %tempo di inizio flesso
DB(j,4,k)=t90; %tempo ad APD90
DB(j,5,k)=trest; %tempo di riposo

DB(j,6,k)=picco; %ampiezza del picco
DB(j,7,k)=p(idx); %ampiezza a fine plateau
DB(j,8,k)=p(isf); %ampiezza a inizio flesso
DB(j,9,k)=V90; %ampiezza ad APD90
DB(j,10,k)=Vrest; %ampiezza di riposo

tz1=t(tp1:idx);
I1=I(tp1:idx);
A1=abs(trapz(tz1,I1));
DB(j,11,k)=A1; %AREA fase 1 corrente

tz2=t(idx:isf);
I2=I(idx:isf);
A2=abs(trapz(tz2,I2));
DB(j,13,k)=A2; %AREA fase 2 corrente

tz3=t(isf:iend);
I3=I(isf:iend);
A3=abs(trapz(tz3,I3));
DB(j,15,k)=A3; %AREA fase 3 corrente

tz4=t(iend:irest);
I4=I(iend:irest);
A4=abs(trapz(tz4,I4));
DB(j,17,k)=A4; %AREA fase 4 corrente

Atot=A1+A2+A3+A4;
DB(j,12,k)=(A1/Atot)*100; %percentuali aree
correnti 1 2 3 e 4
DB(j,14,k)=(A2/Atot)*100;
DB(j,16,k)=(A3/Atot)*100;

```

```

        DB(j,18,k)=(A4/Atot)*100;

    end
end

MeSTD=ones(jmax,24); %matrice di valori medi e deviazioni standart
for j=1:jmax
    MeSTD(j,1)=nanmean(DB(j,2,:)-DB(j,1,:)); %durata 1a fase
    (plateau)
    MeSTD(j,2)=nanstd(DB(j,2,:)-DB(j,1,:));

    MeSTD(j,3)=nanmean(DB(j,3,:)-DB(j,2,:)); %durata 2a fase
    (gomito)
    MeSTD(j,4)=nanstd(DB(j,3,:)-DB(j,2,:));

    MeSTD(j,5)=nanmean(DB(j,4,:)-DB(j,3,:)); %durata 3a fase
    (flesso)
    MeSTD(j,6)=nanstd(DB(j,4,:)-DB(j,3,:));

    MeSTD(j,7)=nanmean(DB(j,5,:)-DB(j,4,:)); %durata 4a fase
    (da APD90 a Vrest)
    MeSTD(j,8)=nanstd(DB(j,5,:)-DB(j,4,:));

    MeSTD(j,9)=nanmean(DB(j,11,:)); %area 1a fase
    MeSTD(j,10)=nanstd(DB(j,11,:));
    MeSTD(j,11)=nanmean(DB(j,12,:)); %percentuale area fase 1
    MeSTD(j,12)=nanstd(DB(j,12,:));

    MeSTD(j,13)=nanmean(DB(j,13,:)); %area 2a fase
    MeSTD(j,14)=nanstd(DB(j,13,:));
    MeSTD(j,15)=nanmean(DB(j,14,:)); %percentuale area fase 2
    MeSTD(j,16)=nanstd(DB(j,14,:));

    MeSTD(j,17)=nanmean(DB(j,15,:)); %area 3a fase
    MeSTD(j,18)=nanstd(DB(j,15,:));
    MeSTD(j,19)=nanmean(DB(j,16,:)); %percentuale area fase 3
    MeSTD(j,20)=nanstd(DB(j,16,:));

    MeSTD(j,21)=nanmean(DB(j,17,:)); %area 4a fase
    MeSTD(j,22)=nanstd(DB(j,17,:));
    MeSTD(j,23)=nanmean(DB(j,18,:)); %percentuale area fase 4
    MeSTD(j,24)=nanstd(DB(j,18,:));
end

MediePar=ones(jmax/5,12);
for j=1:jmax/5
    for i=1:12
        MediePar(j,i)=(MeSTD(j,(i*2)-1)+MeSTD(j+3,(i*2)-1)+
1)+MeSTD(j+6,(i*2)-1)+MeSTD(j+9,(i*2)-1)+MeSTD(j+12,(i*2)-1))/5;
    end
end

VarPerc=ones(10,12);
for j=1:5
    for i=1:12
        VarPerc((j*2)-1,i)=(MeSTD((j*3)-2,(i*2)-1)/MeSTD((j*3)-
1,(i*2)-1))-1)*100;
        VarPerc(j*2,i)=(MeSTD((j*3),(i*2)-1)/MeSTD((j*3)-1,(i*2)-
1))-1)*100;
    end
end

```

```

end

VarMedie=ones(2,12);
for j=1:2
    for i=1:12

VarMedie(j,i)=(VarPerc(j,i)+VarPerc(j+2,i)+VarPerc(j+4,i)+VarPerc(
j+6,i)+VarPerc(j+8,i))/5;
    end
end

```

B

```

clear all;close all;clc;
file=xlsread('attivazione.xlsx',3);
siz=size(file);
t=file(2:length(file),1);
dt=t(3,1)-t(2,1);
sig=file(2:length(file),2:siz(1,2));
M=(siz(1,2)-1)/2;
for k=1:M
    p=sig(:,k);           %potenziale e corrispondente corrente
    I=sig(:,M+k)*20;

    [picco,tp1]=max(p);

    Vrest=p(2,1);
    V90=((picco-Vrest)/10)+Vrest;
    iend=tp1;
    while p(iend)>=V90
        iend=iend+1;
    end

    irest=iend;
    eps=2.6;
    while p(irest)>= Vrest+eps
        irest=irest+1;
    end

    tf=iend-20;
    ti=ceil((tp1+tf)/2.88);

    im=-1;               %%inizio ciclo per tan su plateau
    ip=0;
    kl=0;
    Rm=0;
    fdx=0;
    fsx=0;
    Piniz=50;
    Rlimit=0.218;

    while Rm<=Rlimit && fdx<2 &&fsx<2
        if (kl==0 && fdx==0 && fsx==0) ||fdx==1
            im=im+1;
            kl=1;
        elseif (kl==1 && fdx==0 && fsx==0) ||fsx==1

```

```

        ip=ip+1;
        kl=0;
    end

    q=p(ti-Piniz-im:ti+Piniz+ip);
    t1=t(ti-Piniz-im:ti+Piniz+ip);
    pol=polyfit(t1,q,1);
    tan1=polyval(pol,t1);
    [y,y,R]=regress(tan1,q);
    Rm=mean(abs(R([1:Piniz end-Piniz+1:end])));

    if Rm>Rlimit && fsx<2 && fdx<2
        Rm=0;
        if kl==1
            fsx=fsx+1;
            im=im-1;
        else
            fdx=fdx+1;
            ip=ip-1;
        end
    end

end
end

im=-1;           %ciclo per la tan del flesso finale
ip=0;
kl=0;
Rm=0;
fdx=0;
fsx=0;
Pinizf=5;
Rlimit=0.8;

while Rm<=Rlimit && fdx<2 && fsx<2
    if (kl==0 && fdx==0 && fsx==0) || fdx==1
        im=im+1;
        kl=1;
    elseif (kl==1 && fdx==0 && fsx==0) || fsx==1
        ip=ip+1;
        kl=0;
    end

    q=p(tf-Pinizf-im:tf+Pinizf+ip);
    t2=t(tf-Pinizf-im:tf+Pinizf+ip);
    poll=polyfit(t2,q,1);
    tan2=polyval(poll,t2);
    [y,y,R]=regress(tan2,q);
    Rm=mean(abs(R([1:Pinizf end-Pinizf+1:end])));

    if Rm>Rlimit && fsx<2 && fdx<2
        Rm=0;
        if kl==1
            fsx=fsx+1;
            im=im-1;
        else
            fdx=fdx+1;
            ip=ip-1;
        end
    end
end
end

```

```

end

u=[-500:500]';
o=ones(length(u),1);

tp=t(tp1,1); %istante picco
tp2=o.*tp;
tdx=t1(length(t1),1); %istante ultimo punto tan plateau
tdx1=o.*tdx;
tsf=t2(1,1); %istante primo punto tan del flesso
tsf1=o.*tsf;

%calcolo dell'indice ad APD90

t90=t(iend); %tempo ad APD90
t901=o.*t90;
isf=int16(tsf/dt);

trest=t(irest); %tempo di fine fase 4
trest1=o.*trest;

tan=polyval(pol,t); %tan su plateau e flesso
tanf=polyval(poll,t);

figure(k)
subplot(211)
plot(t,p,'b',t,tan,'r',t,tanf,'r');hold on

plot(tp2,u,'g',tdx1,u,'g',tsf1,u,'g',t901,u,'g',trest1,u,'g')
axis([0 t(length(t),1) -100 100])
subplot(212)

plot(t,I,tp2,u,'g',tdx1,u,'g',tsf1,u,'g',t901,u,'g',trest1,u,'g')
axis([0 t(length(t),1) -200 50])

end

```