

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITA' DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

TITOLO DELL' ELABORATO

Ricerca, classificazione e archiviazione dei dati
di elettrofisiologia cellulare cardiaca umana per
l'identificazione di modelli matematici.

Elaborato in

Laboratorio di Bioingegneria

Relatore:

Dott.re Stefano Severi

Presentata da:

Matteo Lungherini

Correlatori:

Dott.ssa Elisa Passini

Sessione II

Anno Accademico 2013/14

INDICE

INTRODUZIONE	I
Capitolo 1	
<i>Elettrofisiologia cardiaca e modellistica del potenziale d'azione</i>	1
1.1 Canali ionici e potenziale d'azione	1
1.2 Ciclo del calcio intracellulare	14
1.3 Storia dell'elettrofisiologia cardiaca	16
1.4 Patch Clamp	18
1.5 Tecniche di Voltage- e Current- Clamp	20
1.6 Modellistica del potenziale d'azione cardiaco	23
Capitolo 2	
<i>Dati sperimentali umani</i>	29
2.1 Dati sperimentali	29
2.2 Dati sperimentali sulle correnti ioniche ventricolari	33
2.2.1 Ito (transient outward current)	33
2.2.2 INa	37
2.2.3 ICaL	39

2.2.4 IK (IKs IKr)	40
2.2.5 IK1 (Inward rectifier current)	42
2.2.6 INaCa (Incx)	44
2.2.7 INaK	44
<i>Materiali e Metodi</i>	47
3.1 Pubmed	47
3.2 Archiviazione grafici	48
3.3 Trasformazione in dati numerici (script MatLab)	51
<i>Risultati</i>	55
4.1 Caratteristiche quantitative dell'archivio dati	55
4.2 Confronto dati curve I-V riguardanti la corrente Ito	58
4.3 Confronto I-V tutte normalizzate	62
<i>Conclusioni</i>	63
<i>Appendice</i>	65
<i>Bibliografia</i>	79

INTRODUZIONE

L'elettrofisiologia cardiaca e lo studio delle correnti ioniche che governano il potenziale d'azione cardiaco si sono notevolmente evolute negli ultimi anni. L'approccio matematico e computazionale ha assunto un ruolo importante in questo ambito di ricerca e nuovi modelli matematici di potenziale d'azione sono stati via via pubblicati, di pari passo con la maggiore disponibilità di dati sperimentali.

Tuttavia, la ricerca dei dati sperimentali disponibili in letteratura è un processo molto laborioso. I dati disponibili relativi a cardiomiociti umani sono pochi e non sempre concordi tra loro.

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quindi quello di ricercare e archiviare tutti i dati sperimentali di correnti ioniche umane ventricolari presenti in letteratura fino ad oggi, per costruire uno strumento di facile utilizzo per chiunque abbia la necessità di sviluppare o validare modelli matematici di potenziale d'azione.

Partendo da una fase iniziale di ricerca vera e propria degli articoli in letteratura, utilizzando il motore di ricerca PubMed come strumento principale, sono stati estratti e archiviati tutti i dati di interesse, divisi per tipo di corrente, memorizzando le informazioni principali in un foglio di lavoro e salvando i dati sia come immagini che come vettori, per consentirne in futuro una rapida consultazione e un facile utilizzo.

Ringraziamenti

Un ringraziamento particolare al Dr. Stefano Severi ed alla Dr.ssa Elisa Passini per aver collaborato alla realizzazione di questo studio, fornendo competenza e supporto tecnico.

Capitolo 1

Elettrofisiologia cardiaca e modellistica del potenziale d'azione

Introduzione

In questo capitolo sono descritti e analizzati i principali eventi cellulari che portano alla formazione del potenziale d'azione nel miocita ventricolare. In seguito, vengono forniti cenni sull'elettrofisiologia cardiaca, dalle origini alle tecniche oggi in uso. Infine, viene introdotta la modellistica matematica del potenziale d'azione, con una presentazione dei modelli correntemente utilizzati.

1.1 Canali ionici e potenziale d'azione

Un canale ionico è una proteina altamente specializzata che permette il passaggio di ioni attraverso la membrana cellulare (principalmente Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^-). Tale proteina possiede dei segmenti che attraversano la membrana fosfolipidica nel suo spessore, mettendo così in comunicazione l'interno e l'esterno della cellula.

I canali ionici possono trovarsi in configurazioni che consentono il passaggio degli ioni (stato aperto) e in configurazioni che ne impediscono il passaggio (stato chiuso), come mostrato in Fig 1.1. Le transizioni del canale da uno stato all'altro costituiscono un meccanismo chiamato "gating", e corrispondono a cambiamenti conformazionali della struttura totale del canale. Che possono avvenire in risposta a diversi stimoli: per influenza di un campo elettrico, o per l'azione di ligandi chimici che si trovano nel compartimento extracellulare del canale o di secondi messaggeri che agiscono sul lato interno del canale, oppure per stress meccanico.

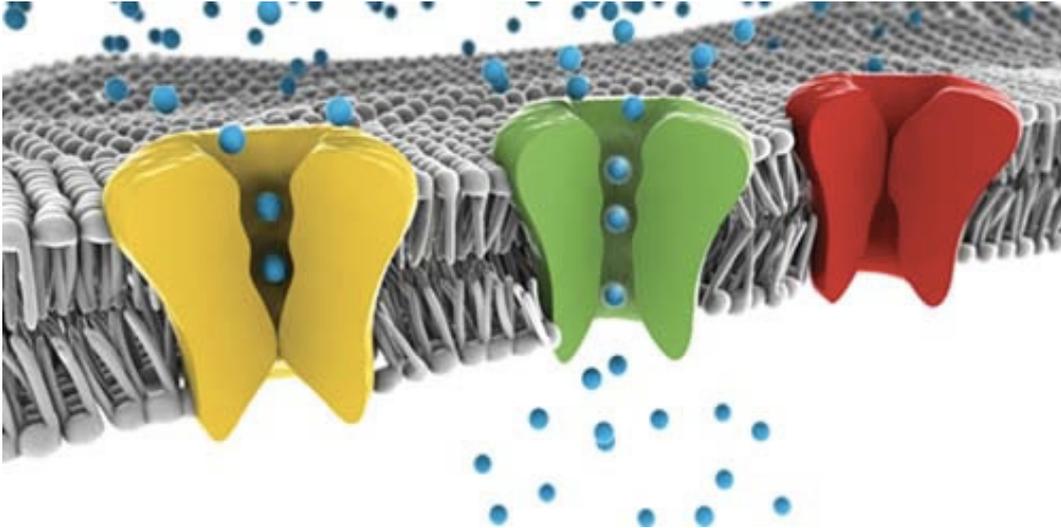


Figura 1.1: Rappresentazione grafica dei canali ionici. In giallo un canale chiuso, in verde un canale aperto, in rosso un canale la cui apertura è impedita da una mutazione (Illustrazione di J.P. Cartailier, Copyright 2007, Symmation LLC)

Alcuni canali per il K^+ sono generalmente aperti, e svolgono un ruolo fondamentale nella generazione del potenziale di membrana a riposo. Molti altri canali proteici sono solitamente chiusi, e si aprono in seguito a specifici segnali. Un segnale importante che regola lo stato dei canali ionici è il potenziale di membrana: i canali sensibili a questo tipo di grandezza sono detti voltaggio-dipendenti.

Tutti i canali ionici voltaggio-dipendenti hanno una struttura simile, ovvero sono costituiti da una sub-unità principale, che a sua volta è composta da più domini (1 per i canali del potassio, 4 per i canali del calcio e del sodio). Ogni dominio è costituito da 6 segmenti trans-membrana collegati tra loro da brevi sequenze di amminoacidi (loop). Una caratteristica fondamentale di questi canali è la presenza nel loop S4 di ogni dominio di più cariche positive, che fungono da sensori di voltaggio.

L'esistenza dei canali ionici è stata per la prima volta ipotizzata da Hodgkin e Huxley, ma la conferma sperimentale della loro esistenza è stata ottenuta solamente negli anni '70, scoperta che ha portato allo sviluppo di tecniche di indagine specifica (tecniche di *Voltage* o *Current clamp*), grazie alle quali è possibile caratterizzare i canali ionici in termini di conduttanza, di analizzarne le variazioni in risposta a determinati stimoli, e di studiarne le proprietà cinetiche (attivazione e inattivazione).

Di seguito vengono descritti in modo generale i canali coinvolti nella generazione del potenziale d'azione, ovvero la forma d'onda assunta dal potenziale elettrico trans-membrana di una singola cellula cardiaca in seguito ad un opportuno stimolo elettrico.

Canali del potassio

I canali del potassio costituiscono il gruppo di canali più eterogeneo, sia in termini di variabilità fra tipologie specifiche che in termini di presenza nelle varie zone del cuore. In condizioni fisiologiche la corrente generata dal flusso di K^+ è sempre di tipo uscente (positivo).

Due importanti correnti di potassio sono denominate I_{Kr} (rapid delayed rectifier current) e I_{Ks} (slow delayed rectifier current). Tali correnti sono principalmente attive durante il potenziale d'azione, anche se con costanti di tempo diverse (come indicato dal nome I_{Kr} è rapida e I_{Ks} più lenta).

Un'altra componente molto importante è la corrente I_{to} (transient outward current) attiva nella fase iniziale del potenziale d'azione e dalle dinamiche di attivazione e inattivazione molto veloci.

Esiste inoltre una corrente denominata I_{K1} (inward rectifier current) la quale mostra conduttanze diverse a diversi valori di potenziale di membrana: tale corrente è maggiormente attiva a potenziali estremamente negativi. Il suo ruolo è quello di stabilizzazione del potenziale di riposo della cellula (ovvero il valore di potenziale transmembrana assunto prima e dopo un potenziale d'azione) (Dhamoon2005).

L'insieme delle correnti finora introdotte (I_{Kr} , I_{Ks} , I_{to} , I_{K1}) rappresenta il gruppo di correnti di potassio più significativo e sperimentalmente riconosciuto.

Canali del sodio

La famiglia dei canali ionici Na^+ -permeabili è caratterizzata dalla capacità di rispondere ad una depolarizzazione anche molto leggera della membrana cellulare tramite una breve e intensa corrente entrante di ioni Na^+ (per convenzione negativa e denominata I_{Na} o fast inward current). Questi canali si inattivano a valori positivi del potenziale di membrana, proprietà in parte responsabile della mancata possibilità di tetanizzazione del muscolo cardiaco.

La complessa struttura del canale è caratterizzata da 4 domini simili, ognuno comprendente 6 eliche che attraversano la membrana. L'elica S4, che contiene numerosi aminoacidi basici, forma il sensore di voltaggio che, spostandosi verso l'esterno, consente l'apertura del canale quando la membrana viene depolarizzata. Una delle pieghe intracellulari è posizionata in modo da oscillare attraverso il canale e bloccarlo quando l'elica S4 viene spostata, con la conseguente inattivazione del canale. In Figura 1.2 un esempio di canale del sodio.

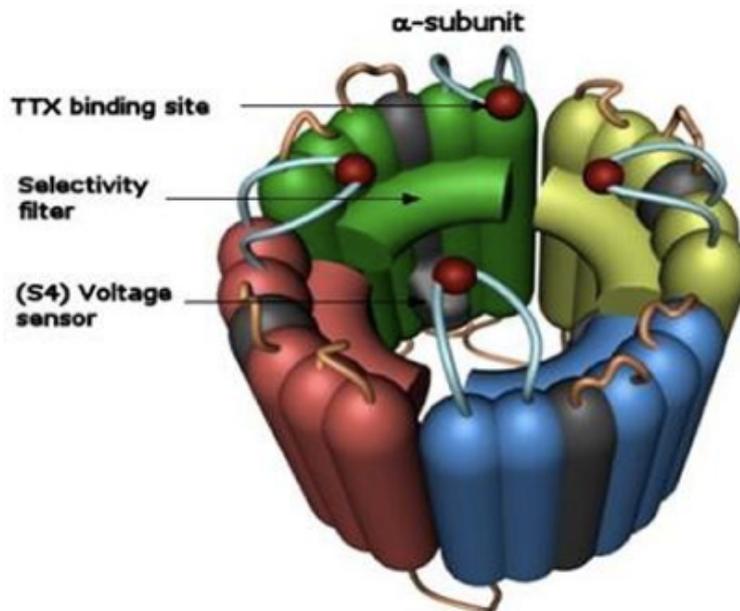


Figura 1.2: Rappresentazione schematica dei canali sodio voltaggio dipendenti (tratta da <http://medicinapertutti.altervista.org/>)

Canali del calcio

I canali del calcio si suddividono in due famiglie principali: canali L-Type e canali T-Type. I canali T-Type sono denominati in questo modo in quanto “Tiny” e “Transient”, ovvero di dimensioni ridotte ed a rapida inattivazione. I canali L-Type sono invece chiamati in questo modo in quanto “Large” e “Long-Lasting”, ovvero di dimensioni maggiori e dall'inattivazione più lenta. Questi ultimi saranno il tipo di canali del calcio che più contribuisce al potenziale d'azione e in generale alle dinamiche della cellula. Le correnti generate da entrambi i tipi di canali (I_{CaL} e I_{CaT}) mostrano proprietà di rapida attivazione (anche se non paragonabile alla rapidità di attivazione della corrente I_{Na}), dipendenza dal potenziale di membrana e dipendenza inversa dalla concentrazione di calcio

intracellulare (nella misura in cui ad un $[Ca^{2+}]_i$ maggiore corrisponde inattivazione più rapida). L'inattivazione lenta di I_{CaL} è determinante per la fase centrale del potenziale d'azione.

La presenza contemporanea di queste famiglie di canali sulla membrana cellulare crea, in presenza di uno stimolo elettrico esterno, una concatenazione di eventi intra ed extra-cellulari che fa assumere al potenziale elettrico transmembrana una forma specifica, appunto detta potenziale d'azione osservabile in Figura 1.3.

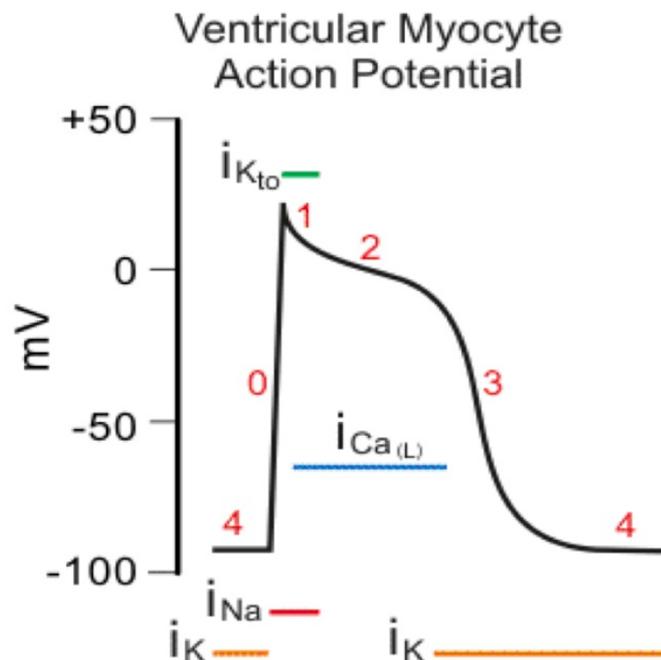


Figura 1.3: Forma specifica che assume il potenziale elettrico transmembranale, detta AP.

Il potenziale d'azione (AP) è l'evento iniziale nel processo di accoppiamento eccitazione-contrazione del muscolo cardiaco, è quindi fondamentale nel determinare la funzionalità cardiaca ed è inoltre responsabile della propagazione dell'eccitazione da cellula a cellula.

Nonostante le differenze riscontrabili nelle varie regioni cardiache, determinate da un'espressione diversa dei canali ionici nella membrana cellulare (in termini di densità e tipo di canali presenti), una prima caratterizzazione generale dell'AP richiede la distinzione di fasi successive nel processo di eccitazione cellulare, ciascuna delle quali riveste uno specifico ruolo e si manifesta con un tratto

peculiare all'interno della forma d'onda del potenziale di membrana.

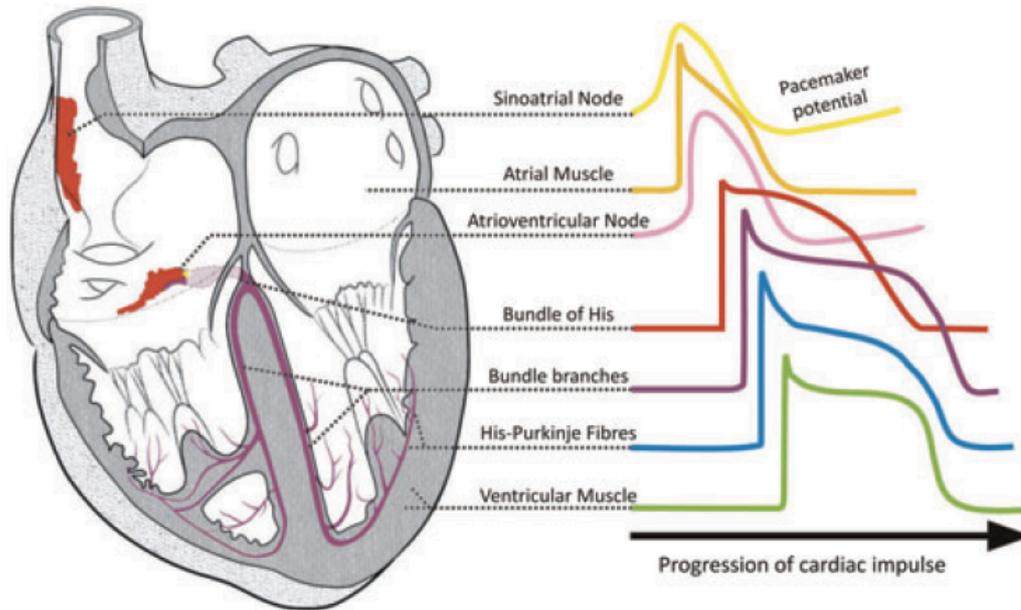


Figura 1.4: Forma del potenziale d'azione in regioni diverse del miocardio (Monfredi 2010).

A partire dal potenziale di riposo, ovvero dalla condizione di non eccitazione cellulare, che si esprime in un potenziale trans-membrana negativo ed approssimativamente stabile, l'innescò del potenziale d'azione, causato da uno stimolo opportuno, induce una rapida depolarizzazione della membrana, che costituisce la cosiddetta fase 0 dell'AP, durante la quale la differenza di potenziale si inverte, assumendo valori positivi (overshoot positivo). Alla fase 0 può seguire (a seconda del cardiomiocita in esame) una parziale e rapida ripolarizzazione transiente (fase 1) di più o meno modesta entità, seguita dalla fase 2, la fase più lunga, distinguibile per il plateau più o meno pronunciato, e che è molto importante per la durata del potenziale d'azione. La ripolarizzazione (fase 3), riporta il potenziale di membrana verso il valore di riposo, mantenuto durante la diastole (fase 4) fino a quando non insorge un nuovo AP.

Le varie fasi dell'AP sono mostrate in Figura 1.5.

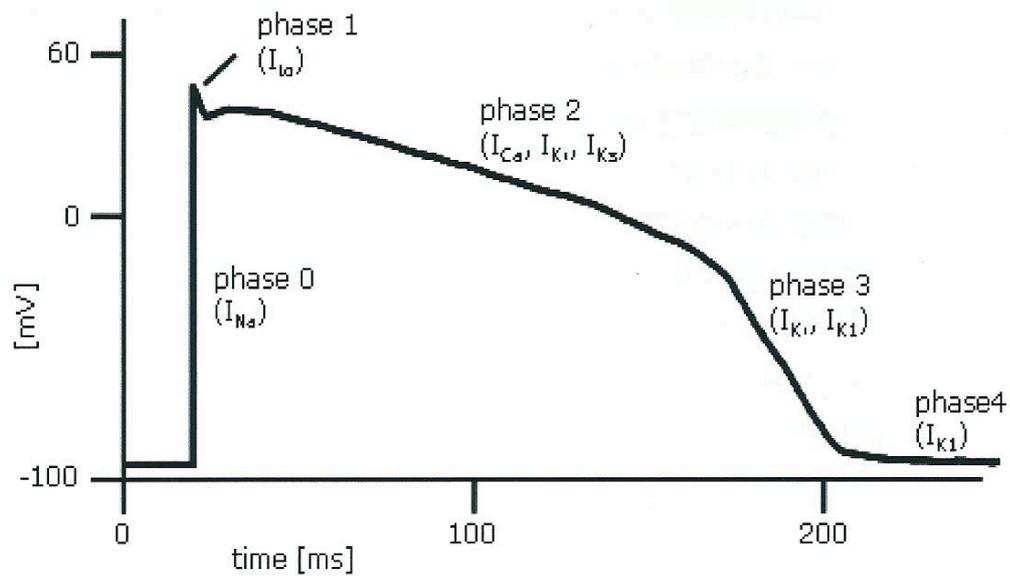


Figura 1.5: Potenziale d'azione di cellule miocardiche ventricolari. L'andamento dell'AP ha il caratteristico andamento spike-notch-dome (picco, fossa, cupola).

Le fasi del potenziale d'azione cardiaco sono associate a variazioni della permeabilità della membrana cellulare, soprattutto agli ioni sodio, potassio e calcio. Tali variazioni di permeabilità modificano la velocità con cui questi passano attraverso la membrana, essendo associate all'apertura e chiusura di canali, generalmente selettivi per i singoli ioni. La sola permeabilità di membrana non è però sufficiente a spiegare la dinamica del flusso degli ioni, che risulta governata da un gradiente elettrochimico, espressione delle forze elettriche e chimiche agenti su tali particelle. La membrana cellulare a riposo è relativamente permeabile al potassio, molto meno a sodio e calcio. In questa situazione il gradiente di concentrazione fra spazio intracellulare ($[K^+]_i=140$ mM) ed extracellulare ($[K^+]_o=5$ mM) tende ad espellere il potassio dalla cellula, mentre la forza elettrostatica tende ad attrarlo all'interno, data la polarizzazione negativa della membrana. I due processi si bilanciano fino a una situazione di equilibrio, in cui le due forze si compensano dando un contributo netto nullo al flusso di corrente, risultato descrivibile matematicamente con l'equazione di Nernst per il potassio:

$$E_K = \left(\frac{R}{Z} \frac{T}{F} \right) \cdot \log \left(\frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} \right)$$

R = 8.314472 J * K⁻¹ * mol⁻¹ costante universale dei gas

T = Temperatura in gradi Kelvin

Z = Valenza dell'elemento

F = 96485.3399 C / mol costante di Faraday

[K⁺]_i = concentrazione intracellulare di potassio

[K⁺]_o = concentrazione extracellulare di potassio

E_k è definito potenziale di Nernst, potenziale di equilibrio o potenziale di inversione per il potassio. Tale valore segna il passaggio da una corrente di potassio entrante negativa, che si avrebbe per E_m < E_k, ad una uscente positiva, per E_m > E_k.

Il potenziale di membrana sarebbe equivalente al potenziale di equilibrio del potassio solo nel caso in cui questo fosse l'unico ione diffusibile. Quindi dire che E_m=E_k=-90 mV è una approssimazione che non tiene conto della permeabilità a riposo della membrana agli altri ioni (soprattutto allo ione sodio) e si discosta leggermente dal potenziale misurato sperimentalmente nelle cellule miocardiche a risposta rapida (circa - 82 mV).

Lo ione sodio ha una concentrazione extracellulare (circa 145 mM) di gran lunga superiore a quella intracellulare (circa 10 mM), determinando un potenziale di Nernst per tale ione che può raggiungere circa +70 mV. Per questo, a riposo, il gradiente di concentrazione e la forza elettrica (essendo la cellula polarizzata negativamente) agiscono di concerto per introdurre sodio nel mioplasma, depolarizzando solo lievemente la membrana, per via della scarsa conducibilità offerta a tale ione. Il mantenimento della condizione di equilibrio, non solo per quanto riguarda il valore del potenziale ma anche quelli delle concentrazioni intra ed extra-cellulari per i vari ioni, è garantita dalla presenza di un trasportatore attivo, la pompa metabolica Na⁺/K⁺, che espelle continuamente sodio ed immette potassio contro il loro gradiente di concentrazione, in un rapporto 3:2.

Va sottolineato che la presenza sulla membrana cellulare di diversi tipi di canali con diversa permeabilità e selettività obbliga ad utilizzare un'equazione più precisa per il calcolo del potenziale di equilibrio totale. L'equazione di Goldman – Hodgkin – Katz pesa il contributo dei canali in base alla loro permeabilità e prende in considerazione sodio, potassio e cloro:

$$E_{K,Na,Cl} = \left(\frac{R T}{F} \right) \cdot \log \left(\frac{P_{Na^+}[Na^+]_{out} + P_{K^+}[K^+]_{out} + P_{Cl^-}[Cl^-]_{in}}{P_{Na^+}[Na^+]_{in} + P_{K^+}[K^+]_{in} + P_{Cl^-}[Cl^-]_{out}} \right)$$

P = Permeabilità dello ione

[C]_{in} = Concentrazione intracellulare

[C]_{out} = Concentrazione extracellulare

Le concentrazioni intracellulari alterate dai flussi ionici vengono ripristinate secondo modalità e tempi specifici dettati da appositi meccanismi cellulari, come la pompa Na⁺-K⁺ e lo scambiatore Na⁺-Ca²⁺.

Si descrivono ora le cinque fasi del potenziale d'azione:

Fase 0 – Depolarizzazione rapida

Ogni processo che riduca improvvisamente la differenza di potenziale tra il compartimento intracellulare ed il compartimento extracellulare (potenziale di membrana) portandolo ad un valore critico, definito soglia (pari a circa -50 mV), provoca la comparsa di un potenziale d'azione.

La depolarizzazione rapida (fase 0) è dovuta quasi esclusivamente all'ingresso di ioni sodio a seguito di un rapido aumento della conduttanza dei canali del sodio.

L'ingresso di ioni sodio positivi riduce la negatività del potenziale intracellulare e provoca l'attivazione di altri canali rapidi del sodio, che aumentano ulteriormente la conduttanza al sodio, con un meccanismo a feedback positivo.

La velocità di depolarizzazione durante l'upstroke è determinata dal flusso di sodio entrante nella cellula. La corrente del sodio è molto rapida e di ampiezza elevata, perciò si parla di corrente rapida entrante (fast inward current). L'ingresso

di sodio, tuttavia, si arresta dopo 1-2 ms. La ragione è che i canali del sodio, dopo una rapida apertura, si inattivano, e la conduttanza torna ai valori precedenti l'attivazione. Finché la cellula non è completamente ripolarizzata (-70 mV) i canali non riescono ad uscire da questo stato di inattivazione.

La ripolarizzazione transiente (fase 1) ed il plateau (fase 2):

La prima fase del potenziale d'azione (fase 0) è immediatamente seguita da un breve periodo di parziale ripolarizzazione, fase 1, che rispecchia in parte l'effetto iniziale dell'inattivazione dei canali rapidi del sodio, ma che è largamente causata dall'apertura di canali del potassio che consentono il passaggio di una corrente uscente transiente ripolarizzante, chiamata I_{to} (transient outward).

La caratteristica tipica del potenziale d'azione cardiaco è la fase di plateau (fase 2), che è la principale responsabile della durata del potenziale d'azione stesso. Durante questa fase, gli ioni calcio e in parte anche gli ioni sodio entrano nella cellula attraverso canali lenti. Questi canali sono così chiamati (Long-Lasting L-Type) perché i processi di attivazione, inattivazione e recupero (cioè l'uscita dallo stato di inattivazione ed il conseguente recupero della possibilità di attivarsi a fronte di uno stimolo elettrico adeguato) sono di gran lunga più lenti rispetto ai canali T-type. L'apertura di questi canali provoca un aumento della conduttanza del calcio, che inizia subito dopo la fase 0 del potenziale. Poiché la concentrazione intracellulare di ioni calcio è molto inferiore alla concentrazione extracellulare (la $[Ca^{2+}]$ intracellulare è circa pari a 100 nM, mentre la $[Ca^{2+}]$ extracellulare è pari a 1-2 mM), l'aumento di conduttanza favorisce una corrente di calcio entrante nella cellula per tutta la durata del plateau. Essendo dovuta ai canali del calcio L-type, che si aprono a potenziali più depolarizzati rispetto ai canali del sodio, tale corrente è solitamente chiamata I_{CaL} . La corrente di calcio attraverso i canali T-type fornisce, invece, un contributo limitato all'upstroke dell'AP, che è principalmente sostenuto dalla corrente di sodio.

Per quanto riguarda le correnti uscenti nella fase 2 dell'AP, queste sono sostenute principalmente da canali per il potassio: attraverso diversi tipi di canale, lo ione potassio attraversa la membrana secondo il proprio gradiente elettrochimico, essendo le sue concentrazioni pressoché identiche a quelle della fase di riposo dell'AP ed il potenziale di membrana positivo. La conduttanza complessiva per il

potassio è molto inferiore a quella della fase 4, risultando determinante per il plateau del potenziale d'azione. Infatti, se essa si mantenesse ai valori che offre a riposo, determinerebbe una corrente uscente netta molto superiore rispetto a quella entrante, cosicché si avrebbe una ripolarizzazione molto rapida. Il valore più basso della conduttanza dipende dalle caratteristiche dei canali del potassio attivi in questa fase, ovvero i canali responsabili delle correnti I_{K1} , I_{Ks} ed I_{Kr} . La prima è anche detta corrente rettificante in ingresso, mentre le altre rappresentano le due componenti della corrente rettificante ritardata (lenta e rapida rispettivamente). Il termine rettificante indica che lo stato di apertura o chiusura del canale dipende dal potenziale di membrana, e pertanto non è descrivibile come una pura resistenza ohmica, in cui la tensione non può influire sulla resistenza. Quando una corrente conduce meglio una corrente in ingresso piuttosto che una in uscita, risulta rettificante in ingresso; in particolare, nel caso di I_{K1} , questo si traduce in variazioni dei valori della conduttanza, che saranno più elevati per potenziali inferiori al potenziale di inversione per il potassio (cioè quando impone una corrente entrante), e più piccoli quando il potenziale ne è superiore. La corrente rettificante ritardata, invece, si attiva ai voltaggi che tipicamente si instaurano alla fine della fase zero, ma la loro attivazione è più lenta.

Come risultato complessivo, si ha comunque che durante la fase 2 la riduzione della conduttanza al potassio dovuta alla rettificazione in ingresso predomina sulla tendenza all'aumento della stessa dovuta alla rettificazione ritardata.

Inoltre si osserva che la conduttanza di membrana è elevata durante la prima parte del plateau, sostenendo sia correnti entranti che uscenti di elevata intensità, mentre si riduce nella fase finale, portando ad una diminuzione parallela delle correnti che favorisce una discesa “dolce” dell'AP, finché una corrente uscente aggiuntiva non completa la ripolarizzazione.

La ripolarizzazione (fase 3)

L'efflusso di ioni potassio rende negativo l'interno della membrana cellulare rispetto all'extracellulare e ripolarizza la membrana, ponendo fine al plateau. La ripolarizzazione (fase 3) dipende da due processi principali: l'incremento della conduttanza del potassio (g_K) e la riduzione della conduttanza del calcio. L'incremento di g_K comporta l'uscita di ioni potassio dalla cellula. Tale corrente

in uscita non è più controbilanciata dalle correnti entranti di sodio e calcio, che vanno diminuendo, e l'interno della membrana tende a diventare sempre più negativo. L'incremento di g_K è voltaggio-dipendente: se il potenziale di membrana diventa più negativo allora g_K aumenta e viene accelerato il flusso di potassio verso l'esterno. Pertanto, questa fase di rapida ripolarizzazione è un processo autosostenuto (feedback positivo). L'efflusso di ioni potassio porta rapidamente il potenziale di membrana ai livelli di riposo. La ripolarizzazione delle cellule cardiache è fortemente influenzata da cambiamenti nella corrente delayed-rectifier ad attivazione lenta (I_{Ks}). Vi sono altri due meccanismi che offrono una corrente favorevole alla ripolarizzazione del potenziale di membrana. Il primo è la pompa Na^+K^+ , che trasporta tre ioni sodio fuori dalla cellula ogni due ioni potassio trasportati all'interno, generando una corrente netta uscente, che contribuisce al mantenimento del potenziale di riposo. Anche se normalmente piccola, questa corrente ripolarizzante aumenta quando la cellula è sovraccarica di sodio, ad esempio nel caso di frequenza cardiaca accelerata. Il secondo meccanismo è lo scambiatore Na^+Ca^{2+} , che scambia uno ione calcio per tre ioni sodio e che sostiene una piccola corrente uscente durante la sistole ed entrante durante la diastole.

Il potenziale d'azione tipico di un miocita ventricolare è mostrato in Figura 1.6b, in cui sono anche mostrate le correnti depolarizzanti relative agli ioni sodio e calcio (in alto). In condizioni normali la corrente di sodio, I_{Na} , si attiva rapidamente producendo il picco dell'AP e poi si inattiva completamente (Marban et al., 1998). La corrente di calcio L-type, I_{CaL} , si inattiva un po' più lentamente e non completamente consentendo alla corrente di calcio di sostenere la fase di plateau dell'AP (Zeng e Rudy, 1995). L'ingresso di ioni calcio attraverso il canale di Ca^{2+} L-type innesca il rilascio di ioni calcio da parte del reticolo sarcoplasmatico (SR), un compartimento interno in cui è immagazzinato Ca^{2+} . Il reticolo sarcoplasmatico è un organello subcellulare che rilascia la maggior parte di Ca^{2+} durante ogni battito cardiaco (Bers, 2001). La parte inferiore della Figura 1.6b mostra alcune correnti di potassio e una corrente di cloro (I_{to2}), che sono coinvolte nella fase di ripolarizzazione della membrana. La corrente inward-rectifier, I_{K1} , mantiene e stabilizza il potenziale di riposo, le correnti transienti

verso l'esterno, I_{to1} e I_{to2} , relative agli ioni potassio e cloro rispettivamente (Näbauer et al., 1993; Collier et al., 1996), contribuiscono alla prima rapida diminuzione del picco dell'AP che precede la fase di plateau, mentre le componenti della corrente rettificante ritardata, I_{Kr} e I_{Ks} , e la corrente di potassio di plateau, I_{Kp} , mostrano proprietà voltaggio e tempo dipendenti che contribuiscono alla ripolarizzazione dell'AP (Yue e Marban, 1988).

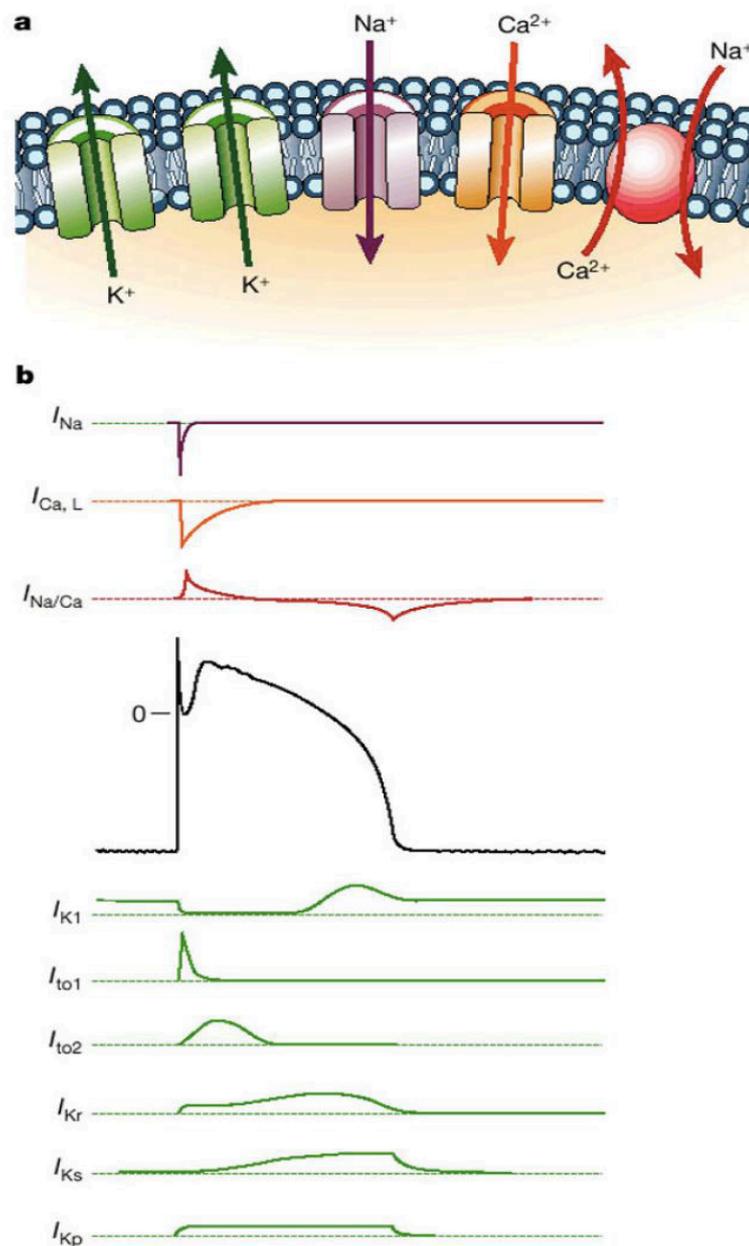


Figura 1.6: a: Principali canali ionici e scambiatori delle cellule cardiache. b: In alto sono mostrate le correnti depolarizzanti in funzione del tempo; al centro la forma tipica di un potenziale d'azione ventricolare; in basso le correnti ripolarizzanti in funzione del tempo (Marban, 2002).

1.2 Ciclo del calcio intracellulare

La concentrazione intracellulare di calcio gioca un ruolo fondamentale in una serie di processi cellulari, modulando la forma dell'AP per mezzo dell'inattivazione di alcune correnti, e garantendo la funzione contrattile del miocita attraverso l'accoppiamento eccitazione-contrazione. Vi sono diversi meccanismi che regolano la concentrazione di calcio a seguito del suo rilascio da parte delle “cisterne” del reticolo sarcoplasmatico (un compartimento articolato all'interno della cellula in cui viene immagazzinato in parte il calcio intracellulare) durante un potenziale d'azione. Questi meccanismi sono l'estrusione dalla cellula (attraverso lo scambiatore $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ ed in misura minore la pompa Ca^{2+} -ATPasi del sarcolemma) ed il riassorbimento nel reticolo (tramite la pompa Ca^{2+} -ATPasi). L'accoppiamento eccitazione-contrazione è dipendente dalla relazione tra i canali di calcio L-type ed i recettori della rianodina (RyR, particolari molecole presenti nella membrana del SR, sensibili al calcio intracellulare) all'interno dello spazio diadico, un ambiente del citoplasma in cui reticolo e sarcolemma vengono a trovarsi estremamente vicini. Durante le fasi iniziali del potenziale d'azione, i canali di calcio L-type presenti nel sarcolemma si aprono, permettendo l'ingresso di calcio nella diade. Appena la concentrazione di Ca^{2+} attorno a questi canali aumenta, questo si lega ai RyR, aumentando la loro probabilità di apertura e portando ad un rilascio di Ca^{2+} dal reticolo in un processo chiamato “rilascio di calcio calcio-indotto” (o “Calcium-induced Calcium release”, CICR) mostrato in Figura 1.7. L'ammontare di calcio espulso dal reticolo è significativamente maggiore dell'ammontare di calcio introdotto tramite i canali L-type, ed è responsabile del processo di contrazione, al termine del quale il Ca^{2+} viene rimosso dal citoplasma, in parte portato all'esterno dalla pompa $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e in parte riassorbito all'interno del reticolo sarcoplasmatico.

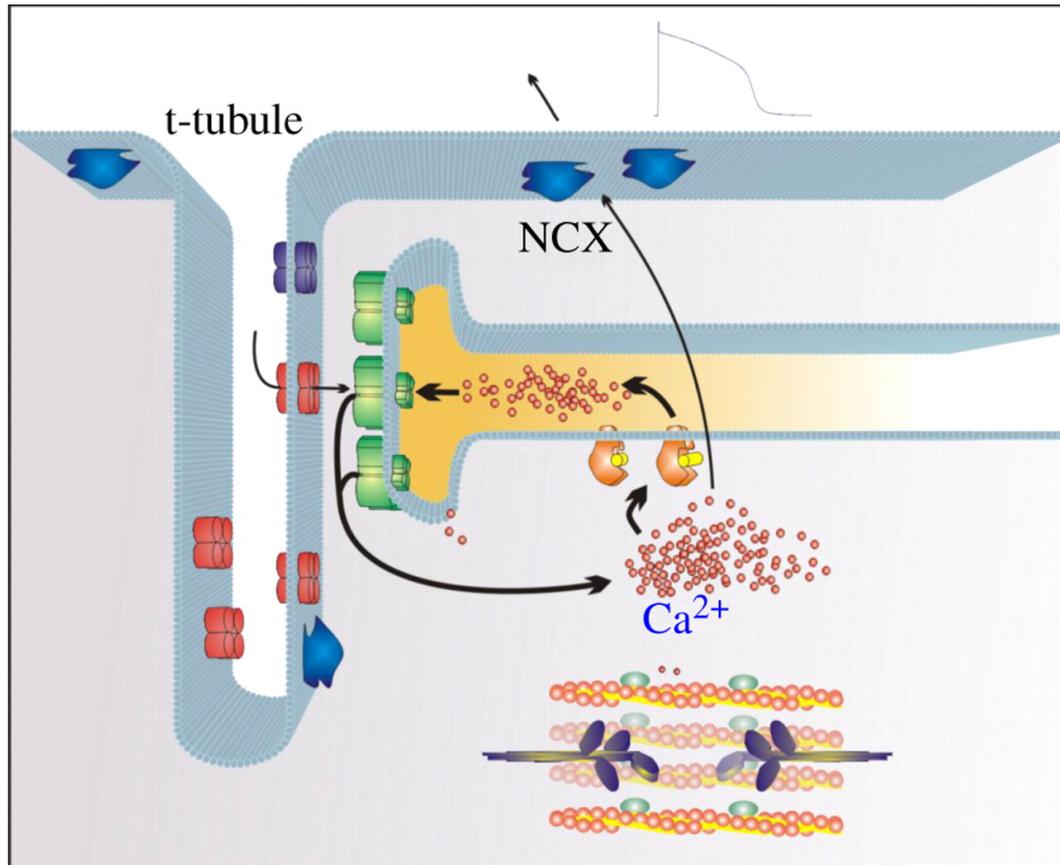


Figura 1.7: Rappresentazione della diade e il processo di rilascio di calcio Ca^{2+} -indotto (CICR).

Canali di calcio L-type (rossi) associato ai RyR (verdi).

1.3 Storia dell'elettrofisiologia cardiaca

In generale, l'elettrofisiologia è la disciplina scientifica che si occupa dello studio delle proprietà elettriche di cellule e tessuti biologici.

Le fondamenta dell'elettrofisiologia sperimentale furono poste nel decennio del 1660, quando il microscopista e biologo tedesco Jan Swammerdam sviluppò un preparato neuromuscolare impiegando una zampa di rana, dalla cui coscia furono prelevati uno dei muscoli più larghi ed il nervo connesso, facendo attenzione a non lesionarli. La stimolazione del nervo (che Swammerdam chiamò "irritazione") provocò una contrazione del muscolo. Successivamente perfezionò ulteriormente il preparato, inserendo il muscolo in un tubo di vetro ed inserendo degli aghi a ciascuna estremità del muscolo. La contrazione, attivata dalla stimolazione nervosa, poteva quindi essere monitorata attraverso i movimenti degli aghi, dalla cui inflessione era possibile risalire all'entità della contrazione. Swammerdam si avvicinò alla comprensione della natura della propagazione dei segnali tra nervi e muscoli, ma fu Isaac Newton che per primo prese in considerazione la natura elettrica dei segnali nervosi.

Un supporto sperimentale a dimostrazione della natura elettrica dell'impulso nervoso venne fornita nel 1792, quando Luigi Galvani pubblicò il "De Viribus Electricitatis in Motu Musculari Commentarius", sull'elettricità animale. Si tratta di una descrizione di 10 anni di osservazioni sulle contrazioni in preparati di nervo-muscolo isolati di rana, che Galvani portò avanti assieme a sua moglie e suo nipote (Fig 1.8).

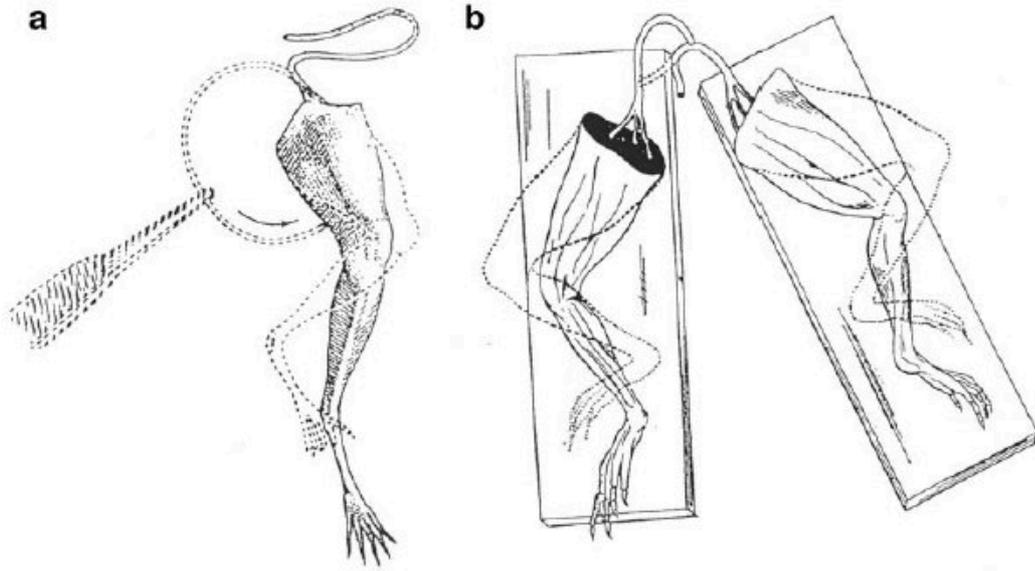


Figura 1.8: *Esperimenti di Galvani sulla contrazione senza impiego di metalli. a. L'esperimento del 1794: quando la superficie della sezione del nervo tocca il muscolo la zampa si contrae; b. l'esperimento del 1797: quando la superficie della sezione del nervo sciatico destro tocca la superficie intatta del nervo sciatico sinistro, entrambe le zampe si contraggono (Verkhatsky et al., 2006).*

Il lavoro di Galvani (fortemente criticato da Alessandro Volta) fu portato avanti alla sua morte dal nipote Giovanni Aldini, responsabile di altri rilevanti esperimenti e della diffusione presso il grande pubblico delle teorie galvaniche. Negli anni seguenti alcuni risultati fondamentali furono la dimostrazione dell'esistenza di correnti elettriche imputabili ai soli tessuti biologici (da parte di Carlo Matteucci nel 1842), la prima misurazione della velocità di propagazione del potenziale d'azione (Helmholtz, attorno al 1850) e la prima misurazione del potenziale d'azione stesso (Bernstein, fine '800). Da qui in avanti l'elettrofisiologia assume caratteristiche sempre più marcatamente moderne: nella prima metà del ventesimo secolo si sviluppano le prime ipotesi della natura lipidica della membrana cellulare e dell'esistenza dei canali ionici, fino a giungere agli esperimenti del 1949 di Andrew Huxley e Alan Hodgkin su assoni di calamaro gigante. A questi due scienziati sono riconducibili le basi dell'elettrofisiologia moderna e della tecnica di Voltage-clamp, come anche la nascita del primo vero modello matematico di cellula con attività elettrica: si può quindi far risalire a loro la nascita della disciplina della modellistica

elettrofisiologica. Le informazioni contenute in questo paragrafo sono basate sull'articolo di Verkhatsky et al. (2006).

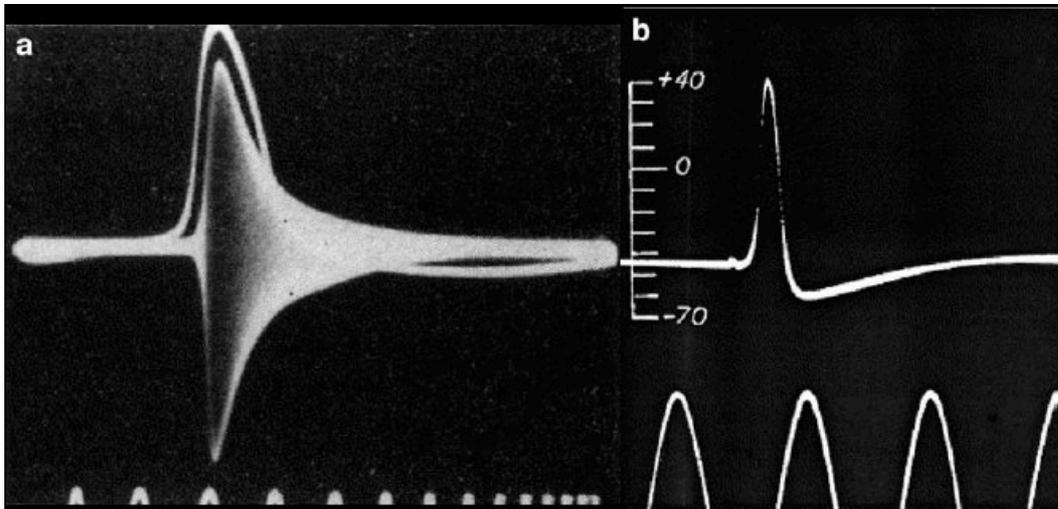


Figura 1.9: Prime registrazioni da assoni di calamaro. **a.** L'aumento di conduttanza dell'assone del calamaro durante il potenziale d'azione ricavato da Cole e Curtis. Traccia a sinistra: potenziale d'azione; banda bianco-scura: misura dell'impedenza di membrana ottenuta con il ponte di Wheatstone applicando un segnale sinusoidale ad alta frequenza (20 KHz) a due elettrodi posizionati su lati opposti di un assone gigante. **b.** La prima registrazione pubblicata del potenziale d'azione di un assone di calamaro.

1.4 Patch Clamp

La prima operazione da svolgere è quella di stabilire un collegamento elettrico fra la strumentazione e il materiale biologico: viene utilizzata per questo scopo una micro-pipetta di vetro al cui interno sono posti un elettrodo e una soluzione ionica con concentrazioni simili a quelle dei liquidi intra o extracellulare a seconda dell'esperimento da svolgere.

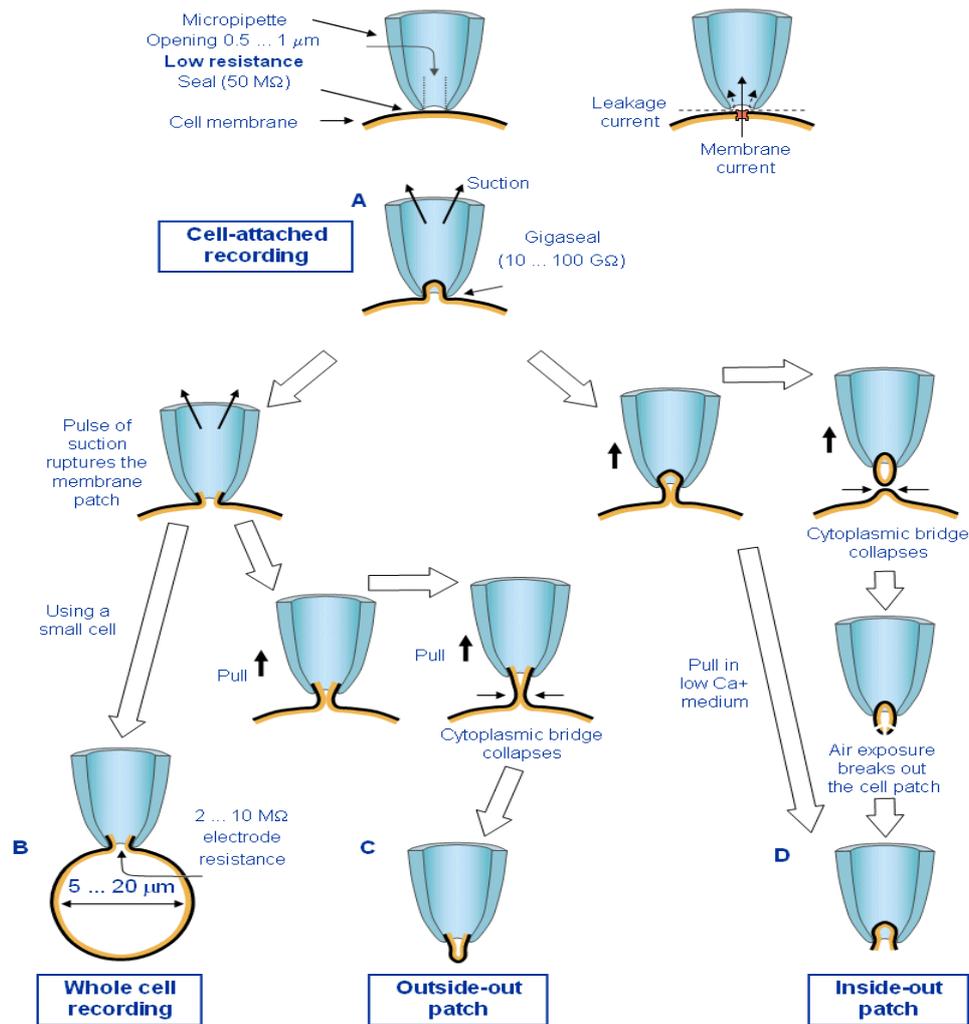


Figura 1.10: Illustrazione schematica dei quattro diversi metodi di patch clamp:

- (A) cell-attached recording,
- (B) configurazione whole cell,
- (C) configurazione outside-out,
- (D) configurazione inside-out.

(Hamill et al., 1981.)

Come si può osservare in Figura 1.10, la pipetta viene posta sulla membrana cellulare (tramite un sistema di micromanipolazione) e si applica una leggera suzione per farne aderire i bordi. Si forma in questo modo il cosiddetto *Giga-Seal*, ovvero, se l'operazione viene svolta correttamente, l'aderenza della pipetta alla membrana è sufficientemente alta da poterla schematizzare a livello elettrico con una resistenza di valore molto elevato, nell'ordine dei GigaOhm.

A seconda delle manipolazioni meccaniche operate sulla membrana a seguito della formazione di un forte sigillo, si distinguono quattro diverse configurazioni di patch-clamp: cell-attached (CA; configurazione comune in tutte le tecniche di

patch clamp, dato che ne rappresenta la fase iniziale), whole-cell (WC; permette di studiare il comportamento dell'intera cellula) inside-out patch ed outside-out patch (IOP-OOP; permettono di studiare il comportamento di una piccola parte di membrana).

1.5 Tecniche di Voltage- e Current-clamp

In seguito alla scoperta delle proprietà elettriche delle cellule, è stato necessario sviluppare strumentazione e protocolli adatti per lo studio delle correnti che attraversano le membrane biologiche tramite i canali ionici. Attualmente, le tecniche più diffuse sono quelle denominate *Voltage-Clamp* e *Current-Clamp*.

Il principio alla base di tutte le tecniche è quello di sottoporre la cellula in esame ad una specifica evoluzione temporale del potenziale di membrana o della corrente iniettata nella cellula: nel primo caso, viene fissato un valore di tensione e si misura la corrente, nel secondo caso invece viene iniettata una corrente di stimolo e si misura il corrispondente potenziale di membrana.

Voltage Clamp

Questa tecnica è stata progettata da Kenneth Cole e George Marmont negli anni 40 del XX secolo. Utilizzando questa tecnica Hodgkin e Huxley scoprirono nel 1952 il meccanismo per cui le correnti ioniche danno origine al potenziale d'azione e per questi studi condivisero il premio Nobel per la fisiologia nel 1963.

Come indica il nome, eseguire un esperimento di voltage-clamp (letteralmente, blocco di voltaggio) significa controllare elettricamente il potenziale di membrana. Anziché iniettare gradini di corrente costante (impulsi ad onda quadra) osservando la risposta del potenziale di membrana, come accade in una tipica misura del potenziale d'azione, lo sperimentatore obbliga la membrana a seguire variazioni improvvise del potenziale (sempre impulsi ad onda quadra, ma questa volta di potenziale), e misura la corrente che passa in risposta a questi stimoli, come mostrato ad esempio in Figura 1.11.

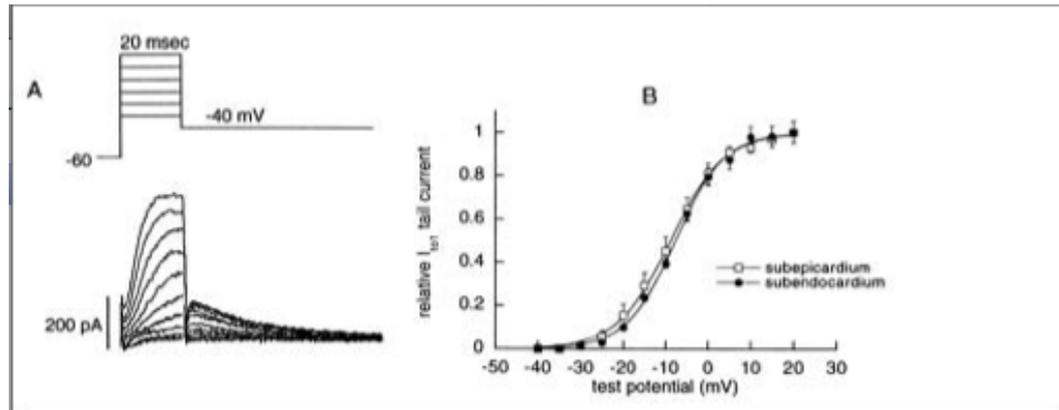


Figura 1.11: **A:** Applicazione di gradini di potenziale tramite voltage clamp e relativi tracciati di corrente registrata **B:** *Ito1* activation. (Konarzewska-Sanguinetti 1995)

Il voltage-clamp è il tipico test che viene usato per determinare quando i canali ionici si aprono e si chiudono. Registrando la corrente che deve essere erogata dalla apparecchiatura sperimentale per mantenere costante il potenziale presente ai capi della membrana, è possibile ottenere una misura diretta della corrente che la attraversa ad ogni istante. Dato che l'apertura/chiusura dei canali di Na^+ , K^+ e Ca^{2+} dipende dal potenziale di membrana, cambiando il valore dei gradini di tensione si può controllare e analizzare la cinetica dei cambiamenti di stato di questi canali.

Oggi esistono molte diverse tecniche per realizzare il voltage-clamp, sviluppate per diversi preparati. Ognuna richiede una misura affidabile della corrente di membrana ed un rapido controllo del potenziale di membrana realizzato mediante un circuito elettronico a feed-back. Il controllo automatico del potenziale di membrana viene ottenuto monitorandolo con un elettrodo. Questi due valori di potenziale vengono poi inviati ai due ingressi di un amplificatore differenziale (nello schema in Figura 1.12 l'oggetto triangolare con ingressi + e -), che ne elabora la differenza restituendo una corrente proporzionale (convertitore corrente-tensione), nulla nel caso di uguaglianza fra i due potenziali. La corrente viene infine iniettata nella cellula mediante un secondo elettrodo interno, detto "di corrente". In pratica, l'amplificatore differenziale genera un segnale d'errore mentre il circuito di voltage-clamp genera un segnale volto a minimizzare questo errore (circuito a feedback negativo). La corrente applicata alla cellula (generata dal circuito di voltage-clamp) viene misurata, e costituisce l'informazione fornita da questo tipo di esperimento.

È importante sottolineare che quella che viene misurata è la corrente netta che passa attraverso la membrana, comprensiva quindi di tutte le correnti entranti ed uscenti, per tutti i diversi tipi di canali ionici.

Per ricavare quindi informazioni relative a specifiche correnti, è necessario adottare particolari tecniche per isolarle dalle altre: un tipico approccio consiste nell'utilizzare particolari sostanze chimiche che bloccano una specifica corrente ionica, in modo che questa possa poi essere ricavata per differenza tra la corrente totale e quella misurata con il blocco.

Ad esempio, la tetrodossina (veleno del pesce palla), funge da blocco per i canali del sodio, mentre il tetraetilammonio è in grado di bloccare specifici canali per il potassio.

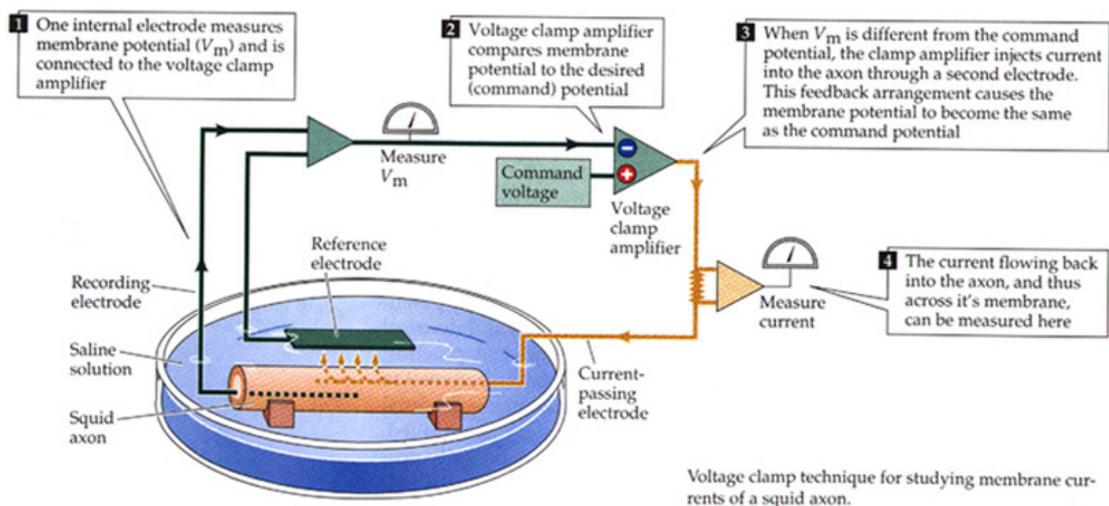


Figura 1.12: rappresentazione schematica della tecnica del voltage clamp. (detto "di voltaggio", V) e confrontando il potenziale di membrana con il potenziale desiderato (il comando di voltaggio).

Current Clamp

Questa tecnica, nota anche come inseguitore di tensione, costituisce il metodo classico per la registrazione del potenziale transmembrana. In essa, una micropipetta, contenente un elettrodo di registrazione ed inserita nella cellula in esame, è connessa ad un buffer a guadagno unitario con resistenza di ingresso diversi ordini di grandezza superiore a quella delle strutture a monte (resistenza di ingresso della cellula e della micropipetta).

Questa architettura ha funzione di disaccoppiamento, riducendo l'errore di interconnessione che impedirebbe la misura. Nel caso più generale, la corrente iniettata nella cellula viene fissata ad un valore non nullo, dato da un generatore non visualizzato nello schema di funzionamento riportato (Figura 1.13).

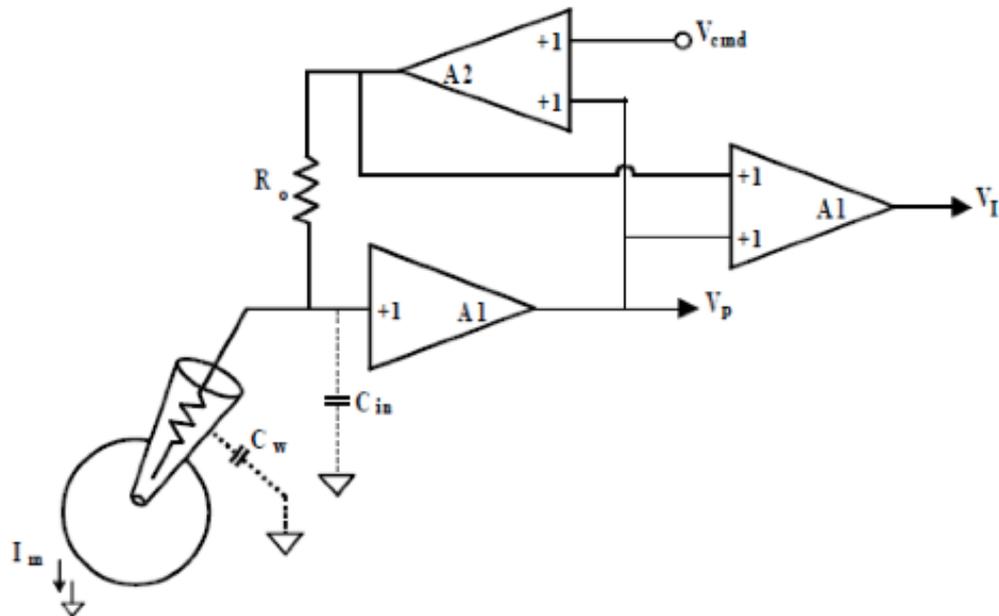


Figura 1.13: Schema circuitale per misure in current-clamp.

1.6 Modellistica del potenziale d'azione cardiaco

In generale, un modello è una rappresentazione semplificata di un oggetto o di un fenomeno, in grado di riprodurre alcune caratteristiche o comportamenti fondamentali, che serve per interpretare e investigare la realtà, anche laddove il fenomeno di interesse non sia direttamente accessibile.

Proprio per questo, la modellistica matematica e la simulazione numerica sono strumenti molto importanti per l'analisi e lo studio dei meccanismi alla base del potenziale d'azione cardiaco, che altrimenti risulterebbe molto difficile e complessa, considerati i numerosi processi dinamici coinvolti nell'eccitazione cellulare e la scarsità di dati sperimentali.

I modelli cardiaci sono stati realizzati grazie allo sviluppo di descrizioni matematiche per i singoli componenti cellulari, come canali ionici, pompe e scambiatori. Tali descrizioni matematiche sono state sviluppate sulla base di specifici esperimenti, nei quali è stato possibile isolare e quindi caratterizzare una

particolare corrente, o un particolare compartimento, integrando le informazioni disponibili per avere l'intera cellula, in grado di generare un potenziale d'azione in risposta ad uno stimolo appropriato

Un vantaggio dei modelli integrati è la possibilità di analizzare contemporaneamente, durante la simulazione, tutte le variabili di interesse come il potenziale di membrana, le concentrazioni e le correnti ioniche. Di conseguenza, è possibile osservare ogni aspetto dei processi simulati, cosa non possibile negli approcci sperimentali. Infatti, la manipolazione cellulare necessaria per poter effettuare esperimenti di elettrofisiologia cardiaca, richiede spesso la presenza di agenti farmacologici, buffer esogeni o soluzioni non fisiologiche, e quindi l'ambiente in cui si trovano le cellule è diverso da quello naturale e così anche il loro comportamento ne risulta influenzato.

E' importante però anche tener presente che la capacità di previsione di qualsiasi modello è limitata dal fatto che alcuni processi potrebbero essere stati descritti in maniera incompleta o errata, e quindi il modello potrebbe non essere in grado di riprodurre tutti i contesti clinici di interesse.

In alcuni casi, tuttavia, anche un modello sbagliato può rivelarsi utile, fornendo un supporto per gli esperimenti volti a ottenere nuovi dati da utilizzare per aggiornare il modello stesso e fare ulteriori previsioni.

Come esempio si può citare il modello di D. Noble del 1962 (Noble, 1962), primo modello cardiaco pubblicato. Esso propone una descrizione matematica dell'attività elettrica delle cellule delle fibre del Purkinje sulla base del capostipite dei modelli matematici cellulari, il modello di assone gigante di calamaro di Hodgkin-Huxley (HH). Considerando esclusivamente una corrente entrante di sodio ed una uscente di potassio (più *una corrente di leakage* attribuita ad un flusso generico di anioni), Noble replicò il plateau caratteristico del potenziale d'azione delle cellule cardiache, apportando alcune modifiche alle formulazioni delle correnti rispetto al modello di riferimento. Da questo modello emersero due possibili interpretazioni, basate proprio sulle modifiche che fu necessario apportare al modello HH di partenza: o i canali di sodio nelle cellule cardiache erano diversi in termini quantitativi rispetto a quelli nelle cellule nervose, oppure dovevano esistere altri canali veicolanti una corrente entrante. Entrambe le previsioni si rivelarono corrette.

Vediamo velocemente la struttura del modello di HH, dal momento che la struttura di base del modello è la stessa utilizzata ancora oggi.

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

La corrente ionica è suddivisa in ulteriori 3 componenti: una corrente di sodio (I_{Na}), una di potassio (I_K), ed una piccola corrente di leakage I_l (a cui contribuiscono principalmente ioni cloro).

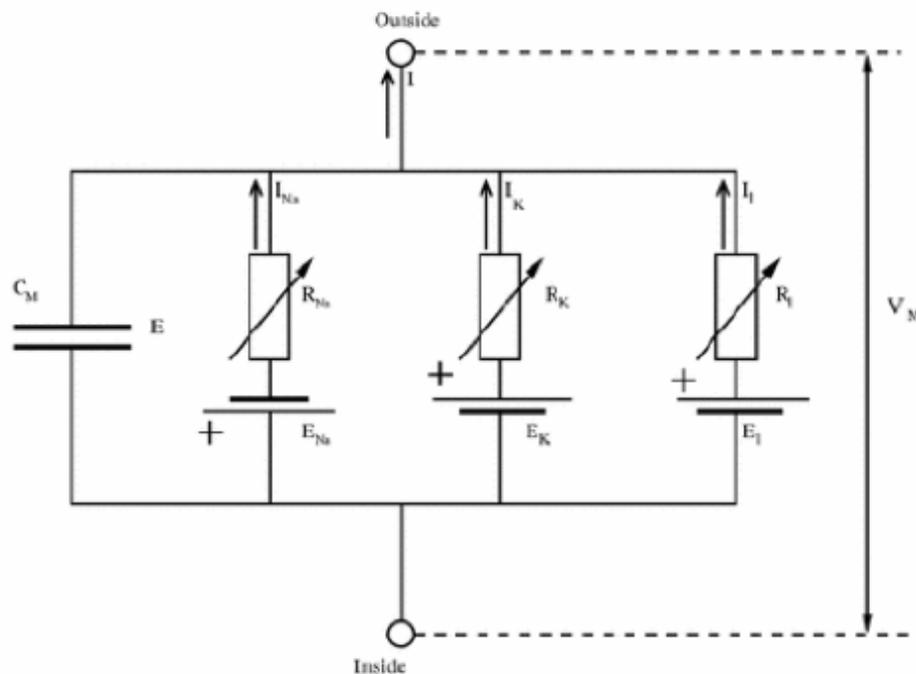


Figura 1.14: Schematizzazione del modello di HH relativo agli assoni del calamaro gigante. $R_{na} = 1/g_{na}$; $R_k = 1/g_k$; $R_l = 1/g_l$. R_{na} e R_k variano col tempo e col potenziale di membrana, gli altri componenti rimangono costanti.

Il comportamento del circuito elettrico equivalente viene descritto dalla seguente equazione differenziale:

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

Dove:

C_m = capacità di membrana,

V_m = potenziale di membrana,

I_{ion} = flusso di corrente netto attraverso la membrana,

I_{ext} = corrente di stimolo applicata alla cellula durante gli esperimenti in voltage clamp.

La corrente totale I_{ion} è espressa da:

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

e rappresenta la somma algebrica dei contributi individuali dovuti ai singoli ioni.

Ogni singola specie di ioni ha associato un valore di conduttanza G_i ed un potenziale di equilibrio e ne deriva, quindi, una corrente proporzionale alla conduttanza e alla forza elettrica.

La conduttanza relativa ad un particolare tipo di ione G_i viene descritta dalla seguente equazione

$$G_i = g_i \prod_j p_j$$

in cui compare, oltre ad un termine relativo alla conduttanza massima (g_i), il prodotto di una serie di termini legati alla permeabilità di membrana allo ione (p_i). Partendo dal presupposto che la permeabilità fosse regolata da meccanismi di passaggio degli ioni in base ai quali entità distinte (gates) regolavano in modo distinto i flussi di ioni sodio e potassio.

Per la corrente di potassio la condizione del gate proponeva due stati funzionali: uno corrispondente allo stato di apertura ed uno corrispondente allo stato di chiusura. Per la corrente del sodio la condizione di due gates definiva tre diversi stati funzionali: uno stato aperto, uno stato chiuso ed uno stato refrattario (inattivato).

Integrando in un unico modello le loro descrizioni delle correnti di sodio e potassio, Hodgkin e Huxley furono in grado di riprodurre il potenziale d'azione e di spiegare come l'interazione delle due correnti porti alla generazione dell'AP.

Questi primi modelli potevano quindi riprodurre l'AP, ma non erano in grado di riprodurre certe proprietà molto importanti delle cellule cardiache, come ad esempio il flusso entrante di Ca^{2+} ed il rilascio di calcio dal reticolo sarcoplasmatico.

Aspetti relativi agli spostamenti di Ca^{2+} intracellulare vennero introdotti nel modello di cellula di Purkinje di DiFrancesco-Noble (DiFrancesco and Noble, 1985) ed in quello di cellula ventricolare di Luo-Rudy (Luo and Rudy, 1994). In questi modelli non furono poche le innovazioni: si incluse il compartimento intracellulare relativo al reticolo sarcoplasmatico, vennero descritte le variazioni dinamiche delle concentrazioni ioniche intracellulari ed extracellulari, si introdussero gli scambiatori e le pompe ioniche. Questi modelli sono in grado di riprodurre l'AP utilizzando una descrizione dettagliata della cinetica delle correnti di membrana.

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

Grazie ad una prima raccolta di dati sulle correnti ioniche in cardiomiociti umani sono nati i primi modelli di cardiomiocita ventricolare umano: il modello di Priebe-Beuckelmann (1998) e le semplificazioni seguite (Bernus et al., 2002), i due modelli Ten Tusscher et al. (Ten Tusscher et al., 2004 e Ten Tusscher et al., 2006) ed il modello Iyer et al. (2004).

Negli ultimi anni la maggior disponibilità di dati sperimentali sull'uomo ha portato alla nascita di un maggior numero di modelli di cellula ventricolare umana. In particolare, i tre modelli più recenti, sono il Grandi-Bers del 2010, il Carro-Pueyo e il modello O'Hara Rudy del 2011.

In Figura 1.15 è riportata la schematizzazione del modello di miocita ventricolare umano in O'Hara Rudy. La cellula è divisa in più compartimenti, in particolare il compartimento intracellulare (MYO), il sub-sarcolemma che rappresenta l'area

più vicina alla membrana, dove sono concentrati soprattutto i canali del Ca^{2+} (SS) e il reticolo sarcoplasmatico (SR) a sua volta diviso in due zone (JSR e NSR). Sulla membrana sono presenti i canali di tutte le correnti principali, che insieme ai flussi tra i vari compartimenti regolano le concentrazioni ioniche.

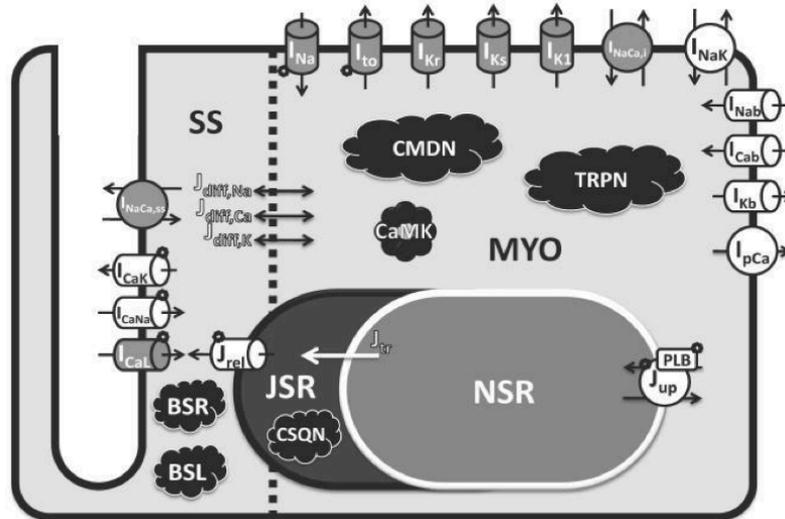


Figura 1.15: Schematizzazione del modello di miocita ventricolare umano per ORD.

Capitolo 2

Dati sperimentali umani

Questo capitolo funge da introduzione per i capitoli successivi, nei quali verrà descritto più in dettaglio il lavoro da me svolto; lo scopo di questo capitolo è quello di descrivere i tipi di dati sperimentali umani che sono disponibili in letteratura e che possono essere utilizzati nello sviluppo e nella validazione dei modelli ventricolari umani, in particolare per quanto riguarda le correnti che costituiscono il potenziale d'azione cardiaco.

2.1 Dati sperimentali

Come prima cosa, dall'analisi degli articoli relativi ai modelli ventricolari umani più recenti, sono stati recuperati, corrente per corrente, i dati sperimentali ventricolari su cui tali modelli sono stati costruiti e validati.

Dalla lunga lista di articoli di nostro interesse sono stati selezionati e considerati solo quelli relativi a dati sperimentali umani; infatti, in molti articoli i dati erano di provenienza animale (guinea pig, cane, coniglio), e sono stati scartati. Purtroppo, ancora oggi la scarsità di dati sperimentali umani rimane una grossa limitazione per lo sviluppo di modelli cardiaci, e spesso si utilizzano dati animali adattati all'uomo.

I dati sperimentali raccolti appartengono principalmente a queste tipologie:

Single cell voltage current clamp

Sono i tipi di dati sperimentali umani più comuni. Si tratta di cellule cardiache che vengono estratte da pazienti "sani" (NF=Non Failing Heart) durante un intervento a cuore aperto. Tali cellule vengono trattate in laboratorio ed è quindi possibile misurare le principali correnti ioniche, utilizzando bloccanti specifici. Spesso tali dati vengono utilizzati come confronto per analizzare le differenze con cellule raccolte invece da cuori patologici (F=Failing Heart).

È importante sottolineare che non è possibile fare misure dirette di corrente: le tecniche di voltage clamp attuali permettono infatti di misurare soltanto la corrente cellulare totale. L'unico modo per avere informazioni utili su una singola corrente, quindi, è quello di utilizzare un farmaco in grado di bloccare tale corrente e fare due registrazioni,

una con e una senza farmaco. A questo punto, facendo la differenza tra la corrente totale iniziale e la corrente totale in presenza di farmaco, si può ricavare il valore della singola corrente di interesse.

Purtroppo, l'uso di bloccanti farmacologici può avere degli effetti sulle correnti misurate, che proprio per questo possono risultare non precise. I dati sperimentali più comuni riguardanti le correnti, ottenuti in questa configurazione, sono curve I-V, misure di attivazione/inattivazione e costanti di tempo, come descritto più nel dettaglio in seguito. In Figura 2.1 un esempio di curva I-V ottenuta da questo tipo di dati.

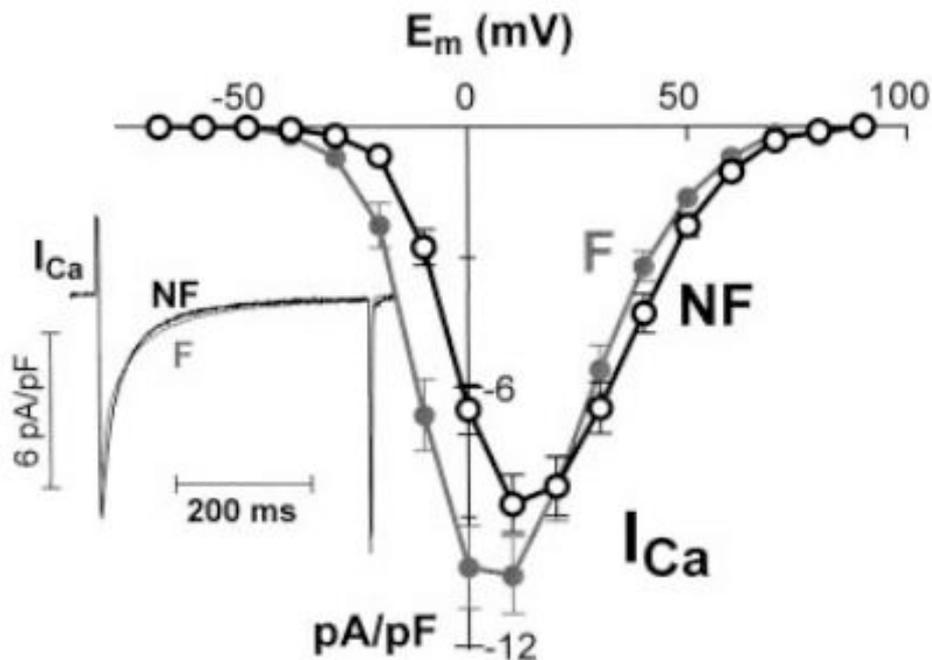


Figura 2.1: Curva I_{CaL} -V ottenuta da NF (n=25) e F (n=21) miociti. (Piacentino V III et al. 2003)

Parti di tessuto

Questo tipo di dati sperimentali sono quelli ad esempio largamente utilizzati nel modello ventricolare O'Hara-Rudy. Per evitare di danneggiare le cellule durante il processo di isolamento, si considera un intero pezzettino di tessuto per fare le registrazioni. I dati raccolti, comunque, sono dello stesso tipo di quelli ottenuti per singola cellula.

Espressione eterologa:

Il sistema di espressione eterologa in ovociti di *Xenopus*, introdotto nel 1971 da Gurdon, è utilizzato per studiare il controllo dell'espressione genica (Gurdon et al., 1971). È comunque nel 1982 che Miledi e coll. hanno dimostrato che vari tipi di recettori e canali ionici possono essere espressi negli ovociti iniettando al loro interno mRNA opportunamente isolato a partire da appropriati tessuti. Una rappresentazione del processo è schematizzata in Figura 2.2.

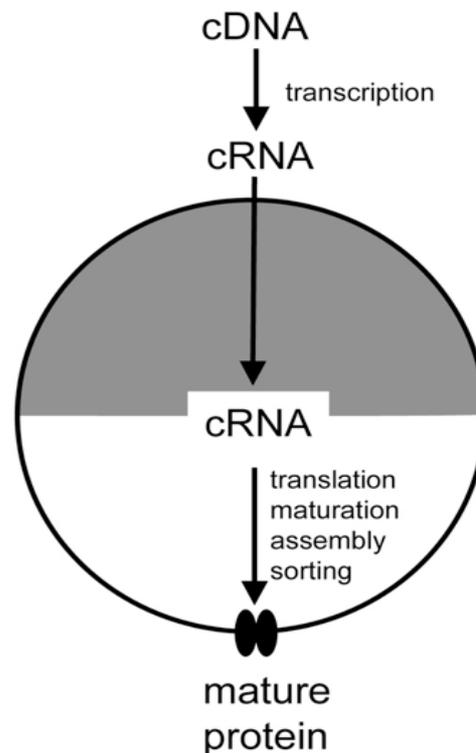


Figura 2.2: Schematizzazione del processo di iniezione di RNA e formazione della proteina in ovociti di *Xenopus* (Bianchi, Driscoll 2006)

Di nostro interesse sono i dati ottenuti esprimendo uno ed un solo canale ionico cardiaco umano in una cellula diversa da quella cardiaca. Si utilizza questa configurazione per misurare le proprietà dinamiche di un canale specifico o la corrente di canale in diverse condizioni, come ad esempio in presenza di un farmaco bloccante o di una malattia genetica che modifichi la struttura di un canale ionico. Un esempio di registrazione elettrofisiologica in Figura 2.3.

È importante sottolineare che le informazioni ottenute da questo tipo di registrazioni

non sono di carattere quantitativo (ho un solo un tipo canale in una cellula non cardiaca), bensì qualitative: più adatte quindi al confronto che non da utilizzare come misure a se stanti.

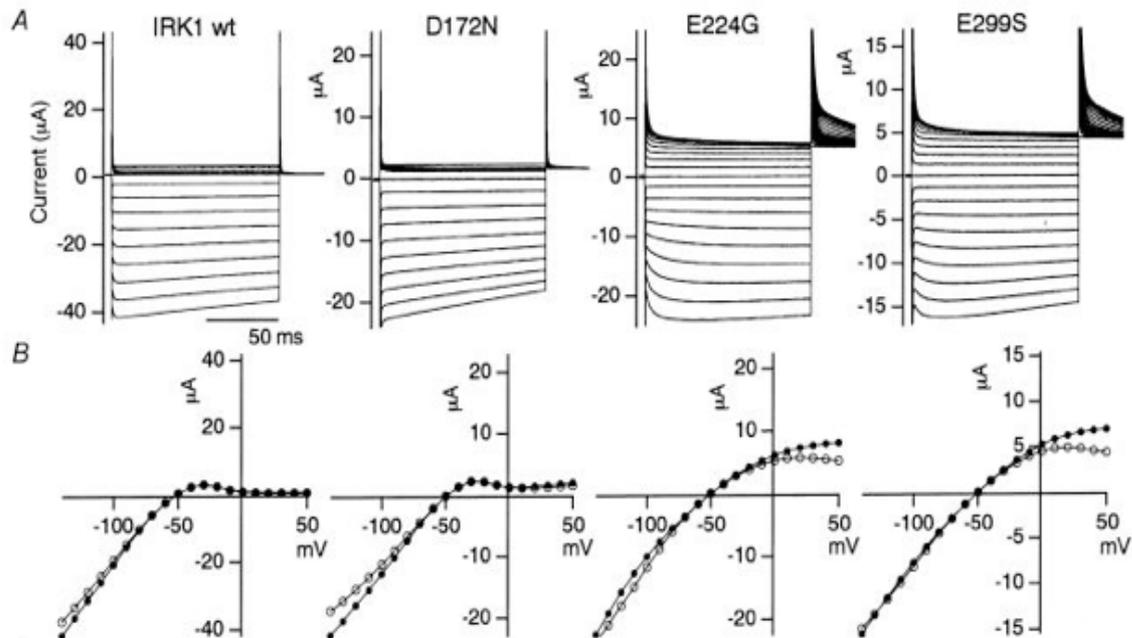


Figura 2.3: Curva I_{K1} -V ottenuta mediante voltage clamp esprimendo la corrente di canale in un ovocita di *Xenopus*. (Kubo, Murata 2001)

Dati in vivo

Sono i dati sperimentali più rari da ottenere su uomo, e spesso richiedono procedure molto invasive per il paziente.

La registrazione più semplice, è senza dubbio l'elettrocardiogramma, che non è invasiva ma allo stesso tempo non fornisce informazioni dirette sul potenziale d'azione. Si possono ricavare per analogia informazioni importanti, ad esempio sapendo che la misura dell'intervallo QT è correlata alla durata del potenziale d'azione, ma rimane comunque difficile utilizzare questi dati per costruire modelli matematici. Più facilmente, vengono utilizzati per la loro validazione. Altre tecniche permettono invece di misurare il potenziale d'azione direttamente sulla superficie dell'epicardio, ma richiedono appunto processi molto invasivi per il paziente e quindi i dati riportati in letteratura sono rarissimi, ed è difficile stimare l'errore perché non c'è materiale di confronto.

2.2 Dati sperimentali sulle correnti ioniche ventricolari

In questo paragrafo si analizzeranno i tipi di dato tipici per le correnti ioniche, utilizzando come esempio la corrente I_{to} .

2.2.1 I_{to} (transient outward current)

La corrente cardiaca transitoria in uscita del potassio (denominata I_{to1} o I_{to}) è una delle correnti ioniche di membrana delle cellule miocardiche (Niwa, Nerbonne 2010). E' la corrente che caratterizza la ripolarizzazione durante la fase 1 del potenziale d'azione cardiaco. Nasce dal movimento degli ioni di potassio carichi positivamente, che fuoriescono dallo spazio intracellulare verso quello extracellulare. Tale corrente viene rapidamente attivata e disattivata. Si attiva dopo il rapido aumento del potenziale di membrana successivo alla fase 0 del potenziale d'azione cardiaco. Una volta attivato, si crea un flusso di ioni potassio dall'interno delle cellule verso lo spazio extracellulare. Questo flusso uscente di ioni positivi costituisce la I_{to1} e provoca una diminuzione della tensione di transmembrana. Questa diminuzione del potenziale di transmembrana è nota come ripolarizzazione. I_{to1} è poi rapidamente disattivata, fermando la ripolarizzazione e portando al termine la fase 1 del potenziale d'azione (Wettwer, Ravens 1993).

I_{to1} è $[Ca^{2+}]$ -indipendente ed è stato chiaramente dimostrato nei miociti cardiaci provenienti da diverse regioni e quindi di diversa specie (Oudit, Backx 2001). Ci sono due varianti cinetiche della I_{to1} cardiaca: I_{to} rapida, chiamata $I_{to1,fast}$, e I_{to} lenta, chiamata $I_{to1,slow}$. Il canale responsabile della $I_{to1,fast}$ è formato da subunità $Kv4.2$ (KCND2), subunità $Kv4.3$ (KCND3), o da una combinazione delle due, mentre il canale responsabile della $I_{to1,slow}$ è composto da subunità $Kv1.4$ (KCNA4) (Wettwer, Ravens 1993).

I_{to1} modifica l'apertura dei canali del Calcio durante la fase 2 del potenziale d'azione. Di conseguenza, le variazioni I_{to1} modulano cambiamenti nella durata del potenziale d'azione (Wettwer, Ravens 1993).

I dati più significativi riguardanti le correnti sono:

- curva I-V (relazione tra potenziale applicato e corrispondente picco di corrente).
La curva I-V si ottiene applicando un protocollo di Voltage-clamp a gradino: il

voltaggio iniziale è quello di riposo (tipicamente -80 mV); a partire da questa configurazione vengono applicati dei gradini di potenziale, che aumentano di valore diventando man mano positivi (in alcuni casi si effettua anche un passaggio intermedio a -40 mV, per inattivare i canali del sodio). Per ognuno di questi gradini di potenziale viene misurata la relativa corrente di interesse, e in particolare se ne considera il valore di picco; dopodiché tale corrente viene graficata in funzione del potenziale per cui è stata ottenuta. In Figura 2.4 (Amos, Himmel 1996) è mostrato un esempio di curva I-V rappresentante la I_{to} ventricolare: nella parte superiore è schematizzato il protocollo di voltage clamp utilizzato; a partire dal valore di riposo di -80 mV, la cellula viene tenuta per 25 ms a -40 mV e infine portata a valori di tensione tra -40 mV e $+60$ mV, per 300 ms. Per ognuno di questi gradini viene misurato il valore di corrente di picco (pallino bianco) e di coda (pallino nero), entrambi riportati nel grafico finale, in funzione del potenziale.

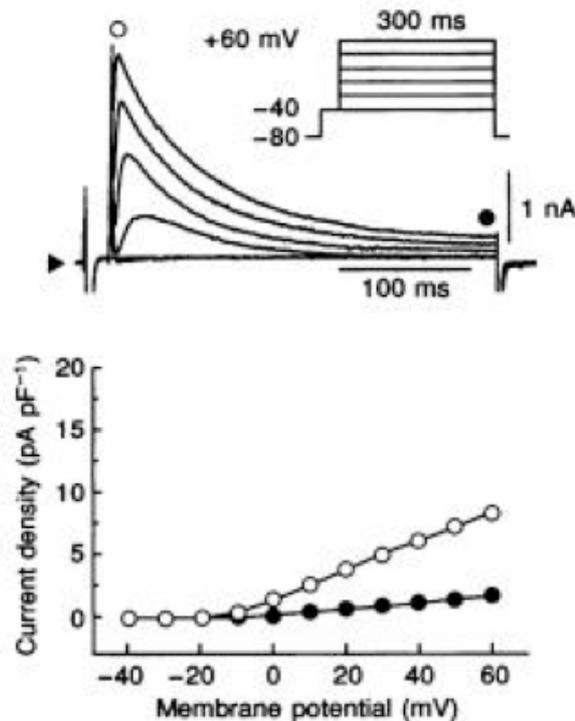


Figura 2.4: Nella parte superiore è mostrato il protocollo di voltage clamp, mentre in quella inferiore la relazione I-V sia per la corrente di picco che per la corrente di coda. (Amos, Himmel 1996).

- **Steady-state activation** (attivazione dei canali ionici): rappresenta la frazione di canali che sono attivi per ogni valore di potenziale. Per realizzarla, si utilizza un protocollo simile a quello menzionato per la curva I-V: la posizione iniziale è sempre quella di riposo (-80 mV). Da qui si applicano gradini di potenziale a salire verso i valori positivi. Nella posizione di resting potential tutti i canali sono inattivi (chiusi); applicando i gradini ad un potenziale superiore, si aprirà una certa frazione di canali, che aumenterà al crescere del valore di tensione del gradino (ad esempio al gradino -30 mV avrò meno canali aperti che a gradini positivi). A questo punto la corrente misurata in funzione di ogni gradino verrà normalizzata rispetto al valore massimo di corrente (che si avrà al massimo valore positivo di potenziale, dove tutti i canali sono attivi) ottenendo quindi una curva sigmoide che va dal valore minimo 0 al massimo di 1. Un esempio in Figura 2.5, dove nel pannello B è riportato lo schema del protocollo di voltage Clamp e nel pannello C la curva di attivazione della corrente I_{to} (crescente da 0 verso 1).
- **Steady-state inactivation** (inattivazione dei canali ionici): rappresenta la frazione di canali che sono inattivati per ogni valore di potenziale. Di nuovo, il protocollo sperimentale prevede una serie di gradini di potenziale da applicare alla cellula ed è simile a quelli descritti precedentemente. A partire dalla condizione di riposo (-80 mV), si applicano diversi gradini di potenziale, dando ai canali ionici il tempo di aprirsi e successivamente inattivarsi. Dopo di che, il potenziale viene portato ad un valore molto positivo (+60 mV) dove tutti i canali tenderanno ad aprirsi, ad eccezione di quelli che sono inattivati: la corrente misurata sarà data solo dai canali che non si erano inattivati a quel potenziale. Quindi, aumentando il potenziale del gradino intermedio, diminuisce il numero di canali disponibili. Normalizzando i valori di corrente rispetto alla corrente massima si ottiene, anche in questo caso, una sigmoide compresa tra 0 e 1, che però andrà a 1 per i potenziali negativi e a zero per quelli più positivi. Un esempio in Figura 2.5: il protocollo di clamp è rappresentato nel pannello A, mentre nel pannello C, la curva di sinistra (che cala da 1 verso 0), rappresenta la Steady-State inactivation per la I_{to} .

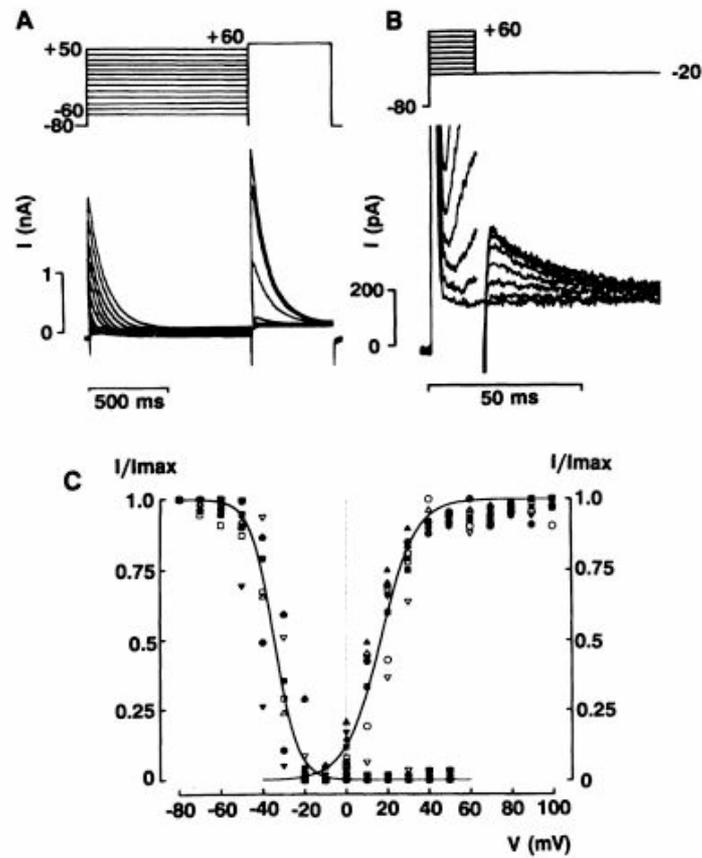


Figura 2.5: Nella parte superiore sono mostrati i due protocolli per misurare rispettivamente Steady-State inactivation e Steady-State activation, mentre nella parte inferiore ne è mostrata la misurazione normalizzata. (Nabauer, Erdmann 1993).

- Costanti di tempo: si utilizzano protocolli sperimentali simili a quelli già descritti sopra, misurando però anche il tempo necessario ai canali per attivarsi/inattivarsi o (molto spesso) recuperare dall'inattivazione. Per ogni valore di potenziale si misura il picco di corrente rispetto a quello massimo nel tempo, e i dati vengono poi interpolati con una curva esponenziale per ottenere la tau corrispondente, funzione appunto del potenziale. In Figura 2.6 sono mostrate due misurazioni di costanti di tempo relative alla corrente I_{to} , in particolare sono suddivise in componente rapida (tau fast) e componente lenta (tau slow).

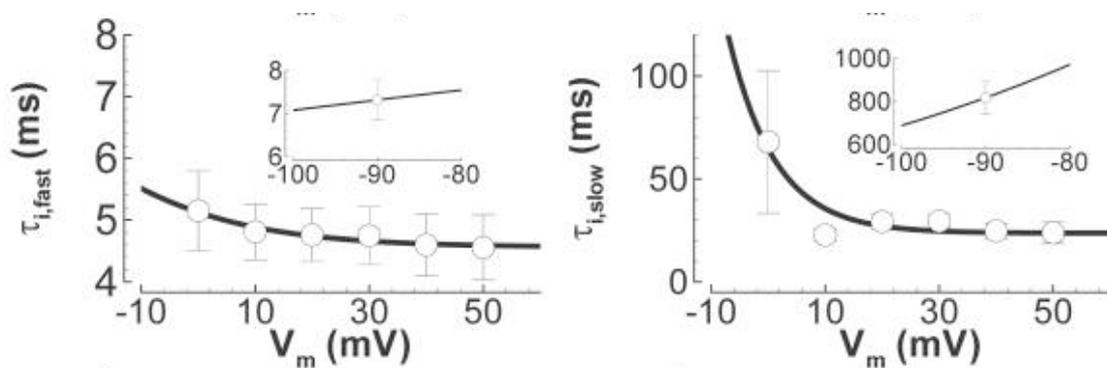


Fig 2.6: Le due costanti di tempo relative alla corrente I_{to} suddivise nella componente rapida (sinistra) e lenta (destra). (O'Hara Rudy 2011).

2.2.2 I_{Na}

I canali del sodio voltaggio dipendenti svolgono un ruolo importante nel potenziale d'azione. Se abbastanza canali sono aperti quando vi è un cambiamento nel potenziale di membrana della cellula, un piccolo ma significativo numero di ioni sodio si sposterà nella cellula secondo gradiente elettrochimico, depolarizzando ulteriormente la cellula. Così, più canali sodio si localizzano in una regione della membrana di una cellula più velocemente il potenziale d'azione si propaga, e più eccitabile sarà quell'area della cellula. Questo è un esempio di circuito in retroazione positiva. La capacità di questi canali di assumere uno stato chiuso inattivo determina il periodo refrattario ed è fondamentale per la propagazione dei potenziali d'azione lungo un assone.

La pendenza della fase iniziale (fase 0) rappresenta il tasso massimo di variazione del potenziale d'azione in cellule muscolari cardiache; questa pendenza è direttamente proporzionale alla corrente ionica netta (Carmeliet, Vereecke 2002). Questa fase è dovuta all'apertura dei canali rapidi del sodio, provocando un rapido aumento della conduttanza di membrana al sodio (G_{Na}) e quindi un rapido afflusso di ioni sodio (I_{Na}) nella cellula. La capacità della cellula di aprire i canali rapidi del sodio durante la fase 0 è correlata al potenziale di membrana al momento dell'eccitazione. Se il potenziale di membrana è al valore di base (circa -85 mV), tutti i canali rapidi del sodio sono chiusi, e l'eccitazione li aprirà, provocando un grande afflusso di ioni sodio. Se, tuttavia, il potenziale di membrana è meno negativo, alcuni dei canali rapidi del sodio saranno in uno stato inattivo insensibile all'apertura, causando così una minore risposta all'eccitazione della membrana cellulare ed una tensione massima inferiore.

La fase 1 del potenziale d'azione dei miociti si verifica con l'inattivazione dei canali rapidi del sodio.

In Figura 2.7 sono rappresentate le curve di Steady-State activation ed inactivation, a due diverse temperature, dei canali governanti la corrente I_{Na} ; a fianco delle sigmoidi sono rappresentati i protocolli di clamp adottati.

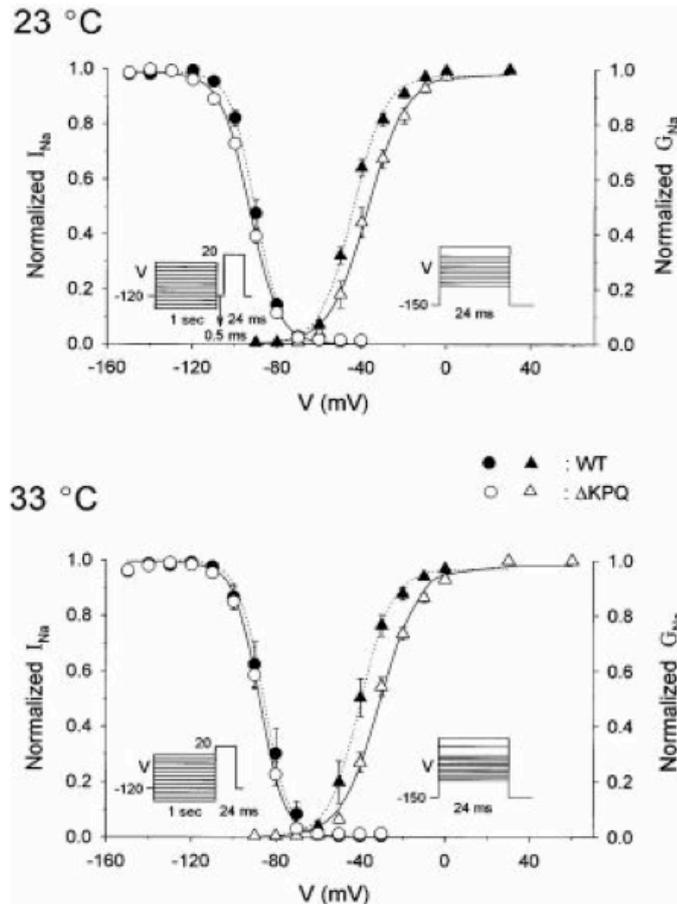


Figura 2.7: Misurazioni di Steady-State activation e Steady-State inactivation a diverse temperature (23°C e 33°C). (Nagatomo, Makielski 1998).

2.2.3 I_{CaL}

Nei cardiomiociti, il canale del calcio di tipo L è il canale dominante per il controllo degli ioni calcio. I_{CaL} stabilisce diverse funzioni fisiologiche all'interno del cuore. Quindi questa corrente è determinante per la durata del potenziale d'azione e per la refrattarietà in tutte le cellule cardiache. Inoltre, gli ioni calcio che entrano attraverso i canali del calcio cardiaci sono essenziali per l'accoppiamento eccitazione-contrazione e quindi avviare la contrazione innescando il rilascio del calcio dal reticolo sarcoplasmatico. Questa vasta gamma di funzioni rendono i canali del calcio un obiettivo importante a livello clinico per lo studio di bloccanti.

La fase 2, o fase di plateau, del potenziale d'azione cardiaco, è sostenuta da un equilibrio tra movimento verso l'interno del calcio ($I_{Ca,L}$) attraverso i canali del calcio di tipo L, e movimento verso l'esterno di potassio attraverso I_{Ks} .

In Figura 2.8 un esempio di curva I-V per i canali del Calcio.

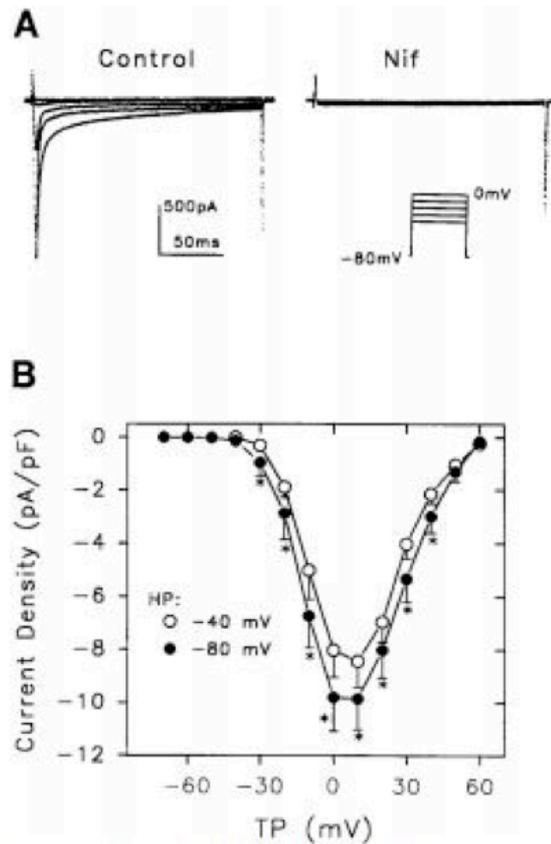


Figura 2.8: Relazione I-V relativa alla I_{CaL} (Li, Nattel 1999)

2.2.4 I_K (I_{Ks} I_{Kr})

I_K è una delle più importanti correnti ioniche transmembrana per il controllo della ripolarizzazione ventricolare nei muscoli dei mammiferi (Whalley, Grant 1995; Barry, Nerbone 1996).

Questa corrente è stata descritta per la prima volta da Noble e Tsien, e da allora è stata identificata in varie specie e tipi di tessuto cardiaco (Noble, Tsien 1969).

Nella maggior parte delle specie I_K è costituita da due componenti, una rapida $I_{K,rapid}$ e una lenta $I_{K,slow}$. Queste due componenti differiscono tra loro in base alla sensibilità ai farmaci, alla rettificazione e alle proprietà cinetiche (Sanguinetti, Jurkiewicz 1990; Carmeliet 1992).

Le caratteristiche di queste correnti sono state ampiamente studiate utilizzando la tecnica del patch-clamp nei miociti ventricolari ottenuti da diverse specie di mammiferi; in base alla specie sotto esame, questi studi hanno rivelato importanti differenze sull'esistenza e sulle proprietà di I_K (Apkon, Nerbonne 1991).

hERG (human Ether-à-go-go-Related Gene) è un gene (KCNH2) che codifica per una proteina, nota come $Kv11.1$, la subunità alfa di un canale ionico di potassio. Questo canale ionico (semplicemente indicato come hERG) è conosciuto per il suo contributo all'attività elettrica del cuore: conducendo ioni potassio dalle cellule muscolari del cuore (miociti cardiaci), questa corrente I_{Kr} ha un ruolo temporale critico per il corretto ritorno allo stato di riposo (ripolarizzazione) della membrana cellulare durante il potenziale d'azione cardiaco (Sanguinetti, Tristani-Firouzi 2006). Quando la capacità di questo canale nel condurre corrente elettrica attraverso la membrana cellulare viene inibita o compromessa, mediante applicazione di farmaci o per mutazioni rare in alcune famiglie, può causare un disturbo potenzialmente fatale chiamato sindrome del QT lungo (Hedley, Wangari 2009).

$Kv7.1$ ($KvLQT1$) è una proteina che funge da canale del potassio, la cui subunità principale nell'uomo è codificata dal gene $KCNQ1$ (Jespersen, Olesen 2005). $Kv7.1$ è un canale del potassio voltaggio-dipendente presente nella membrana cellulare del tessuto cardiaco. Nelle cellule cardiache, $Kv7.1$ media la corrente I_{Ks} (componente lenta della I_K), corrente che contribuisce alla ripolarizzazione della cellula, che chiude il potenziale d'azione cardiaco e quindi la contrazione del cuore.

In Figura 2.9 la curva I-V della I_{Kr} e il protocollo di voltage clamp.

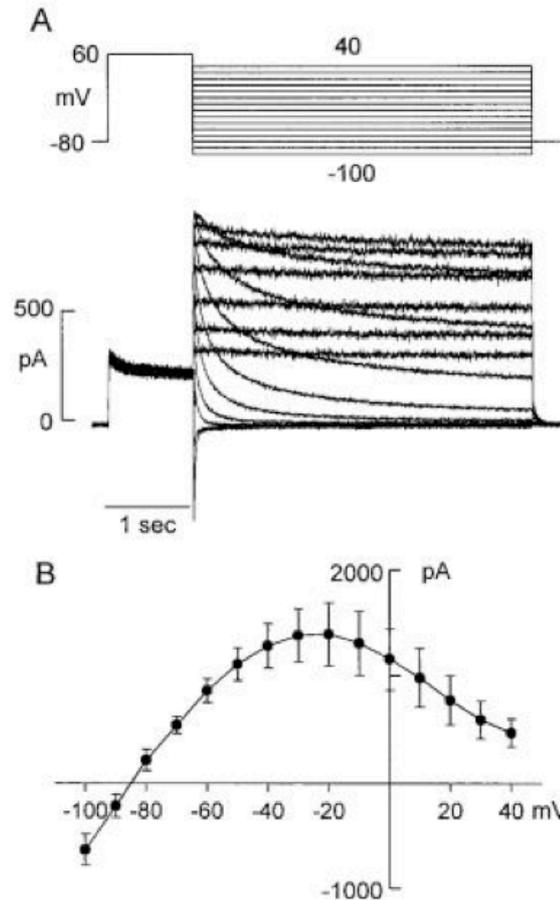


Figura 2.9: Protocollo di voltage clamp e misura della corrispettiva curva I-V relativa alla I_{Kr} . (Zhou, January 1998).

2.2.5 I_{K1} (inward rectifier current)

I_{K1} è definita come corrente rettificante di entrata.

I canali raddrizzatori di potassio, che si trovano in molti tipi di cellule, tra cui i miociti cardiaci, sono formati da subunità Kir2.1. Perciò queste subunità Kir2.1 sono essenziali per la generazione della corrente cardiaca rettificante di entrata. Questi canali differiscono dai canali del potassio che sono tipicamente responsabili della ripolarizzazione di una cellula a seguito di un potenziale d'azione. I canali del potassio più "tipici" portano verso l'esterno (e non verso l'interno) correnti di potassio a potenziali di membrana depolarizzata (Hille 2001).

IK1 è una corrente ripolarizzante molto significativa durante la fase terminale del potenziale d'azione (AP) e la sua conduttanza primaria funge da controllo per il potenziale di membrana a riposo (RMP) nei miociti ventricolari (Sanguinetti MC. Tristani-Firouzi M. 2000).

A potenziali di membrana negativi il potenziale di inversione del potassio, interiormente rettifica i canali K^+ per supportare il flusso di ioni positivi K^+ nella cellula, spingendo il ritorno del potenziale di membrana al potenziale di riposo.

Vicino al valore del potenziale di membrana a riposo, la conduttanza ventricolare della IK1 è molto più grande di quella di qualsiasi altra corrente. Pertanto, è probabile che la modulazione fisiologica di questa corrente avrà un effetto significativo sulla eccitabilità. In Figura 2.10 il pannello B grafica la curva I-V di IK1 mentre il pannello C grafica la costante di tempo relativa all'inattivazione dei canali.

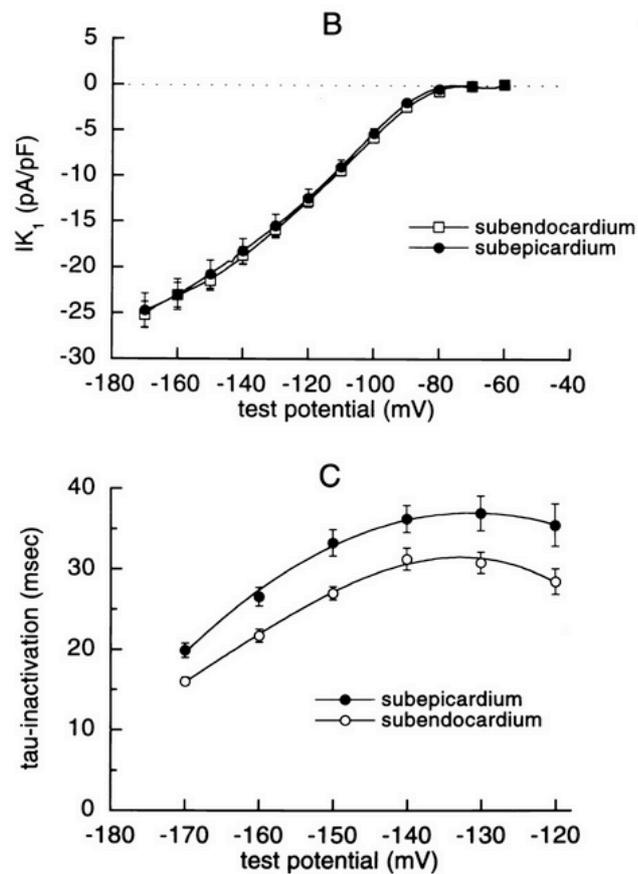


Figura 2.10: Pannello B: curva I-V relativa alla IK1. Pannello C: costante di tempo per l'inattivazione dei canali. (Konarzewska, Sanguinetti 1995).

2.2.6 INaCa (Incx)

Lo scambiatore sodio-calcio (spesso indicato come scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ o NCX) è una proteina di membrana che rimuove il calcio dalle cellule. Lo scambiatore rimuove un singolo ione calcio importando, in cambio, tre ioni sodio (Yu, Choi 1997).

La capacità dello scambiatore NCX è utilizzata nell'inversione della direzione del flusso di ioni, e ciò si manifesta durante il potenziale d'azione cardiaco.

Durante il potenziale di riposo, lo scambiatore sfrutta il gradiente del sodio per pompare calcio fuori dalla cellula. Infatti lo scambiatore pompa ioni calcio al di fuori dalla cellula per la maggior parte del tempo. Tuttavia, durante la salita del potenziale d'azione cardiaco, c'è un grande afflusso di ioni sodio. Ciò depolarizza la cellula e sposta il potenziale di membrana nella direzione positiva. Ne risulta un grande aumento intracellulare della concentrazione di sodio. Questo provoca l'inversione dello scambiatore, che inizierà a pompare ioni sodio fuori dalla cellula e ioni calcio all'interno di quest'ultima (Bers, Donald 2002).

Le misure dello scambiatore sono molto rare in letteratura.

2.2.7 INaK

La Na^+/K^+ -ATPase enzima, o pompa sodio potassio, pompa sodio verso l'esterno delle cellule, mentre il pompaggio di potassio è verso l'interno delle cellule. Entrambe le molecole si muovono contro il loro gradiente di concentrazione.

Questa pompa aiuta a mantenere il potenziale a riposo. Per mantenere il potenziale, le cellule mantengono una bassa concentrazione di ioni sodio e alti livelli di ioni potassio al loro interno. La pompa sodio-potassio muove, verso l'esterno della cellula, tre ioni sodio e, verso l'interno, 2 ioni potassio, il tutto al costo di una molecola di ATP; quindi, in totale, si ha la rimozione di una carica positiva dallo spazio intracellulare.

La pompa sodio potassio genera direttamente una differenza di potenziale attraverso la membrana cellulare. In condizioni fisiologiche questa differenza di potenziale (E_p) iperpolarizza la membrana cellulare e, di conseguenza, aumenta il valore assoluto del

potenziale di riposo. Secondo la legge di Ohm, la grandezza di E_p dipende sia dall'ampiezza della corrente sia dalla resistenza di membrana. Rispetto ai valori che assumono al potenziale di riposo, entrambi i fattori sono aumentati lungo il plateau del potenziale d'azione cardiaco. La superiore resistenza di membrana è dovuta principalmente ad una conduttanza minore al potassio al livello del plateau (Noble D. *The Initiation of the Heartbeat*. Oxford UK: Clarendon, 1975, p. 1–156.). L'afflusso notevole di sodio durante un potenziale d'azione aumenta la corrente proporzionalmente, appunto, all'aumento della concentrazione sub-sarcolemmale di ioni sodio; perciò ci si aspetterebbe che questo pompaggio influisse notevolmente sulla forma del potenziale d'azione cardiaco durante la fase di plateau.

Materiali e Metodi

In questo capitolo si andranno ad approfondire le fasi del lavoro da me svolto. La prima fase è stata la ricerca degli articoli che contengono dati sperimentali ventricolari umani riguardanti le correnti miocardiche; a partire da questi articoli, suddivisi in base alle correnti misurate sperimentalmente in ognuno di essi, sono stati estrapolati i grafici, creando così un archivio immagini. Allo stesso tempo è stato creato un file Excel, di facile consultazione, per elencare i dati divisi per ogni corrente ventricolare, spiegando quanto contenuto in ogni figura, così da poter trovare facilmente il file di interesse. Inoltre, per facilitare l'utilizzo di questi dati in lavori successivi, i punti sperimentali sono stati raccolti utilizzando un opportuno script Matlab, e salvati sottoforma di vettori.

3.1 PubMed

Durante la prima fase del lavoro mi sono concentrato sulla ricerca degli articoli utilizzando PubMed. PubMed (figura 3.1) è una banca dati gratuita, con un motore di ricerca interno (Entrez), che contiene circa 24 milioni di citazioni di articoli scientifici di ambito biomedico dal 1949 ad oggi. La prima versione online è del gennaio del 1996. Questa banca dati è stata sviluppata dal National Center for Biotechnology Information (NCBI) presso la National Library of Medicine (NLM). Le citazioni provengono da MEDLINE (la prima banca dati della NLM) e da altre banche dati dedicate alle scienze biomedicali. La lingua di interfaccia è unicamente quella inglese.

Per questa ricerca a tappeto di articoli che potessero contenere dati a noi utili ho utilizzato delle parole chiave (ad esempio: “human”, “ventricular”, “data”, “potassium current”, etc.) ed ho sfruttato la funzione di PubMed che consente di visualizzare l'abstract o il citation format che forniscono delle informazioni sull'articolo in modo da poter effettuare già una prima selezione. Un'altra funzione di grandissima utilità è la visualizzazione, sulla destra dei documenti, di alcuni collegamenti ad articoli correlati (permette di ricercare articoli su argomenti simili, in ordine di affinità) oppure a link esterni, mediante i quali si può accedere a libri attinenti per ottenere ulteriori risorse online, compreso un eventuale accesso al testo integrale nel caso in cui l'Ateneo ne abbia l'accesso. Nell'interfaccia vi è la possibilità di utilizzare filtri per semplificare

ulteriormente la ricerca. E' inoltre possibile seguire un autore o un'istituzione particolare e rimanere sempre aggiornati su tutto ciò che pubblica.



Figura 3.1 : Maschera del pannello di ricerca degli articoli tratta dalla home del sito <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

Agli articoli così trovati, sono stati aggiunti tutti gli articoli scientifici i cui dati sperimentali sono stati utilizzati nella costruzione e/o validazione dei modelli matematici considerati in questo studio, ovvero tutti i modelli di cardiomicità umano ventricolare. Anche questi articoli sono stati ricercati su PubMed, utilizzando l'opportuno riferimento riportato appunto negli articoli di tali modelli.

3.2 Archiviazione grafici

Dopo aver ricercato e raccolto gli articoli riguardanti dati sperimentali sulle correnti ioniche ventricolari umane, è stato necessario effettuare un'ulteriore selezione mirata controllando uno ad uno gli articoli stessi. Infatti, non sempre i dati riportati sono effettivamente raccolti su cellule umane, oppure possono in alcuni casi provenire da pazienti malati e quindi da scartare. Ad ogni articolo è stato assegnato un codice (es. HexpD_001 o HexpD_003 etc etc) per consentirne l'identificazione.

In questa fase, lunga e laboriosa, ho innanzitutto suddiviso gli articoli preselezionati per tipo di corrente ionica, in modo tale da rendere più schematici i passi successivi.

Dalla lettura dell'abstract ho selezionato soltanto i dati che effettivamente erano umani e ventricolari, scartando tutti gli altri. Analizzando tutte le figure all'interno di ogni articolo ho determinato quali grafici fossero di interesse (ovvero quelli che effettivamente riportavano dati di correnti ioniche), e tali grafici sono poi stati salvati ad uno ad uno, all'interno di un archivio immagini appositamente creato. Anche le immagini sono state salvate utilizzando il codice di riferimento dell'articolo, per consentirne una rapida identificazione.

Una volta completata l'archiviazione immagini ho creato un file Excel con all'interno vari fogli di lavoro, uno per ogni tipologia di corrente ionica, la cui struttura è riportata nella seguente figura 3.2.

Current	Riferimento	Autore	Anno	Titolo	Abstract	Modelle	Plot	Exp Measurements	Note	Concentrations
IK1	HexpD_003	Bailly-Lorente	1998	Extracellular K ⁺ dependence of inward rectification kinetics in human left ventricular cardiomyocytes	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9851963	OR + IW + FG	Rif_HexpD_003_Figura_1	SS inactivation	Whole cell patch clamp.	(K ^o +4,Cao+2,Na ^o +120) (K ⁱ +120,EGTA 10) mM
IK1	HexpD_003	Bailly-Lorente	1998	Extracellular K ⁺ dependence of inward rectification kinetics in human left ventricular cardiomyocytes	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9851963	OR + IW + FG	Rif_HexpD_003_Figura_2	I-V	Effects of K _o changes	[K ^o +4,8,20,Cao+2,Na ^o +120] (K ⁱ +120,EGTA 10) mM
IK1	HexpD_009	Beuckelmann-Erdmann	1993	Alterations of K ⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8330380	PB	Rif_HexpD_009_Figura_1	I-V	Ca current blocked, T=23°C. Patch clamp.	(K ^o +4,Cao+2,Na ^o +138) (K ⁱ +130,EGTA 5) mM (Ca ⁱ <10nM)
IK1	HexpD_009	Beuckelmann-Erdmann	1993	Alterations of K ⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8330380	PB	Rif_HexpD_009_Figura_2	I-V	Ca current blocked, T=35°C, current time dependent. Patch clamp.	(K ^o +4,Cao+2,Na ^o +138) (K ⁱ +130,EGTA 5) mM (Ca ⁱ <10nM)
IK1	HexpD_024	Fink-Giles	2008	Contributions of HERG K ⁺ current to repolarization of the human ventricular action potential	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17919888	CP	Rif_HexpD_024_Figura_1	I-V	Ik1 changes due to alterations: [Mg], spermidine, T, [K _o], T=37°C	K ^o =4mM
IK1	HexpD_042	Jost-Nanasi	2009	Contribution of I _{Kr} and I _{K1} to ventricular repolarization in canine and human myocytes: is there any influence of action potential duration?	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18604826	OR	Rif_HexpD_042_Figura_1	Ik1 during repolarization	AP of various durations, CL=0.4-5s, T=37°C.	(K ^o +4,Cao+1.8,Na ^o +144) (K ⁱ +125,EGTA 10) mM
IK1	HexpD_051	Konarzewska-Sanguinetti	1995	Repolarizing K ⁺ currents in nonfailing human hearts. Similarities between right septal subendocardial and left subepicardial ventricular myocytes	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7948663	OR + IW	Rif_HexpD_051_Figura_1	Tau inactivation	microelectrode voltage clamp	(K ^o +4,Na ^o +125) (K ⁱ +5,4,Cao+0.25,Na ⁱ +125) mM
IK1	HexpD_052	Koumi-Arentzen	1995	Characterization of inwardly rectifying K ⁺ channel in human cardiac myocytes. Alterations in channel behavior in myocytes isolated from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7600847	TT + IW + PB	Rif_HexpD_052_Figura_1	I-V	Patch clamp. T=20-22°C.	(K ⁱ +141,EGTA+5) (K ^o +5,4,Cao+1,8,Na ^o +140) mM
IK1	HexpD_052	Koumi-Arentzen	1995	Characterization of inwardly rectifying K ⁺ channel in human cardiac myocytes. Alterations in channel behavior in myocytes isolated from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7600847	TT + IW + PB	Rif_HexpD_052_Figura_2	I-V	Patch clamp. T=20-22°C. Effect of Ba and Cs on IK1.	(K ⁱ +141,EGTA+5) (K ^o +5,4,Cao+1,8,Na ^o +140) mM
IK1	HexpD_052	Koumi-Arentzen	1995	Characterization of inwardly rectifying K ⁺ channel in human cardiac myocytes. Alterations in channel behavior in myocytes isolated from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7600847	TT + IW + PB	Rif_HexpD_052_Figura_3	Open time	Patch clamp. T=37°C.	(K ⁱ +150) (K ^o +5,4,Cao+1,8,Na ^o +140) mM
IK1	HexpD_053	Kubo-Murata	2001	Control of rectification and permeation by two distinct sites after the second transmembrane region in Kir2.1 K ⁺ channel	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11251047	IW	Rif_HexpD_053_Figura_1	I-V	Voltage clamp.	K ^o +10mM
IK1	HexpD_054	Li-Carrier	1998	Transmembrane heterogeneity of action potentials and I _{to1} in myocytes isolated from the human right ventricle	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9883422	CP+ GB+ FG+ TP+ IW+ SD	Rif_HexpD_054_Figura_1	I-V	Ik1 inhibition by [Ba] _o =0.5mM, [K ₁ densities in Epi, M, Endo cells]. Patch clamp. T=36°C.	(K ^o +5,4,Cao+2,Na ^o +138) (K ⁱ +130,EGTA+5,Na ⁱ +5) mM
IK1	HexpD_061	Magyar-Nanasi	2000	Effects of endothelin-1 on calcium and potassium currents in undiseased human ventricular myocytes	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11205054	GPB	Rif_HexpD_061_Figura_3	I-V	Et-1+1nM, T=37°C. Patch clamp.	(K ^o +5,4,Cao+2,5,Na ^o +140) (K ⁱ +125) mM
IK1	HexpD_079	O'Hara-Rudy	2011	Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: model formulation and experimental validation	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21637795	OR	Rif_HexpD_079_Figura_2	SS inactivation SS rectification	Voltage and K _o dependence of SS rectification/inactivation Patch clamp. T=37°C.	(K ^o +4,8,20,Cao+1,8,Na ^o +144) (K ⁱ +150,EGTA+10)mM

Figura 3.2: screenshot del foglio Excel creato.

La prima colonna identifica la corrente ionica misurata nell'articolo, mentre le colonne successive riportano rispettivamente (Figura 3.3):

- Codice identificativo dell'articolo, in numero crescente;
- Primo e ultimo autore dell'articolo: l'ultimo autore è stato riportato perché spesso identifica il gruppo/laboratorio e permette quindi di avere informazioni aggiuntive sull'origine dei dati;

- anno di pubblicazione;
- titolo dell'articolo;
- link diretto all'abstract dell'articolo stesso su PubMed.

<u>Currents</u>	<u>Riferimento</u>	<u>Autore</u>	<u>Anno</u>	<u>Titolo</u>	<u>Abstract</u>
Ito	HexpD_001	Amos-Himmel	1996	Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9011620

Figura 3.3: Prime colonne, tratte dal foglio Excel, che identificano l'articolo.

Le colonne successive contengono invece dettagli più specifici (figura 3.4):

- Lista dei modelli ventricolari umani che hanno utilizzato/citato quei dati sperimentali;
- Lista delle figure estratte dall'articolo e archiviate;
- Lista dei tipi di dati presenti nell'articolo, cioè le grandezze che sono state effettivamente e il cui corrispondente grafico è stato archiviato (ad esempio curva I-V);
- Eventuali note aggiuntive, contenenti dettagli sul tipo di cellule, temperatura e altre condizioni sperimentali;
- Concentrazioni ioniche intra- ed extra- cellulari utilizzate per gli esperimenti.

<u>Models</u>	<u>Plot</u>	<u>Exp Measurements</u>	<u>Note</u>	<u>Concentrations</u>
OR	Rf_HexpD_001_Figura_1	I-V	whole-cell current clamp and voltage clamp techniques. T=22°C.	(Ko+5,4;Nao+150;Cao0,5) (Ki+130;Nai+4;Cai+5;EGTA+10) mM

Figura 3.4: Colonne, tratte dal foglio Excel, contenenti dettagli specifici riguardo l'articolo.

Procedendo sistematicamente per ogni articolo e per ogni corrente, è stato quindi completato il file Excel, contenente un foglio specifico per ogni corrente (Figura 3.5) e di facile lettura, in modo tale da poter essere utilizzato all'occorrenza molto facilmente da chiunque voglia consultare tutti i dati sperimentali presenti in letteratura per una specifica corrente, fino ad oggi.

Ito	HexpD_061	Magyar-Nanasi	2000	Effects of endothelin-1 on calcium and potassium currents in undiseased human ventricular myocytes				
IK1	IKs	IKr	Ito	ICaL	INa	INaL	INaK	Incx
IKs	HexpD_118	Virag-Papp	2001	The slow component of the delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes				
IK1	IKs	IKr	Ito	ICaL	INa	INaL	INaK	Incx

Figura 3.5: Diversi fogli, contenenti dati sulle varie correnti, all'interno del file Excel.

Allo stesso tempo, però, spesso c'è la necessità di effettuare dei confronti tra i dati sperimentali e i risultati di simulazione. Proprio per questo, un eventuale utilizzatore potrebbe avere la necessità di graficare questi dati e quindi non solo osservare le figure raccolte, ma anche avere a disposizione gli attuali valori numerici. Proprio per questo è stato svolto il passaggio successivo, che ha permesso di esportare i dati dai grafici in Matlab.

3.3 Trasformazione in dati numerici (script Matlab)

Lo script Matlab riportato qui di seguito è stato utilizzato per esportare sotto forma di vettori i punti sperimentali raccolti negli articoli.

In particolare, tale script si compone di 5 blocchi, ognuno contenente delle funzioni ben precise, che ora si vedranno in dettaglio:

- Image selection (figura 3.6): il primo passo è la selezione dell'immagine di interesse; quindi il comando iniziale dello script permette a Matlab di reperire la figura (in questo caso la Figura_1 dell'articolo HexpD_001) dall'archivio immagini creato. L'immagine deve essere contenuta all'interno della stessa cartella contenente lo script Matlab.

```

%% Image Selection
fig_name = 'HexpD_001_Figura_1';
ext = '.png';
Imm = imread(strcat(fig_name, ext));
image(Imm); axis image

```

Figura 3.6: Prima parte dello script Matlab: selezione dell'immagine.

- Origin selection (selezione dell'origine): sul grafico che Matlab ci ha appena aperto dovremo andare a selezionare il punto d'origine degli assi; con il cursore si punta prima sull'origine dell'asse delle ascisse e se ne inserisce il valore nel command window di Matlab, dopodiché si esegue lo stesso procedimento per l'asse delle ordinate (figura 3.7).

```

%% Origin Selection
% you choose the point to be considered as the origin,
% separately for each axis:
% 1) ginput the point;
% 2) insert the corresponding numerical value
title('ginput x origin and type value')
x_origin2 = ginput(1);
x_origin = x_origin2(1);
x_0 = input('numerical value of horizontal axis \n');

title('ginput y origin and type value')
y_origin2 = ginput(1);
y_origin = y_origin2(2);
y_0 = input('numerical value of vertical axis \n');

```

Figura 3.7: Seconda parte dello script Matlab: selezione dell'origine.

- Reference selection (figura 3.8): a questo punto è necessario dare una scala al nostro grafico virtuale. Il seguente procedimento va eseguito prima sull'asse delle ascisse poi sull'asse delle ordinate: si scelgono due valori noti per ogni asse, e si inserisce poi la lunghezza di tale segmento nella command window.

```
%% Referenxe Selection
% you choose a segment from the figure,
% the first horizontally, the second vertically:
% 1) ginput of the extrama for the horizontal one
% 2) insert the corresponding length for the horizontal one
% 3) repeat point 1) and 2) with vertical segment

title('ginput x scale and type value')
x_sample2 = ginput(2);
x_sample = x_sample2(:,1);
x_sample_length = abs(x_sample(2) - x_sample(1));
x_data = input('Length of the segment \n');
x_ref = x_data/x_sample_length;

title('ginput y scale and type value')
y_sample2 = ginput(2);
y_sample = y_sample2(:,2);
y_sample_length = abs(y_sample(2) - y_sample(1));
y_data = input('Length of the segment \n');
y_ref = y_data/y_sample_length;
```

Figura 3.8: Terza parte dello script Matlab: reference selection.

- Data point selection (figura 3.9): le informazioni sugli assi e sulla scale sono pronte, rimane soltanto la selezione dei punti veri e proprio. È sufficiente inserire nella command window il numero di punti che si intende raccogliere, per poi selezionarli uno a uno. Questo passo è sicuramente il più laborioso, e richiede molta pazienza e precisione, soprattutto perché la qualità delle immagini talvolta non è molto bella, soprattutto quando si hanno a disposizione articoli pubblicati più di vent'anni fa.

```

%% Data point Selection
% Select the number of points you need
% and then ginput them

title('ginput the points to recover')
pnt = input('Number of experimental points \n');
points = ginput(pnt);
x_points = points(:,1);
y_points = points(:,2);

x_um = x_0 + ((x_points - x_origin) * x_ref);
y_um = y_0 - ((y_points - y_origin) * y_ref);

```

Figura 3.9: Quarta parte dello script Matlab: selezionare i punti.

- Print and Save (figura 3.10): l'ultimo comando permette di “stampare” il grafico, ossia di visualizzare la figura virtuale creata ad immagine e somiglianza dell'originale (questa funzione permette quindi di controllare se sono stati commessi errori nei passi sopracitati). Infine, i punti del grafico vengono salvati in una matrice, contenente una colonna per le x e una colonna per le y, per poter poi essere elaborati in seguito.

```

%% Print results and save data for fitting
% Select the number of points you need
% and then ginput them
data_um = [x_um y_um];
save('GB_I-V', 'data_um')
figure
plot(x_um, y_um, 'og-')

```

Figura 3.10: Quinta ed ultima parte dello script MatLab: stampa e salvataggio.

Lo script sopra descritto è quindi stato utilizzato per ognuna delle immagini raccolte per ognuna delle correnti ioniche considerate, e i corrispondenti vettori sono stati salvati nella stessa cartella contenente le immagini, sottoforma di dati “.mat”, facilmente importabili in Matlab.

Risultati

Nel capitolo precedente sono stati descritti nel dettaglio i passaggi effettuati per lo svolgimento di questo lavoro di tesi, ovvero la creazione di un archivio di tutti i dati sperimentali umani di correnti ioniche cardiache presenti in letteratura, per consentirne una rapida ricerca, consultazione ed utilizzo in futuro.

In questo capitolo, verranno riassunti e riepilogati i dati contenuti nell'archivio, per darne una panoramica più quantitativa. Infine, come esempio, verranno analizzati e confrontati i dati relativi alle curve I-V per la corrente di potassio I_{to} .

4.1 Caratteristiche quantitative dell'archivio dati.

Come già descritto nei capitoli precedenti, la prima parte del lavoro è stata la ricerca e selezione degli articoli contenenti dati sperimentali ventricolari umani in letteratura; la selezione iniziale, basata principalmente sul titolo e su una lettura veloce dell'abstract introduttivo, era costituita da oltre 150 articoli.

Da un'analisi più completa, sono stati estratti da questi articoli solo i dati effettivamente di interesse, scartando quelli eventualmente ricavati da cellule animali, cellule patologiche. In particolare, di seguito sono quindi elencati i dati attualmente archiviati:

I_{to}

sono stati selezionati 11 articoli utili contenenti:

- 13 curve I-V (che verranno brevemente presentate alla fine di questo capitolo);
- 10 curve di attivazione;
- 5 curve di inattivazione;
- 19 grafici contenenti le diverse costanti di tempo (attivazione, inattivazione, rapida e lenta) in funzione del potenziale e le singole tracce delle correnti.

I_{CaL}

sono stati selezionati 9 articoli utili contenenti:

- 7 curve I-V;
- 3 curve di attivazione;
- 3 curve di inattivazione;

- 15 grafici contenenti le diverse costanti di tempo (attivazione, inattivazione, rapida e lenta) in funzione del potenziale e le singole tracce delle correnti.

IK1

sono stati selezionati 12 articoli utili contenenti:

- 44 curve I-V;
- 11 curve di inattivazione;
- 5 grafici contenenti le diverse costanti di tempo (attivazione, inattivazione, rapida e lenta) in funzione del potenziale e le singole tracce delle correnti.

IKr

sono stati selezionati 10 articoli utili contenenti:

- 14 curve I-V;
- 10 curve di attivazione;
- 9 curve di inattivazione;
- 29 grafici contenenti le diverse costanti di tempo (attivazione, inattivazione, rapida e lenta) in funzione del potenziale e le singole tracce delle correnti.

IKs

sono stati selezionati 9 articoli utili contenenti:

- 20 curve I-V;
- 6 curve di attivazione;
- 12 grafici contenenti le diverse costanti di tempo (attivazione, inattivazione, rapida e lenta) in funzione del potenziale e le singole tracce delle correnti.

INa

Sono stati selezionati 9 articoli utili contenenti:

- 9 curve I-V;
- 8 curve di attivazione;
- 10 curve di inattivazione;
- 64 grafici contenenti le diverse costanti di tempo (attivazione, inattivazione, rapida e lenta) in funzione del potenziale e le singole tracce delle correnti.

INaL

Sono stati selezionati 3 articoli utili contenenti:

- 3 curve I-V;
- 1 curva di attivazione;

- 1 curva di inattivazione;
- 2 grafici contenenti le diverse costanti di tempo (attivazione, inattivazione, rapida e lenta) in funzione del potenziale e le singole tracce delle correnti.

Incx

Sono stati selezionati 5 articoli utili contenenti:

- 2 curve I-V;
- 6 grafici contenenti le diverse costanti di tempo (attivazione, inattivazione, rapida e lenta) in funzione del potenziale e le singole tracce delle correnti.

In APPENDICE sono riportate le tabelle Excel.

Dai precedenti grafici ho estratto i dati, sotto forma vettori, tramite lo script in MatLab descritto nel capitolo precedente. Non da tutte le immagini è stato possibile estrarre informazioni quantitative (ad esempio, le tracce singole di corrente non sono state considerate), ma in alcuni grafici erano presenti più di una coppia di variabili. In totale, quindi, sono stati raccolti 250 file .mat, così suddivisi per ogni corrente:

- I_{to} 44 files;
- I_{CaL} 30 files;
- I_{K1} 42 files;
- I_{Kr} 41 files;
- I_{Ks} 35 files;
- I_{Na} 45 files;
- I_{NaL} 7 files;
- Incx 6 files.

La mole di dati raccolti è quindi notevole, e purtroppo non tutti i dati corrispondenti alla stessa grandezza sono in accordo tra loro. Proprio per questo motivo, modelli matematici che si basano su un solo set di dati possono avere formulazioni anche molto diverse da modelli sviluppati invece su un altro set di dati.

I dati sperimentali, infatti, presentano una grossa variabilità, che unita al ridotto numero di cellule per esperimento, rende necessaria una certa dose di cautela nella scelta e

nell'utilizzo di questi dati. In particolare, bisogna sempre tenere in considerazione le condizioni sperimentali in cui i dati stessi sono stati raccolti, come le concentrazioni ioniche in soluzione o la temperatura.

Idealmente, nella costruzione di un modello bisognerebbe basarsi sul maggior numero di dati sperimentali possibili, per rendere il modello robusto e più generalizzabile.

Come esempio pratico di variabilità, qui di seguito abbiamo raccolto i dati di alcune curve I-V per la corrente Ito e li abbiamo confrontati tra loro.

4.2 Confronto dati curve I-V riguardanti la corrente Ito.

In tutto sono state considerate 7 diverse curve I-V per la corrente Ito.

Come prima cosa, abbiamo notato che 5 di queste curve riportavano gli attuali valori di corrente, mentre le altre 2 erano state normalizzate rispetto al loro valore massimo.

Abbiamo quindi confrontato le curve separatamente.

Ogni set di dati fa riferimento ad un esperimento, quindi ad un articolo ben preciso; qui di seguito i riferimenti tra set dati e articolo;

I 5 set dati contenenti gli attuali valori di corrente nella curva I-V:

- DataSet1 = Amos-Himmel-1996;
- DataSet2 = Magyar-Nanasi-2000;
- DataSet3 = Konarzewska-Sanguinetti-1995 (Epicardio);
- DataSet4 = Konarzewska-Sanguinetti-1995 (Endocardio);
- DataSet5 = Peeters-Barry-1995.

I 2 set dati contenenti valori di corrente normalizzata nella curva I-V:

- DataSet6 = Greenstein-Winslow-2000;
- DataSet7 = O'Hara-Rudy-2011.

Considerando i primi 5 set di dati, ottenuti da quattro articoli diversi, si vede subito come le correnti misurate differiscano le une dalle altre in termini quantitativi. L'andamento delle curve è simile, ma soprattutto al crescere del potenziale imposto

durante gli esperimenti, le curve divergono tra loro, arrivando a differenze pari al 10% (Figura 4.1).

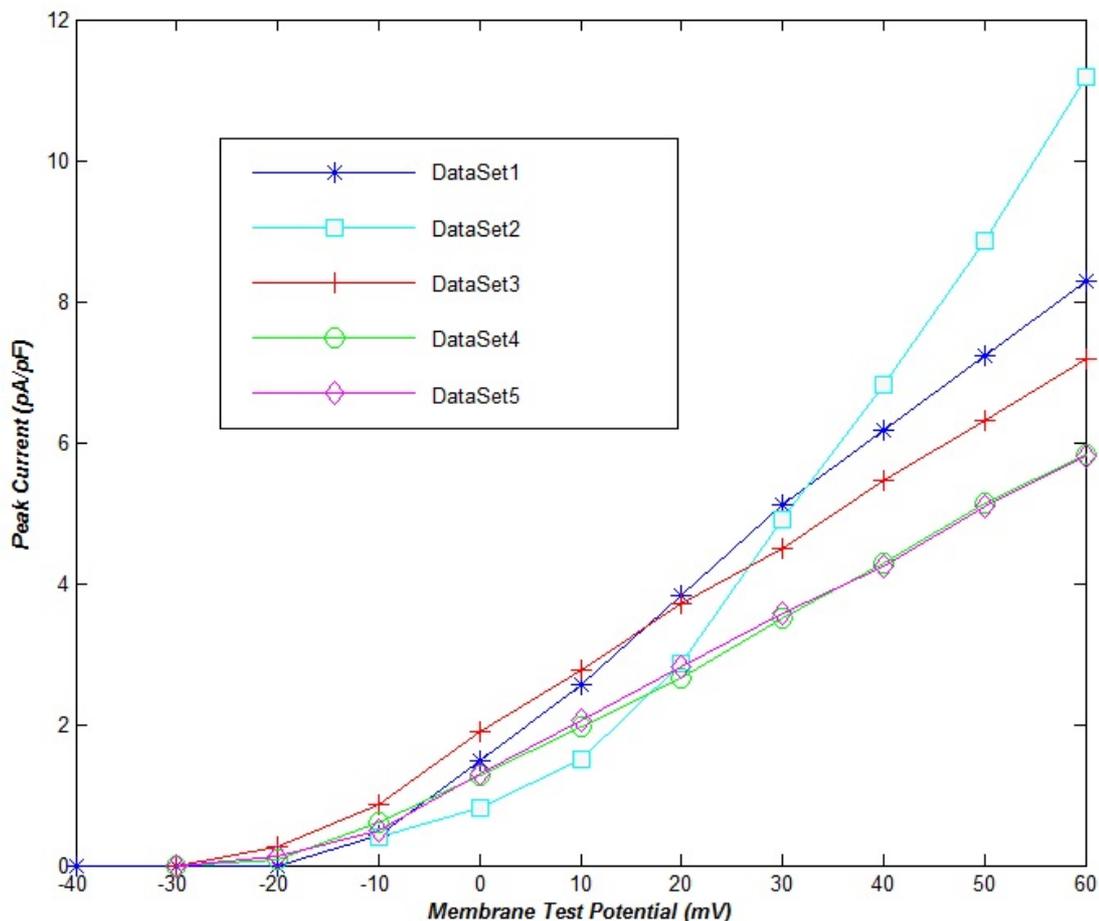


Figura 4.1: Confronto curve I-V che hanno utilizzato la Ipeak in valore assoluto.

La curva azzurra, che è particolarmente diversa dalle altre, è stata raccolta per cellule di tipo “endo”, che sono caratterizzate da proprietà elettrofisiologiche diverse da quelle di tipo “epi”, che costituiscono invece la curva rossa. Purtroppo, soprattutto negli articoli più vecchi, il tipo di cellula non viene sempre specificato, così come le condizioni sperimentali, e differenze anche piccole in termini di temperatura o concentrazione, possono riflettersi in differenze anche notevoli di corrente.

Tali differenze possono in parte dipendere dalle diverse condizioni in cui sono stati svolti gli esperimenti, non sempre omogenee tra loro.

Temperatura:

- DataSet1: esperimento e misurazioni avvenuti alla temperatura di 22 °C;
- DataSet2: esperimento e misurazioni avvenuti alla temperatura di 37 °C;
- DataSet5: esperimento e misurazioni avvenuti alla temperatura di 22 °C.

Concentrazione intracellulare:

- DataSet1: [K] = 130 mM;
- DataSet2: [K]= 125 mM;
- DataSet5: [K] = 150 mM.

Concentrazione extracellulare:

- DataSet1: [K] = 5,4 mM, [Na] = 150 mM;
- DataSet4: [K] = 4 mM, [Na] = 132 mM;
- DataSet3: [K] = 4 mM, [Na] = 132 mM;
- DataSet2: [K]= 5,4 mM, [Na] = 140 mM;
- DataSet5: [K] = 4 mM, [Na] = 140 mM.

Inoltre, la corrente misurata in valore assoluto può variare anche notevolmente da cellula a cellula, e a maggior ragione da esperimento a esperimento. Infatti, anche la procedura di isolamento o il trattamento delle cellule stesse prima delle misurazioni, può talvolta danneggiarne le membrane e quindi ridurre la conduttanza di determinate correnti. Proprio per questo, tipicamente le curve I-V vengono riportate normalizzate. In questo modo si annullano le differenze in termini assoluti e si può avere un'idea più precisa della dinamica della corrente.

Negli articoli selezionati qui di seguito, infatti, la corrente di picco è stata graficata dopo essere stata normalizzata rispetto al suo valore massimo; i valori normalizzati sono quindi compresi nell'intervallo [0,1], dove il valore massimo di corrente di picco corrisponderà al valore 1 (valore massimo).

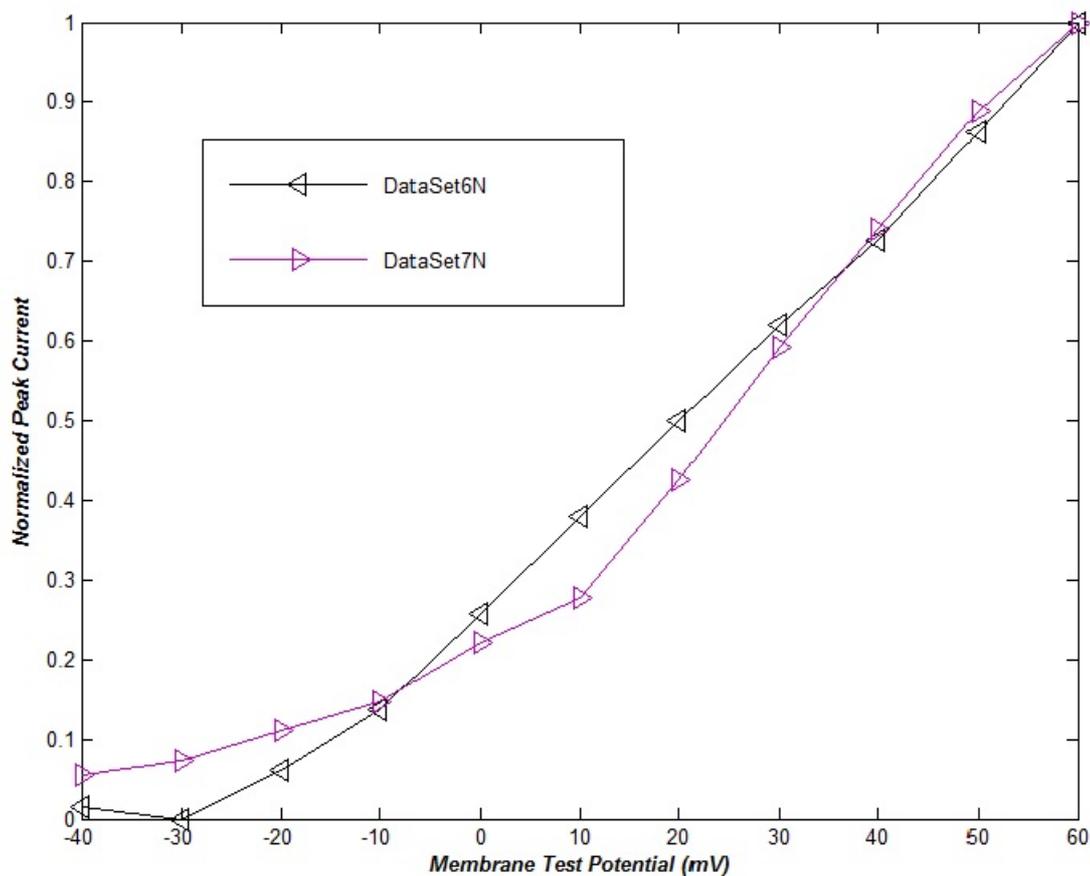


Figura 4.2 : Confronto curve I-V che hanno utilizzato la corrente normalizzata.

Anche i risultati sperimentali riportati in Figura 4.2 sono stati raccolti in condizioni sperimentali leggermente diverse tra loro.

Temperatura:

- DataSet6: esperimento e misurazioni avvenuti alla temperatura di 35°C;
- DataSet7: esperimento e misurazioni avvenuti alla temperatura di 37 °C.

Concentrazione intracellulare:

- DataSet6: [K] = 130 mM, EGTA = 1 mM;
- DataSet7: [K]= 150 mM, EGTA = 10 mM.

Concentrazione extracellulare:

- DataSet6: [K] = 5 mM, [Na] = 140 mM, [Ca] = 2 mM;
- DataSet7: [K] = 4 mM, [Na] = 144 mM, [Ca] = 1,8 mM.

4.3 Confronto I-V tutte normalizzate

Per poter confrontare allo stesso tempo tutti i grafici disponibili, abbiamo quindi normalizzato anche le prime cinque curve I-V, per poterle poi sovrapporre alle due già normalizzate. Il confronto finale è mostrato in Figura 4.3.

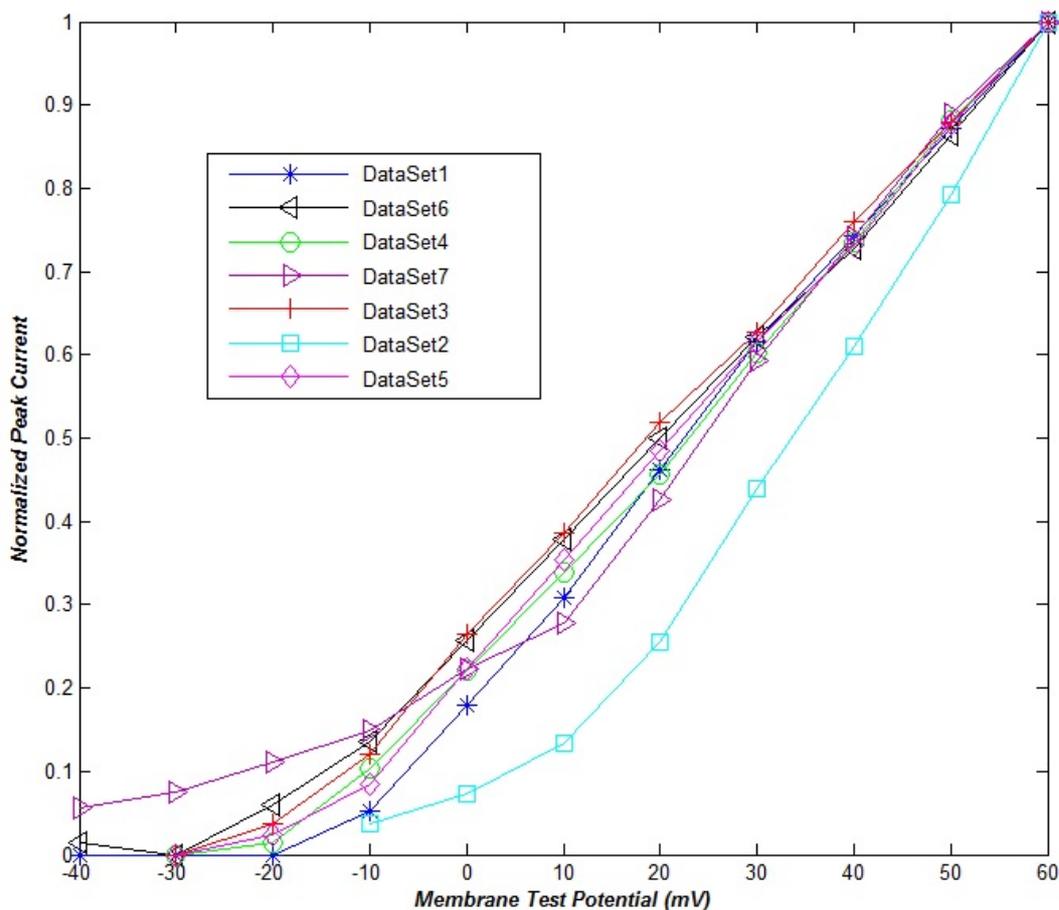


Figura 4.3: Confronto curve I-V tutte normalizzate.

Normalizzando le curve si riducono gli errori di misura, soprattutto per valori di potenziale positivi, dove la corrente è maggiore. Le curve continuano ad essere diverse quando la corrente è più piccola, perché qui l'incidenza degli errori di misura è più importante. L'unica curva che continua ad essere sostanzialmente diversa dalle altre è quella ricavata da cellule endo, in cui è noto come la corrente I_{to} sia ridotta rispetto alle cellule epi.

CONCLUSIONI

Lo scopo principale di questo lavoro di testi è stato quello di creare un archivio contenente tutti i dati sperimentali presenti in letteratura per quanto riguarda le correnti ioniche ventricolari umani.

Dopo una fase iniziale di ricerca in letteratura sono stati selezionati più di 150 articoli scientifici di interesse, in seguito analizzati ad uno ad uno, scartando quelli che erano stati considerati erroneamente e che riguardavano misurazioni ottenute solo su specie animali. Le informazioni principali (il titolo, l'anno di pubblicazione, le condizioni sperimentali in cui tali dati sono stati acquisiti) sono state raccolte in un foglio di lavoro (file Excel), suddiviso in base alla corrente considerata, per consentirne una facile archiviazione e consultazione.

Tutti i dati di interesse sono stati raccolti salvando le immagini grafiche contenute negli articoli, e classificandole in un'apposita directory. Per facilitare il futuro utilizzo di questi dati, i valori numerici sono stati ricavati utilizzando un apposito script in Matlab, e salvati sotto forma di vettori (file .mat).

Purtroppo non tutti i dati sperimentali corrispondenti alle medesime grandezze sono in accordo tra loro: la variabilità biologica, infatti, si aggiunge al numero ridotto di cellule utilizzate in ogni esperimento, e gli errori di misura possono avere un ruolo anche importante. Proprio per questo, è importante prima di utilizzare un certo tipo di dati considerare tutti quelli disponibili in letteratura, e scegliere il dataset (o i dataset) più attendibili e in accordo tra loro.

Come esempio della variabilità riscontrata nei dati, abbiamo effettuato un confronto qualitativo considerando tutti i dati disponibili per la curva I-V di una corrente di K^+ (I_{to}), confrontandone i valori numerici e le condizioni sperimentali.

In conclusione, data l'utilità della modellistica cardiaca che, integrando i rari dati sperimentali umani ottenuti da diversi esperimenti, può sperimentare test che in vivo non sono realizzabili, l'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato realizzato, mettendo a disposizione un archivio ordinato di dati sperimentali disponibili in letteratura, creando uno strumento di facile accesso e consultazione, che possa essere di supporto a tutti

coloro che dovranno in futuro utilizzare tali dati per l'identificazione e/o validazione di modelli matematici di potenziale d'azione ventricolare.

Appendice

IK1

Currents	IK1	IK1	IK1	IK1	IK1	IK1
Riferimento	HexpD_003	HexpD_003	HexpD_009	HexpD_009	HexpD_024	HexpD_042
Autore	Baillly-Lorente	Baillly-Lorente	Beuckelman-Erdmann	Beuckelman-Erdmann	Fink-Giles	Jost-Nanasi
Anno	1998	1998	1993	1993	2008	2009
Titolo	<i>Extracellular K⁺ dependence of inward rectification kinetics in human left ventricular cardiomyocytes</i>	<i>Extracellular K⁺ dependence of inward rectification kinetics in human left ventricular cardiomyocytes</i>	Alterations of K ⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure	Alterations of K ⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure	Contributions of HERG K ⁺ current to repolarization of the human ventricular action potential	Contribution of I _{Kr} and I _{K1} to ventricular repolarization in canine and human myocytes: is there any influence of action potential duration?
Abstract	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9851963	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9851963	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8330380	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8330380	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17919688	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18604626
Models	OR + IW + FG	OR + IW + FG	PB	PB	CP	OR
Plot	Rif_HexpD_003_Figura_1	Rif_HexpD_003_Figura_2	Rif_HexpD_009_Figura_1	Rif_HexpD_009_Figura_2	Rif_HexpD_024_Figura_1	Rif_HexpD_042_Figura_1
Exp Measurements	I-V	I-V	I-V	I-V	I-V	Ik1 during repolarization
Note	Whole cell patch clamp.	Effects of Ko changes	Ca current blocked, T=23°C. Patch clamp.	Ca current blocked, T=35°C, current time dependent. Patch clamp.	Ik1 changes due to alterations: [Mg] _i , spermidine, T, [K] _o . T=37°C	AP of various durations, CL=(0,4-5)s, T=37°C.
Concentration	(Ko+4;Cao+2;Nao+120)(Ki+120;EGT A 10) mM	[Ko+(4,8,20);Cao+2;Nao120](Ki 120;EGT A 10) mM	(Ko+4;Cao+2;Nao+138)(Ki+130;EGT A 5) mM (Cai<10nM)	(Ko+4;Cao+2;Nao+138)(Ki+130;EGT A 5) mM (Cai<10nM)	Ko+4mM	(Ko+4;Cao+1,8;Nao+144)(Ki+125;EGT A 10) mM

Currents	IK1	IK1	IK1	IK1	IK1	IK1
Riferimento	HexpD_051	HexpD_052	HexpD_052	HexpD_052	HexpD_053	HexpD_054
Autore	Konarzewska-Sanguinetti	Koumi-Arentzen	Koumi-Arentzen	Koumi-Arentzen	Kubo-Murata	Li-Carrier
Anno	1995	1995	1995	1995	2001	1998
Titolo	Repolarizing K ⁺ currents in nonfailing human hearts. Similarities between right septal subendocardial and left subepicardial ventricular myocytes	Characterization of inwardly rectifying K ⁺ channel in human cardiac myocytes. Alterations in channel behavior in myocytes isolated from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy	Characterization of inwardly rectifying K ⁺ channel in human cardiac myocytes. Alterations in channel behavior in myocytes isolated from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy	Characterization of inwardly rectifying K ⁺ channel in human cardiac myocytes. Alterations in channel behavior in myocytes isolated from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy	Control of rectification and permeation by two distinct sites after the second transmembrane region in Kir2.1 K ⁺ channel	Transmural heterogeneity of action potentials and Ito1 in myocytes isolated from the human right ventricle
Abstract	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7648663	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7600647	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7600647	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7600647	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11251047	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9683422
Models	OR + IW	TT + IW + PB	TT + IW + PB	TT + IW + PB	IW	CP+ GB+ FG+ TP+ IW+ SD
Plot	Rif_HexpD_051_Figura_1	Rif_HexpD_052_Figura_1	Rif_HexpD_052_Figura_2	Rif_HexpD_052_Figura_3	Rif_HexpD_053_Figura_1	Rif_HexpD_054_Figura_1
Exp Measurements	Tau inactivation	I-V	I-V	Open time	I-V	I-V
Note	microelectrode voltage clamp	Patch clamp. T=20-22°C.	Patch clamp. T=20-22°C. Effect of Ba and Cs on IK1.	Patch clamp. T=37°C.	Voltage clamp.	Ik1 inhibition by [Ba] _o +0,5mM, (Ik1 densities in Epi, M, Endo cells). Patch clamp. T=36°C.
Concentration	(Ko+4; Nao+125) (Ki+5,4; Cai+0,25; Nai+125) mM	(Ki+141; EGT A+5) (Ko+5,4; Cao+1,8; Nao+140) mM	(Ki+141; EGT A+5) (Ko+5,4; Cao+1,8; Nao+140) mM	(Ki+150) (Ko+5,4; Cao+1,8; Nao+140) mM	Ko+10mM	(Ko+5,4; Cao+2; Nao+136) (Ki+130; EGT A+5; Nai+5) mM

IKs

Currents	IKs	IKs	IKs	IKs	IKs	IKs
Riferimento	HexpD_055	HexpD_079	HexpD_095	HexpD_096	HexpD_097	HexpD_098
Autore	Li-Nattel	O'Hara-Rudy	Pusch	Pusch-Conti	Pusch-Conti	Pusch-Friedrich
Anno	1996	2011	1998	1998	2000	2001
Titolo	Evidence for two components of delayed rectifier K ⁺ current in human ventricular myocytes	Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: model formulation and experimental validation	Increase of the single-channel conductance of KvLQT1 potassium channels induced by the association with minK	Activation and inactivation of homomeric KvLQT1 potassium channels	Gating and flickery block differentially affected by rubidium in homomeric KCNQ1 and heteromeric KCNQ1/KCN E1 potassium channels	Two open states and rate-limiting gating steps revealed by intracellular Na ⁺ block of human KCNQ1 and KCNQ1/KCN E1 K ⁺ channels
Abstract	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8635226	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21637795	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9817805	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9675180	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10620287	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11351022
Models	GB + PB + TP + IW	OR	IW	IW	IW	IW
Plot	Rif_HexpD_055_Figura_1	Rif_HexpD_079_Figura_3	Rif_HexpD_095_Figura_1	Rif_HexpD_096_Figura_1	Rif_HexpD_097_Figura_1	Rif_HexpD_098_Figura_1
Exp Measurements	SS activation	SS Activation Tau Act Tau Deact I-V tail	I-V tail	I-V tail	I-V tail	I-V
Note	Patch clamp. T=36°C.	T=37°C	Patch clamp	Independence of tail current kinetics on the extracellular K ⁺ concentration. Voltage-clamp.	T=18-19°C	Patch clamp. T=20±1°C for homomeric channels; T=25 ± 1°C for heteromers.
Concentration	(Ki+130;Nai+5;EGTA+5) (Ko+5,4;Cao+1;NaO replaced to suppress Ina) mM	(Ko+4;Cao+1,8;NaO+144) (Ki+150;EGTA+10) mM	Ki+100 mM	1exp (Cao+0,5;NaO+200) 2exp(KO+200;Cao+0,5) mM	1exp (Ko+200;Cao+0,5) 2exp (Rb+200;Cao+0,5) mM	[Ki+65;EGTA+2 +(Nai+65 or NMDG-Cl+65)] (Cao+1,8;NaO+150) mM

Currents	Iks	Iks	Iks	Iks	Iks	Iks
Riferimento	HexpD_108	HexpD_108	HexpD_115	HexpD_118	HexpD_118	HexpD_118
Autore	Splawski-Keating	Splawski-Keating	TristaniFirouzi-Sanguinetti	Virag-Papp	Virag-Papp	Virag-Papp
Anno	1997	1997	1998	2001	2001	2001
Titolo	Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress Iks function	Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress Iks function	Voltage-dependent inactivation of the human K ⁺ channel KvLQT1 is eliminated by association with minimal K ⁺ channel (minK) subunits	The slow component of the delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes	The slow component of the delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes	The slow component of the delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes
Abstract	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9354802	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9354802	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9625865	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230978	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230978	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230978
Models	PB	PB	IW	OR	OR + GPB+TT+IW	GPB
Plot	Rif_HexpD_108_Figura_1	Rif_HexpD_108_Figura_2	Rif_HexpD_115_Figura_1	Rif_HexpD_118_Figura_1	Rif_HexpD_118_Figura_2	Rif_HexpD_118_Figura_3
Exp Measurements	I-V Tau Deact	I-V Tau Deact	I-V tail	SS Activation	Tau act Tau deact	I-V tail
Note	Functional effects of D76N KCNE1 mutation	Functional effects of S74L KCNE1 mutation	Inactivation of KvLQT1 channels. T=22-24°C. Voltage clamp.	Patch clamp. T=37°C.	Patch clamp. T=37°C.	Patch clamp. T=37°C.
Concentrations			(Ko+2;Cao+0,1;Nao+96) mM	(Ko+4;Cao+1,8;Nao+144) (Ki+135;Nai+10;EGTA+5) mM	(Ko+4;Cao+1,8;Nao+144) (Ki+135;Nai+10;EGTA+5) mM	(Ko+4;Cao+1,8;Nao+144) (Ki+135;Nai+10;EGTA+5) mM

IKr

Currents	IKr	IKr	IKr	IKr	IKr	IKr
Riferimento	HexpD_024	HexpD_038	HexpD_041	HexpD_042	HexpD_061	HexpD_079
Autore	Fink-Giles	lost-Papp	Johnson-Bennett	Jost-Nanasi	Magyar-Nanasi	O'Hara-Rudy
Anno	2008	1998	1999	2009	2000	2011
Titolo	Contributions of HERG K ⁺ current to repolarization of the human ventricular action potential	Delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes	Human ether-à-go-go-related gene K ⁺ channel gating probed with extracellular ca ²⁺ . Evidence for two distinct voltage sensors.	Contribution of I _{Kr} and I _{K1} to ventricular repolarization in canine and human myocytes: is there any influence of action potential duration?	Effects of endothelin-1 on calcium and potassium currents in undiseased human ventricular myocytes	Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: model formulation and experimental validation
Abstract	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17919688	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1070491	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10102937	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18604626	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11205054	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21637795
Models	CP	GPB + TT + IW	GPB + TT	OR	IW	OR
Plot	Rif_HexpD_024_Figura_3	Rif_HexpD_038_Figura_1	Rif_HexpD_041_Figura_1	Rif_HexpD_042_Figura_1	Rif_HexpD_061_Figura_2	Rif_HexpD_079_Figura_3
Exp Measurements	SS activation I-V	I-V tail	SS inactivation	I-V	I-V	SS activation tau act fast/slow tau deact fast/slow I-V tail current Vclamp current Aclamp
Note	1exp T=37°C 2exp T=23°C	Patch clamp. T=35°C	Patch clamp.	Patch clamp. T=37°C	T=37°C	Patch clamp. T=37°C
Concentration	Ko+4 mM	(Ko+4-8;Nao+144;Cao+1,8) (Ki+125) mM	(Ko+4;Nao+144;Cao+1,8-10) (Ki+120) mM	(Ko+4;Nao+144;Cao+1,8) (Ki+125;EGT A+10) mM	(Ko+5,4;Nao+140;Cao+2,5) (Ki+125) mM	(Ko+4;Nao+144;Cao+1,8) (Ki+150;EGT A+10) mM

Currents	IKr	IKr	IKr	IKr	IKr	IKr
Riferimento	HexpD_116	HexpD_131	HexpD_131	HexpD_131	HexpD_131	HexpD_133
Autore	Vandenberg-Huang	Yang-Roden	Yang-Roden	Yang-Roden	Yang-Roden	Zhang-Fedida
Anno	2006	1997	1997	1997	1997	2003
Titolo	Temperature dependence of human ether-a-go-go-related gene K ⁺ currents	Rapid inactivation determines the rectification and [K ⁺] _o dependence of the rapid component of the delayed rectifier K ⁺ current in cardiac cells	Rapid inactivation determines the rectification and [K ⁺] _o dependence of the rapid component of the delayed rectifier K ⁺ current in cardiac cells	Rapid inactivation determines the rectification and [K ⁺] _o dependence of the rapid component of the delayed rectifier K ⁺ current in cardiac cells	Rapid inactivation determines the rectification and [K ⁺] _o dependence of the rapid component of the delayed rectifier K ⁺ current in cardiac cells	Modulation of human ether-a-go-go-related K ⁺ (HERG) channel inactivation by Cs ⁺ and K ⁺
Abstract	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16452156	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9168780	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9168780	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9168780	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9168780	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12626667
Models	FG	FG	FG	FG	FG	FG
Plot	Rif_HexpD_116_Figura_1	Rif_HexpD_131_Figura_1	Rif_HexpD_131_Figura_2	Rif_HexpD_131_Figura_3	Rif_HexpD_131_Figura_4	Rif_HexpD_133_Figura_1
Exp Measurements	I-V	SS activation	recovery	I-V	tau recovery	I-V tail
Note	Temperatures ranging from 20.5 to 33.9°C. Patch clamp	Patch clamp. T=20-22°C.	Patch clamp. T=20-22°C.	Patch clamp. T=20-22°C.	Patch clamp. T=20-22°C.	Bath solution at T=22-23°C.
Concentration	(K _o +5,1;Na _o +130;Ca _o 1)(K _i +140;EGTA+5) mM	(K _i +145)(K _o +4;Ca _o +1,8;Na _o +130) mM	(K _i +145)(K _o +4;Ca _o +1,8;Na _o +130) mM	(K _i +145)(K _o +4;Ca _o +1,8;Na _o +130) mM	(K _i +145)(K _o +4;Ca _o +1,8;Na _o +130) mM	1exp (K _i +130;EGTA+5)(Ca _o +2) 2exp (Cs _i +130;EGTA+5)(Ca _o +2) mM

Ito

Currents	Ito	Ito	Ito	Ito	Ito	Ito
Riferimento	HexpD_001	HexpD_001	HexpD_019	HexpD_032	HexpD_032	HexpD_051
Autore	Amos-Himmel	Amos-Himmel	Dixon-McKinnon	Greenstein-Winslow	Greenstein-Winslow	Konarzewsk a-Sanguinetti
Anno	1996	1996	1996	2000	2000	1995
Titolo	Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes	Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes	Role of the Kv4.3 K+ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current	Role of the calcium-independent transient outward current I(to1) in shaping action potential morphology and duration	Role of the calcium-independent transient outward current I(to1) in shaping action potential morphology and duration	Repolarizing K+ currents in nonfailing human hearts. Similarities between right septal subendocardial and left subepicardial ventricular myocytes
Abstract	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9011620	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9011620	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8831489	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11090548	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11090548	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7648663
Models	OR	OR	IW	OR + TP + IW	OR + TP + IW	IW
Plot	Rif_HexpD_001_Figura_1	Rif_HexpD_001_Figura_2	Rif_HexpD_019_Figura_1	Rif_HexpD_032_Figura_1	Rif_HexpD_032_Figura_2	Rif_HexpD_051_Figura_2
Exp Measurements	I-V	SS inactivation	Kinetic properties	Markov state model	model-simulated currents	I-V Tau inact
Note	whole-cell current clamp and voltage clamp techniques. T=22°C.	whole-cell current clamp and voltage clamp techniques. T=22°C.	T=30°C	T=35°C	T=35°C	voltage clamp.
Concentration	(Ko+5,4;Nao+150;Cao0,5) (Ki+130;Nai+4;Cai+5;EGT A+10) mM	(Ko+5,4;Nao+150;Cao0,5) (Ki+130;Nai+4;Cai+5;EGT A+10) mM	(Ko+5,4;Nao+140;Cao+1,8) (Ki+130;Nai+8;Cai+5;EGT A+11) mM	(Ko+5;Nao+140;Cao+2) (Ki+130;EGT A+1) mM	(Ko+5;Nao+140;Cao+2) (Ki+130;EGT A+1) mM	(Ko+4;Nao+132) mM

Currents	Ito	Ito	Ito	Ito	Ito	Ito
Riferimento	HexpD_051	HexpD_061	HexpD_071	HexpD_072	HexpD_072	HexpD_072
Autore	Konarzewska-Sanguinetti	Magyar-Nanasi	Nabauer-Erdmann	Nabauer-Steinbeck	Nabauer-Steinbeck	Nabauer-Steinbeck
Anno	1995	2000	1993	1996	1996	1996
Titolo	Repolarizing K ⁺ currents in nonfailing human hearts. Similarities between right septal subendocardial and left subepicardial ventricular myocytes	Effects of endothelin-1 on calcium and potassium currents in undiseased human ventricular myocytes	Characteristics of transient outward current in human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure	Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle	Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle	Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle
Abstract	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7648663	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11205054	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8330381	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8616924	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8616924	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8616924
Models	IW	OR + CP + TP + GB + IW	PB	GPB + TT + IW + PB	GPB + TT + IW + PB	GPB + TT + IW + PB
Plot	Rif_HexpD_051_Figura_3	Rif_HexpD_061_Figura_3	Rif_HexpD_071_Figura_1	Rif_HexpD_072_Figura_1	Rif_HexpD_072_Figura_2	Rif_HexpD_072_Figura_3
Exp Measurements	I-V tail	I-V	SS activation SS inactivation	SS activation	tau inact fast/slow	recovery
Note	voltage clamp.	Patch clamp. T=37°C	Patch clamp. T=21-23°C	Patch clamp. T=35°C	T=22°C/35°C	T=22°C
Concentration	(Ko+4;Nao+132) mM	(Ko+5,4;Cao+2,5;Nao+140) (Ki+125) mM	(Ko+4;Nao+138;Cao+2) (Ki+130;EGT A+5) mM	(Ko+4;Nao+138;Cao+2) (Ki+130;EGT A+5) mM	(Ko+4;Nao+138;Cao+2) (Ki+130;EGT A+5) mM	(Ko+4;Nao+138;Cao+2) (Ki+130;EGT A+5) mM

ICaL

Currents	ICaL	ICaL	ICaL	ICaL	ICaL	ICaL
Riferimento	HexpD_023	HexpD_027	HexpD_057	HexpD_057	HexpD_057	HexpD_061
Autore	Dzhura-Anderson	Fulop-Varro	Li-Nattel	Li-Nattel	Li-Nattel	Magyar-Nanasi
Anno	2000	2004	1999	1999	1999	2000
Titolo	Calmodulin kinase determines calcium-dependent facilitation of L-type calcium channels	Reopening of L-type calcium channels in human ventricular myocytes during applied epicardial action potentials	Transmembrane ICa contributes to rate-dependent changes of action potentials in human ventricular myocytes	Transmembrane ICa contributes to rate-dependent changes of action potentials in human ventricular myocytes	Transmembrane ICa contributes to rate-dependent changes of action potentials in human ventricular myocytes	Effects of endothelin-1 on calcium and potassium currents in undiseased human ventricular myocytes
Abstract	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10707089	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14706111	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9887022	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9887022	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9887022	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=magyar+virag+2001
Models	OR	OR	CRLP + IW + GPB	CRLP + IW + GPB	CRLP + IW + GPB	OR + CRLP + TT
Plot	Rif_HexpD_023_Figura_1	Rif_HexpD_027_Figura_1	Rif_HexpD_057_Figura_1	Rif_HexpD_057_Figura_2	Rif_HexpD_057_Figura_3	Rif_HexpD_061_Figura_1
Exp Measurements	Tau act fast/slow	Recovery	I-V	Tau VDI	SS VDI	SS activation SS inactivation I-V
Note		Patch clamp. T=37°C	Patch clamp.	Patch clamp.	Patch clamp.	Patch clamp. T=37°C
Concentration	(Ki+160;EGT A+10;Cai+7,5/11) (Cao+1,8) mM	(Ki+153;EGT A+10) (Ko+5,6;Nao+144;Cao+2,5) mM	(Ko+5,4;Cao+2;Nao+136) (EGTAi+10) mM	(Ko+5,4;Cao+2;Nao+136) (EGTAi+10) mM	(Ko+5,4;Cao+2;Nao+136) (EGTAi+10) mM	(Ki+153;EGT A+10) (Ko+5,4;Nao+140;Cao+2,5) mM

Currents	ICaL	ICaL	ICaL	ICaL	ICaL
Riferimento	HexpD_062	HexpD_079	HexpD_084	HexpD_088	HexpD_102
Autore	Magyar-Nanasi	O'Hara-Rudy	Pelzman-Koidl	Piacentini III-Houser	Schmidt-Gwathmey
Anno	2002	2011	1998	2003	1998
Titolo	Effects of thymol on calcium and potassium currents in canine and human ventricular cardiomyocytes	Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: model formulation and experimental validation	L-type calcium current in human ventricular myocytes at a physiological temperature from children with tetralogy of Fallot	Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes	Contribution of abnormal sarcoplasmic reticulum ATPase activity to systolic and diastolic dysfunction in human heart failure
Abstract	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12010783	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21637795	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9709403	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600875	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9799647
Models	GPB + TT + IW	OR	CRLP + TT + GPB	GB + IW	OR + CP + GB + TP
Plot	Rif_HexpD_062_Figura_1	Rif_HexpD_079_Figura_1	Rif_HexpD_084_Figura_1	Rif_HexpD_088_Figura_1	Rif_HexpD_102_Figura_1
Exp Measurements	Tau VDI	CDI vs VDI	tau VDI	I-V	SR Ca ²⁺ activity
Note	Patch clamp. T=37°C	T=37°C	Patch clamp. T=36-37°C	T=37°C	increase [Ca ²⁺]. T=37°C
Concentration	(Ki+148;EGTA+10) (Ko+5,4;Cao+2,5;Nao+140) mM	(EGTAi+10) (Cao+1) mM	(EGTA+11;Cai+1;Nai+10) (Nao+150;Cao+1,8) mM		(Ko+5,9;Cao+2,5;Nao+146) mM

INa

Currents	INa	INa	INa	INa	INa	INa
Riferimento	HexpD_039	HexpD_064	HexpD_073	HexpD_073	HexpD_073	HexpD_079
Autore	Irvine-Winslow	Makita-Kitabatake	Nagatomo-Makielski	Nagatomo-Makielski	Nagatomo-Makielski	O'Hara-Rudy
Anno	1999	2000	1998	1998	1998	2011
Titolo	Cardiac sodium channel Markov model with temperature dependence and recovery from inactivation	Cardiac Na(+) channel dysfunction in Brugada syndrome is aggravated by beta(1)-subunit	Temperature dependence of early and late currents in human cardiac wild-type and long Q-T DeltaKPQ Na+ channels	Temperature dependence of early and late currents in human cardiac wild-type and long Q-T DeltaKPQ Na+ channels	Temperature dependence of early and late currents in human cardiac wild-type and long Q-T DeltaKPQ Na+ channels	Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: model formulation and experimental validation
Abstract	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1096885	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618304	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9843800	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9843800	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9843800	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21637795
Models	IW		OR	GPB + TT + IW	GPB + TT + IW	OR
Plot	Rif_HexpD_039_Figura_1		Rif_HexpD_073_Figura_1	Rif_HexpD_073_Figura_2	Rif_HexpD_073_Figura_3	Rif_HexpD_079_Figura_4
Exp Measurements	Model	solo per confronto	time to peak > tau act	SS activation SS inactivation	tau inact fast/slow	SS activation SS inactivation I-V; tau inact fast/slow; tau recovery.
Note			Patch clamp. T=23-33°C.	HEK-293 cells with WT human INa channel + aggiustamen to temperatura Q10=2.79. Patch clamp. T=23-33°C.	HEK-293 cells with WT human INa channel + aggiustamen to temperatura Q10=2.79. Patch clamp. T=23-33°C.	T=37°C.
Concentrations			(Ko+4;Cao+1,8;Nao+140) (EGTAi+5) mM	(Ko+4;Cao+1,8;Nao+140) (EGTAi+5) mM	(Ko+4;Cao+1,8;Nao+140) (EGTAi+5) mM	(Ko+4,8,20;Cao+1,8;Nao+144) (Ki+150;EGTA+10)mM

Currents	INa	INa	INa	INa	INa	INa
Riferimento	HexpD_101	HexpD_101	HexpD_101	HexpD_101	HexpD_119	HexpD_122
Autore	Sakakibara-Wasserstrom	Sakakibara-Wasserstrom	Sakakibara-Wasserstrom	Sakakibara-Wasserstrom	Viswanathan-Balser	Wang-Georg
Anno	1993	1993	1993	1993	2001	2000
Titolo	Sodium current in isolated human ventricular myocytes	Gating-dependent mechanisms for flecainide action in SCN5A-linked arrhythmia syndromes	Enhanced Na(+) channel intermediate inactivation in Brugada syndrome			
Abstract	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8238418	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8238418	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8238418	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8238418	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11535580	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11029409
Models	OR + PB	OR + PB	OR + GPB	OR + GPB	TT	TT + IW
Plot	Rif_HexpD_101_Figura_1	Rif_HexpD_101_Figura_2	Rif_HexpD_101_Figura_3	Rif_HexpD_101_Figura_5	Rif_HexpD_119_Figura_1	Rif_HexpD_122_Figura_1
Exp Measurements	SS activation	SS inactivation	tau inact fast/slow	I-V	tau + confronto	tau + confronto
Note	Voltage clamp. 17°C > aggiustamen to temperatura Q10.	Voltage clamp. 17°C > aggiustamen to temperatura Q10.	Voltage clamp. 17°C > aggiustamen to temperatura Q10.	Effect of TTX. Voltage clamp. 17°C > aggiustamen to temperatura Q10.	cells transfected with DKPQ and 1795insD. T=21°C.	Patch clamp. T=22-32°C.
Concentration	(Nao+5;Cao +1,8) (Nai+2,8/+5) mM	(Nao+5;Cao +1,8) (Nai+2,8/+5) mM	(Nao+5;Cao +1,8) (Nai+2,8/+5) mM	(Nao+10) (Nai+2,8/+5) mM	(Nai+10;EGT A+10) (Ko+4;Nao+145;Cao+1,8) mM	(Nao+145;Ko +4;Cao+1,8) (Nai+10/+35; EGTI+10) mM

INaL

Currents	INaL	INaL	INaL	INaL	INaL
Riferimento	HexpD_065	HexpD_065	HexpD_065	HexpD_066	HexpD_079
Autore	Maltsev-Undrovinas	Maltsev-Undrovinas	Maltsev-Undrovinas	Maltsev-Undrovinas	O'Hara-Rudy
Anno	1998	1998	1998	2006	2011
Titolo	Novel, Ultraslow Inactivating Sodium Current in Human Ventricular Cardiomyocytes	Novel, Ultraslow Inactivating Sodium Current in Human Ventricular Cardiomyocytes	Novel, Ultraslow Inactivating Sodium Current in Human Ventricular Cardiomyocytes	A multi-modal composition of the late Na ⁺ current in human ventricular cardiomyocytes	Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: model formulation and experimental validation
Abstract	http://circ.ahajournals.org/content/98/2/3/2545.full	http://circ.ahajournals.org/content/98/2/3/2545.full	http://circ.ahajournals.org/content/98/2/3/2545.full	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16223473	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21637795
Models	OR	OR	OR	OR	OR
Plot	Rif_HexpD_065_Figura_1	Rif_HexpD_065_Figura_2	Rif_HexpD_065_Figura_3	Rif_HexpD_066_Figura_1	Rif_HexpD_079_Figura_4
Exp Measurements	I-V	SS activation	Recovery	Decay and increase in INaL amplitude as temperature increases.	SS activation SS inactivation I-V curve
Note	INa remaining after 200ms. T=22-24°C. Patch clamp.	INa remaining after 200ms. T=22-24°C. Patch clamp.	INa remaining after 200ms. T=22-24°C. Patch clamp.	Patch clamp. T=24-37°C.	T=37°C.
Concentrations		(EGTAi+10) (Nao+140; Cao+1,8) mM	(EGTAi+10) (Nao+140; Cao+1,8) mM	(Nai+290; Cai+1,8) (Nao+140; Cao+1,8) mM	(Ko+4,8,20; Cao+1,8; Nao+144) (Ki+150; EGT A+10)mM

INCX

Currents	IncX	IncX	IncX	IncX	IncX	IncX
Riferimento	HexpD_002	HexpD_079	HexpD_088	HexpD_109	HexpD_127	HexpD_127
Autore	Armoundas-O'Rourke	O'Hara-Rudy	Piacentini III-Houser	Su-Barry	Weber-Bers	Weber-Bers
Anno	2003	2011	2003	1999	2003	2003
Titolo	Role of sodium-calcium exchanger in modulating the action potential of ventricular myocytes from normal and failing hearts	Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: model formulation and experimental validation	Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes	Quantitation of Na/Ca exchanger function in single ventricular myocytes	Dynamic regulation of sodium/calcium exchange function in human heart failure	Dynamic regulation of sodium/calcium exchange function in human heart failure
Abstract	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12805237	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21637795	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600875	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10336850	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14557358	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14557358
Models	IW	OR	GB + IW	IW	OR + GB	OR + GB
Plot	Rif_HexpD_002_Figura_1	Rif_HexpD_079_Figura_5	Rif_HexpD_088_Figura_2	Rif_HexpD_109_Figura_1	Rif_HexpD_127_Figura_1	Rif_HexpD_127_Figura_2
Exp Measurements	EncX	Current	Current	Current	Current	Current
Note	T=37°C.	T=37°C	Cai dependence of IncX during caffeine application. T=37°C		T=37°C	T=37°C
Concentration	(Ki+139; Nai+5-to-15) (Ko+5; Nao+140; Cao+2) mM	(Nai+20; EGT A+20) (Nao+135; Cao+1)		(Nai+10/20; EGT A+14) (Nao+145; Cao+1) mM	(Nai+7,5) (Nao+150; Ko+5,4; Cao+1) mM	(Nai+7,5) (Nao+150; Ko+5,4; Cao+1) mM

Bibliografia

- **Amos G.J., Wettwer E., Metzger F., Li Q., Ravens U., Himmel H.M.**
Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes
J. Physiol 1996 Feb 15;491 (Pt 1):31-50.
- **Apkon J., Nerbonne J.M.**
Characterization of two distinct depolarization-activated K⁺ currents in isolated adult rat ventricular myocytes.
J Gen Physiol 1991. 97:973–1011.
- **Barry D.M., Nerbonne J.M.**
Myocardial potassium channels: electrophysiological and molecular diversity.
Annu Rev Physiol 1996. 58:363–394.
- **Bernus O. , Wilders R. , Zemlin C.W. , Verscelde H. , Panfilov A.V.**
A computationally efficient electrophysiological model of human ventricular cells.
Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002 Jun;282(6):H2296-308.
- **Bers D.M.**
Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force.
Second edition – August 2001.
- **Bers D.**
Cardiac excitation–contraction coupling.
Nature 2002. 415 (6868): 198–205.
- **Bianchi L. Driscott M.**
Heterologous expression of C. elegans ion channels in Xenopus oocytes.
WormBook. 2006 Aug 1:1-16. Review.
- **Cannell M.B. , Soeller C.**
Numerical analysis of ryanodine receptor activation by L-type channel activity in the cardiac muscle diad.
Biophys J. 1997 Jul;73(1):112-22.
- **Carmeliet E.**

Voltage and time-dependent block of the delayed K⁺ current in cardiac myocytes by dofetilide.

J Pharmacol Exp Ther 1992. 262:809–817.

- **Carmeliet E., Vereecke J.**

Cardiac Cellular Electrophysiology. Basic Science for the Cardiologist 9.

- **Carro J. , Rodríguez JF. , Laguna P. , Pueyo E.**

A human ventricular cell model for investigation of cardiac arrhythmias under hyperkalaemic conditions.

Philos Trans A Math Phys Eng Sci. 2011 Nov 13;369(1954):4205-32. doi: 10.1098/rsta.2011.0127.

- **Collier ML, Levesque PC, Kenyon JL, Hume JR.**

Unitary Cl⁻ channels activated by cytoplasmic Ca²⁺ in canine ventricular myocytes.

Circulation Research 1996 May;78(5):936-44.

- **Dhamoon A. S., Jalife J.**

The inward rectifier current (i_{kr1}) controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis

Heart Rhythm 2005;2:316-324.

- **Di Francesco D. , Noble D.**

A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes.

Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1985 Jan 10;307(1133):353-98.

- **Grandi E. , Pasqualini FS. , Bers DM.**

A novel computational model of the human ventricular action potential and Ca transient.

J Mol Cell Cardiol. 2010 Jan;48(1):112-21. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.09.019.

Epub 2009 Oct 14.

- **Gurdon JB., Lane CD., Woodland HR., Marbaix G.**

Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells.

Nature. 1971 Sep 17;233(5316):177-82.

- **OP. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, FJ. Sigworth**

Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches

Pflfigers Arch (1981)391:85-100.

- **Hedley PL., Jorgensen P., Schlamowitz S., Wangari R.**

The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update.

Human Mutation (2009) 30 (11): 1486–511.

- **Hille B.**

Ion Channels of Excitable Membranes 3rd ed. (Sinauer: Sunderland, MA) p. 151.

- **Hodgkin Al. , Huxley Af.**

Propagation of electrical signals along giant nerve fibers.

Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1952 Oct 16;140(899):177-83.

A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.

J Physiol. 1952 Aug;117(4):500-44.

The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo.

J Physiol. 1952 Apr;116(4):497-506.

The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo.

J Physiol. 1952 Apr;116(4):473-96.

Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo.

J Physiol. 1952 Apr;116(4):449-72.

Movement of sodium and potassium ions during nervous activity.

Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1952;17:43-52.

- **Hodgkin Al. , Katz B.**

The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid.

J Physiol. 1949 Mar 1;108(1):37-77.

- **Hund TJ. , Rudy Y.**

Rate dependence and regulation of action potential and calcium transient in a canine cardiac ventricular cell model.

Circulation. 2004 Nov 16;110(20):3168-74. Epub 2004 Oct 25.

- **Ibrahim M.,Gorelik J., Yacoub M.H., Terracciano M.C.**

The structure and function of cardiac t-tubules in health and disease.

Proc Biol Sci. 2011; 278:2714-2723.

- **Iyer V. , Mazhari R. , Winslow RL.**

A computational model of the human left-ventricular epicardial myocyte.

Biophys J. 2004 Sep;87(3):1507-25.

- **Jafri MS. , Rice JJ. , Winslow RL.**

Cardiac Ca²⁺ dynamics: the roles of ryanodine receptor adaptation and sarcoplasmic reticulum load.

Biophys J. 1998 Mar;74(3):1149-68.

Modeling gain and gradedness of Ca²⁺ release in the functional unit of the cardiac diadic space.

Biophys J. 1999 Oct;77(4):1871-84.

- **Jespersen T., Grunnet M., Olesen SP.**

The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function.

Physiology 2005 (Bethesda) **20** (6): 408–16.

- **Konarzewska H, Peeters GA, Sanguinetti MC.**

Repolarizing K⁺ currents in nonfailing human hearts. Similarities between right septal subendocardial and left subepicardial ventricular myocytes.

Circulation 1995 Sep 1;92(5):1179-87.

- **Kubo Y., Murata Y.**

Control of rectification and permeation by two distinct sites after the second transmembrane region in Kir2.1 K⁺ channel.

J Physiol. 2001 Mar 15;531(Pt 3):645-60.

- **Langer GA. , Peskoff A.**

Calcium in the cardiac diadic cleft. Implications for sodium-calcium exchange.

Am J Physiol 1999 Jan;276(1 Pt 2):H98-H106.

- **Li GR., Nattel S.**

Transmembrane I_{Ca} contributes to rate-dependent changes of action potentials in human ventricular myocytes.

Ann N Y Acad Sci. 1996 Apr 15;779:408-16.

- **Luo CH. , Rudy Y.**

A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes.

Circ Res. 1994 Jun;74(6):1071-96.

- **Marbán E.**

Cardiac channelopathies

Nature 2002 Jan 10;415(6868):213-8.

- **Marbán E, Yamagishi T, Tomaselli GF.**

Structure and function of voltage-gated sodium channels

The Journal of Physiology 1998;508,647-657

- **Medicinapertutti** (<http://medicinapertutti.altervista.org/>). Canali del sodio; canali del potassio.
- **Monfredi O, Dobrzynski H, Mondal T, Boyett MR, Morris GM.**

The anatomy and physiology of the sinoatrial node--a contemporary review.

Pacing Clin Electrophysiol. 2010 Nov;33(11):1392-406.

- **Näbauer M, Beuckelmann DJ, Erdmann E.**

Characteristics of transient outward current in human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure.

Circulation Research 1993; 73:386-394.

- **Nagatomo T., Makielski JC.**

Temperature dependence of early and late currents in human cardiac wild-type and long Q-T DeltaKPQ Na⁺ channels.

Am J Physiol 1998 Dec;275(6 Pt 2):H2016-24.

- **Niwa N., Nerbonne JM.**

Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current (I_{to}) expression and regulation.

Journal of Molecular and Cellular Cardiology (January 2010). 48 (1): 12-25.

- **Noble D.**

A modification of the Hodgkin—Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pacemaker potentials.

J Physiol. Feb 1962; 160(2): 317-352.

- **Noble D. , Varghese A. , Kohl P. , Noble P.**

Improved guinea-pig ventricular cell model incorporating a diadic space, I_{Kr} and I_{Ks},

and length- and tension-dependent processes.

Can J Cardiol. 1998 Jan;14(1):123-34.

- **Noble D., Tsien RW.**

Outward membrane currents activated in the plateau range of potentials in cardiac Purkinje fibres.

*J Physiol (Lond)*1969. 200:205–231.

- **Oudit GY., Kassiri Z., Sah R., Ramirez RJ., Zobel C., Backx PH.**

The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I_{to}) in normal and diseased myocardium.

J. Mol. Cell. Cardiol. (May 2001) 33 (5): 851–72.

- **O'Hara T. , Virág L. , Varró A. , Rudy Y.**

Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: model formulation and experimental validation.

PLoS Comput Biol. 2011 May;7(5):e1002061. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002061. Epub 2011 May 26.

- **Pandit SV. , Clark RB. , Giles WR. , Demir SS.**

A mathematical model of action potential heterogeneity in adult rat left ventricular myocytes.

Biophys J. 2001 Dec;81(6):3029-51.

- **Piacentino III, Houser.**

Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes.

Circ Res 92: 651–658 (2003).

- **Pubmed** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

- **Puglisi JL. , Bers DM.**

LabHEART: an interactive computer model of rabbit ventricular myocyte ion channels and Ca transport.

Am J Physiol Cell Physiol. 2001 Dec;281(6):C2049-60.

- **Priebe L. , Beuckelmann DJ.**

Simulation study of cellular electric properties in heart failure.

Circ Res. 1998 Jun 15;82(11):1206-23.

- **Rice JJ., Hunter WC. , Winslow RL.**

Comparison of putative cooperative mechanisms in cardiac muscle: length dependence

and dynamic responses.

Am J Physiol. 1999 May;276(5 Pt 2):H1734-54.

- **Sanguinetti MC., Jurkiewicz NK.**

Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents.

J Gen Physiol 1990. 96:195–215.

- **Sanguinetti MC., Tristani-Firouzi M.**

hERG potassium channels and cardiac arrhythmia.

Nature (2006) 440 (7083): 463–9.

Delayed and inward rectifier potassium channels.

In Cardiac electrophysiology: from cell to bed- side. 3rd edition. 79-86.

- **Stern M. , Fill M. ,Rios E. , Mejía-Alvarez R. , Kettlun C.**

Unitary Ca²⁺ current through cardiac ryanodine receptor channels under quasi-physiological ionic conditions.

J Gen Physiol. 1999 Feb;113(2):177-86.

- **Shannon TR. , Wang F. , Puglisi J. , Weber C. , Bers DM.**

A mathematical treatment of integrated Ca dynamics within the ventricular myocyte.

Biophys J. 2004 Nov;87(5):3351-71. Epub 2004 Sep 3.

- **Ten Tusscher KH. , Noble D. , Noble PJ. , Panfilov AV.**

A model for human ventricular tissue.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 Apr;286(4):H1573-89.Epub 2003 Dec 4.

- **Verkhatsky A., Krishtal O.A., Petersen O. H.**

From Galvani to patch clamp: the development of electrophysiology *European*

Journal of Physiology (2006) 453:233-247.

- **Wettwer E., Amos G., Gath J., Zerkowski HR., Reidemeister JC., Ravens U.**

Transient outward current in human and rat ventricular myocytes.

Cardiovascular Research (September 1993) 27 (9): 1662-1669.

- **Whalley D.W., Wendt D.J., Grant A.O.**

Basic concepts in cellular cardiac electrophysiology: part I: ion channels, membrane currents and action potential.

PACE 1995. 18:1556-1574.

- **Yu SP., Choi DW.**

Na⁺-Ca²⁺ exchange currents in cortical neurons: concomitant forward and reverse operation and effect of glutamate.

European Journal of Neuroscience 9 (6): 1273–81.

- **Yue DT, Marbán E.**

A novel cardiac potassium channel that is active and conductive at depolarized potentials.

Pflugers Arch. 1988 Dec;413(2):127-33.

- **Zeng J. , Rudy Y.**

Early afterdepolarizations in cardiac myocytes: mechanism and rate dependence.

Biophys Journal 1995; 68:949-64.

- **Zhou Z. , January CT.**

Properties of HERG channels stably expressed in HEK 293 cells studied at physiological temperature.

Biophys J. 1998 Jan;74(1):230-41.