

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
DIPARTIMENTO DI
INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E DELL'INFORMAZIONE
"GUGLIELMO MARCONI"

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

STUDIO DELLA MODULAZIONE DELLA CONTRATTILITÀ CARDIACA PER
IL TRATTAMENTO DELL'INSUFFICIENZA CARDIACA MEDIANTE
L'UTILIZZO DI MODELLI COMPUTAZIONALI DEL POTENZIALE
D'AZIONE

Elaborato in

Computational Cardiology

Relatore

Chiar.mo Prof. Stefano Severi

Correlatrice

Prof.ssa Chiara Bartolucci

Presentata da

Berzacola Anna

Anno Accademico 2024/2025

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
DIPARTIMENTO DI
INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E DELL'INFORMAZIONE
"GUGLIELMO MARCONI"

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

STUDIO DELLA MODULAZIONE DELLA CONTRATTILITÀ CARDIACA PER
IL TRATTAMENTO DELL'INSUFFICIENZA CARDIACA MEDIANTE
L'UTILIZZO DI MODELLI COMPUTAZIONALI DEL POTENZIALE
D'AZIONE

Elaborato in

Computational Cardiology

Relatore

Chiar.mo Prof. Stefano Severi

Correlatrice

Prof.ssa Chiara Bartolucci

Presentata da

Berzacola Anna

Anno Accademico 2024/2025

<u>INDICE</u>	pag.5
<u>INTRODUZIONE</u>	pag.7
<u>CAPITOLO 1</u>	
<u>FISIOLOGIA DEL POTENZIALE D'AZIONE DEL CUORE</u>	pag.9
1.1 Cuore	pag.9
1.2 Circolazione	pag.9
1.3 Cellule del cuore	pag.11
1.4 Elettrofisiologia cellulare	pag.12
1.5 Potenziale di membrana a riposo	pag.13
1.6 Potenziale d'azione	pag.15
1.7 Comportamento del calcio in una cellula cardiaca	pag.19
<u>CAPITOLO 2</u>	
<u>INSUFFICIENZE CARDIACHE</u>	pag.22
2.1 Fisiologia dell'insufficienza cardiaca	pag.22
2.2 Diverse definizioni di insufficienza cardiaca	pag.23
2.3 Trattamenti farmacologici	pag.24
2.4 Trattamenti non farmacologici	pag.25
<u>CAPITOLO 3</u>	
<u>CARDIAC CONTRACTILITY MODULATION (CCM)</u>	pag.26
3.1 La modulazione della contrattilità cardiaca	pag.26
<u>CAPITOLO 4</u>	
<u>METODI E RISULTATI OTTENUTI</u>	pag.32
4.1 Descrizione del protocollo Feaster	pag.32
4.2 Descrizione del modello Paci	pag.41
4.3 Nuovo codice per la stimolazione	pag.46

CAPITOLO 5

RISULTATI

pag.55

5.1 Potenziale d'azione

pag.55

5.2 Transiente del calcio

pag.58

5.3 Contrattilità Cardiaca (Forza)

pag.62

CAPITOLO 6

CONCLUSIONI

pag.65

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

pag.68

INTRODUZIONE

La Modulazione della Contrazione Cardiaca (CCM) rappresenta una nuova frontiera per il trattamento dello scompenso cardiaco.

Negli ultimi anni diverse tecnologie innovative hanno visto la luce, inizialmente testate su modelli animali e successivamente validate su ampie casistiche di pazienti affetti da scompenso cardiaco. Tra queste, la CCM si distingue per il suo approccio innovativo.

La CCM è una terapia cardiaca rivoluzionaria che mira a migliorare la contrattilità cardiaca mediante l'erogazione di un impulso elettrico di bassa intensità (impulso sottosoglia) nella regione del setto cardiaco, in prossimità delle vie di conduzione. Questo stimolo, applicato durante il periodo refrattario assoluto del ciclo cardiaco, non induce un'eccitazione diretta delle cellule, ma innesca una serie di modifiche a livello cellulare che determinano un aumento del calcio intracellulare e, di conseguenza, un potenziamento della contrazione cardiaca. L'effetto benefico si propaga progressivamente alle cellule circostanti, amplificando il miglioramento della funzione cardiaca.

Nello studio *Feaster et al.* [28], si è cercato di estendere i risultati precedentemente ottenuti da altri studi fatti in cardiomiociti ventricolari isolati di conigli adulti, ai cardiomiociti umani. Per fare ciò, sono stati utilizzati cardiomiociti derivati da cellule staminali pluripotenti indotte umane (hiPSC-CMs) per sviluppare un modello robusto che permettesse di valutare la CCM in vitro.

I risultati che sono riusciti ad ottenere dimostrano l'efficacia della CCM anche sui cardiomiociti umani, confermando il suo potenziale come nuova terapia per il trattamento dello scompenso cardiaco.

Grazie all'incremento della potenza computazionale, si apre la possibilità di integrare l'approccio in vitro con modelli *in silico* che permette a sua volta di esaminare e convalidare ipotesi esistenti, formulare nuove ipotesi e progettare esperimenti innovativi. Questa metodologia si configura come una strategia efficace, in grado di

ridurre sia i costi che i tempi associati agli esperimenti in laboratorio.

In particolare, nello studio condotto in questo lavoro ci si è avvalsi del modello computazionale di hiPSC-CM di tipo ventricolare sviluppato da *Paci et al.* [49] nel 2020. Attraverso questa simulazione, è stato possibile comprendere le modificazioni che si ottengono nel potenziale d'azione, ma anche nel transiente del calcio e nella concentrazione all'interno delle cellule, una volta che viene applicato lo stimolo della CCM.

L'integrazione di modelli *in vitro* e *in silico* rappresenta una nuova frontiera nella ricerca sulla CCM, con il potenziale di accelerare lo sviluppo di questa terapia innovativa e di renderla accessibile a un numero sempre maggiore di pazienti affetti da scompenso cardiaco.

Si può quindi dire che la Modulazione della Contrazione Cardiaca rappresenta una speranza concreta per il trattamento dello scompenso cardiaco, una condizione grave che colpisce milioni di persone in tutto il mondo.

CAPITOLO 1

FISIOLOGIA DEL POTENZIALE D'AZIONE DEL CUORE

1.1 Il cuore

Il cuore, situato nella parte inferiore del torace, è un organo muscolare cavo che svolge un ruolo fondamentale nella circolazione sanguigna. La sua funzione primaria è quella di pompare il sangue ricco di ossigeno e nutrienti a tutte le cellule del corpo, trasportando via le scorie metaboliche come l'anidride carbonica.

- **Composizione:** Il cuore è formato da un tessuto muscolare striato involontario, caratterizzato da contrazioni ritmiche e automatiche.
- **Strati:** La sua parete è composta da tre strati:
 - **Epicardio:** sottile membrana connettivale che riveste esternamente il cuore.
 - **Miocardio:** strato più spesso, costituito dalle fibre muscolari che generano la forza contrattile.
 - **Endocardio:** sottile strato interno formato da cellule endoteliali che favoriscono il flusso sanguigno.
- **Cavità:** Internamente, il cuore è diviso in quattro cavità: due atri (superiori) e due ventricoli (inferiori). Un setto muscolare separa le due metà, destra e sinistra, impedendo il reflusso del sangue.
- **Valvole cardiache:** Le valvole atrioventricolari (tricuspide e mitrale) regolano il flusso di sangue dagli atri ai ventricoli, mentre le valvole semilunari (polmonare e aortica) permettono al sangue di uscire dai ventricoli e dirigersi verso i polmoni o il resto del corpo.

1.2 Circolazione

Come si può vedere in Figura 1, il cuore funziona come una doppia pompa, azionata da impulsi elettrici che coordinano la contrazione delle sue cavità.

- Circolazione sistemica:

1. Il sangue ricco di ossigeno dai polmoni arriva all'atrio sinistro tramite la vena polmonare.
2. La contrazione dell'atrio sinistro spinge il sangue nel ventricolo sinistro.
3. Il ventricolo sinistro si contrae con forza, pompando il sangue ricco di ossigeno nell'aorta, la principale arteria del corpo.
4. L'aorta si ramifica in arterie sempre più piccole, distribuendo il sangue a tutti i tessuti e organi.
5. Dalle cellule, il sangue carico di anidride carbonica torna al cuore attraverso le vene.
6. Le vene confluiscono nella vena cava superiore e inferiore che riversano il sangue deossigenato nell'atrio destro.

- Circolazione polmonare:

1. Il sangue deossigenato dall'atrio destro passa nel ventricolo destro.
2. Il ventricolo destro pompa il sangue nei polmoni attraverso l'arteria polmonare.
3. Nei polmoni, il sangue cede anidride carbonica e si arricchisce di ossigeno.
4. Il sangue ossigenato torna al cuore attraverso le vene polmonari, completando il ciclo.

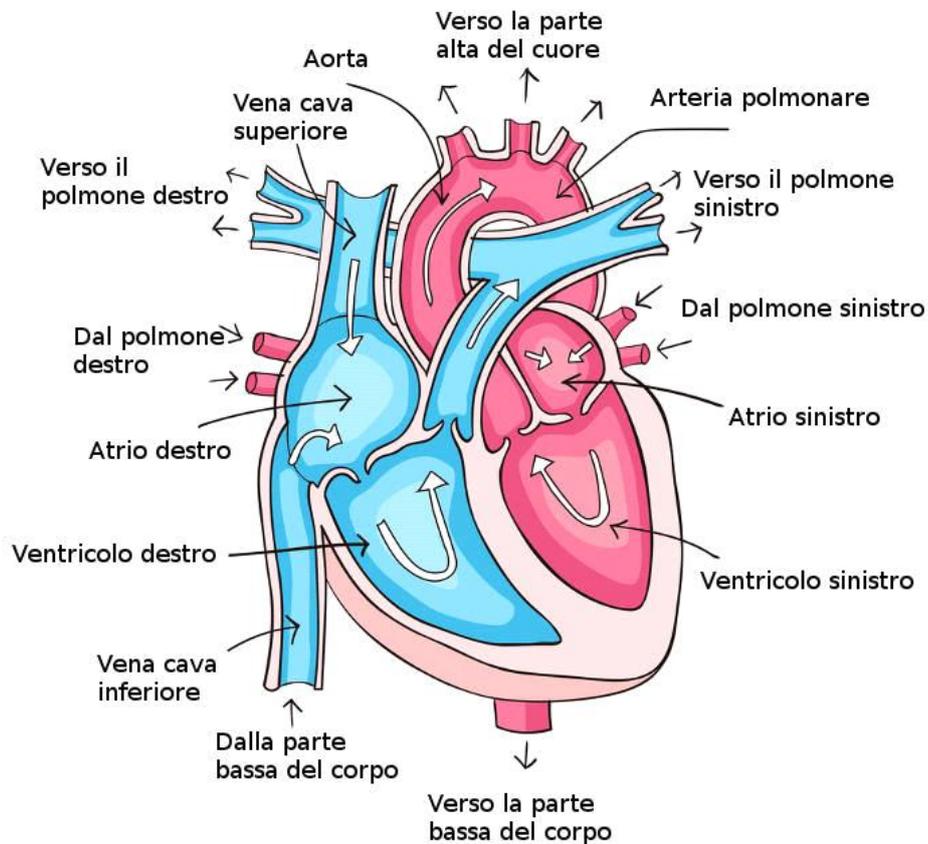


Figura 1: Il cuore umano. L'immagine rappresenta un diagramma del cuore umano, che mostra la sua struttura interna e il flusso del sangue. Immagine tratta da [17].

1.3 Cellule del cuore

Le cellule del cuore, i cardiomiociti, sono costituiti da una membrana cellulare, responsabile del passaggio degli ioni da cui dipende l'impulso elettrico.

La membrana è composta da acidi fosfolipidici che formano un doppio strato in modo da costituire una barriera selettivamente permeabile dall'ambiente extracellulare e di regolare il passaggio di molecole e ioni tra un ambiente e l'altro. Il passaggio degli ioni attraverso la membrana cellulare avviene principalmente grazie ad alcune proteine, dette canali ionici. Queste proteine sono "intrinseche" di membrana in quanto possiedono dei segmenti che attraversano la membrana cellulare. Ne segue che queste proteine sono in parte fuori

e in parte dentro la cellula. Tali proteine possono trovarsi in stato sempre aperto, come i canali per gli ioni K^+ , o generalmente chiuse. La permeabilità della membrana permette la formazione di uno spazio intra ed extra cellulare, dove la concentrazione di ioni è diversa e comporta una diversa carica elettrica ai margini della membrana stessa: il potenziale di membrana.

1.4 Elettrofisiologia cellulare

La contrazione dei cardiomiociti è autonoma ma deve essere coordinata a partire dal nodo seno-atriale che determina il ritmo cardiaco. Il nodo seno-atriale è una struttura posta nell'atrio destro, alla base della vena cava superiore. Le cellule di cui è costituito il nodo seno-atriale hanno proprietà auto eccitatorie quindi capaci di emettere ritmicamente impulsi elettrici a frequenza che, nella norma, si aggira fra i 60 e i 120 battiti per minuto. Questa capacità di generare potenziali d'azione deriva dal loro potenziale di membrana instabile che parte da -60 mV e lentamente sale verso il valore soglia. Ogni volta che il potenziale depolarizza la cellula, portandola al valore soglia, parte un potenziale d'azione del tipo che si può vedere in Figura 2.

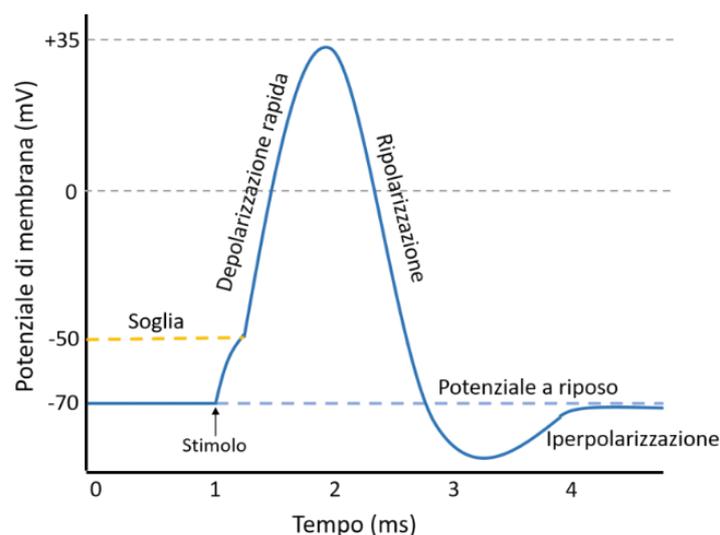


Figura 2: l'immagine mostra la forma d'onda di un potenziale d'azione del nodo seno atriale. Immagine tratta da [46].

Come si può vedere in figura 3, la corrente originata si trasmette agli atri attraverso i fasci internodali: il fascio internodale anteriore di Bachmann e il fascio internodale posteriore di Thorel. L'onda di depolarizzazione viene trasmessa al nodo atrioventricolare o nodo di Tawara.

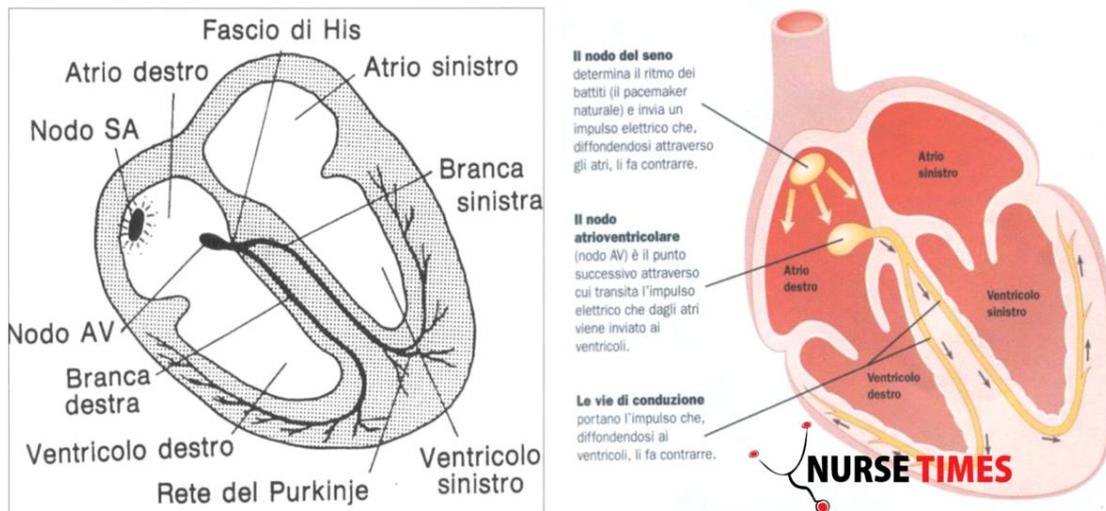


Figura 3: Immagine del cuore e del sistema di propagazione dell'impulso elettrico. Immagine tratta da [18].

1.5 Potenziale di membrana a riposo

Il potenziale di membrana è dato dalla concentrazione degli ioni di Sodio (Na^+), Potassio (K^+) e Calcio (Ca^{2+}) che si muovono attraverso la membrana cellulare.

Il valore della membrana a riposo è il valore osservabile in condizione normale sulla membrana: in questa condizione la membrana è definita "polarizzata".

La quantità di ioni che si diffonde attraverso la membrana dipende dalla permeabilità della membrana stessa rispetto a ogni diverso ione, dalla differente concentrazione di ioni e dalla differenza di potenziale elettrico ai capi della membrana. La concentrazione di potassio all'interno della cellula muscolare cardiaca, come nelle altre cellule dell'organismo, è superiore a quella extracellulare quindi il potassio tenderà a diffondersi maggiormente dall'interno

all'esterno, ma gli ioni di potassio, carichi positivamente, tendono ad andare verso l'interno della cellula, attratti dal potenziale negativo. L'equilibrio fra la forza chimica e quella elettrostatica si raggiunge quando le due forze saranno uguali, il potenziale di equilibrio può essere calcolato tramite l'equazione di Nernst:

$$E = \frac{RT}{nF} \ln \frac{[I]_i}{[I]_o}$$

Dove

R=8,314472 è la costante dei gas espressa in J/mol;

n= è il numero di elettroni trasferito;

F= 96485,309 C mol⁻¹ è la costante di Faraday;

T= è la temperatura assoluta in Kelvin;

[I]_i= è la concentrazione dello ione intracellulare;

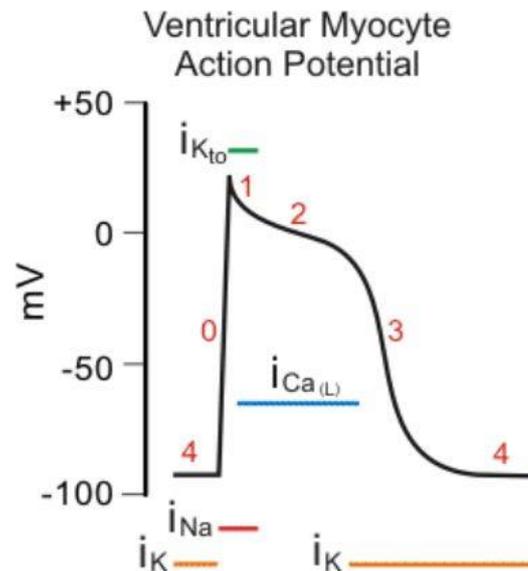
[I]_o= è la concentrazione dello ione extracellulare;

Quindi in condizioni di riposo si verifica una fuoriuscita libera di K⁺ che determina, per differenza di concentrazione interno/esterno, l'ingresso di ioni Cl⁻. Si verifica così un accumulo di carica negativa all'interno della cellula.

Questo valore rimane costante nel tempo finché la cellula riceve uno stimolo esterno che attiva il flusso di ioni.

In figura 4 si può vedere la forma d'onda di un potenziale d'azione ventricolare; in questa figura si può notare come la fase di plateau, che è quella parte del potenziale d'azione in cui la cellula rimane depolarizzata per un certo tempo, nei ventricoli questa fase è molto più lunga rispetto a quella del potenziale d'azione degli atri. Abbiamo questo allungamento perché questa fase permette al muscolo di contrarsi con più forza e per un tempo sufficiente a pompare il sangue in tutto il corpo. Negli atri, invece, la contrazione è più breve e non richiede una fase di plateau così pronunciata. Inoltre, in generale, il potenziale

d'azione ventricolare ha una durata maggiore rispetto a quello atriale, proprio per le diverse funzioni che i due tipi di camere



cardiache svolgono.

Figura 4: Fasi caratterizzanti il potenziale d'azione ventricolare. Immagine tratta da [63].

1.6 Il Potenziale d'Azione

Il Potenziale d'azione è una depolarizzazione transitoria della membrana della cellula con rilascio di calcio, Ca^{2+} . L'incremento di concentrazione intracellulare di Ca^{2+} innesca la contrazione muscolare in quanto il calcio si lega alla troponina C. Il legame col Ca^{2+} cambia la conformazione della molecola di tropomiosina e scopre il resto del sito di legame per la miosina, così che questa possa completare la propria flessione, come possiamo vedere in figura 5.

In figura 6 si vede l'andamento temporale dell'AP di un cardiomiocita ventricolare e il corrispettivo transiente di calcio intracellulare.

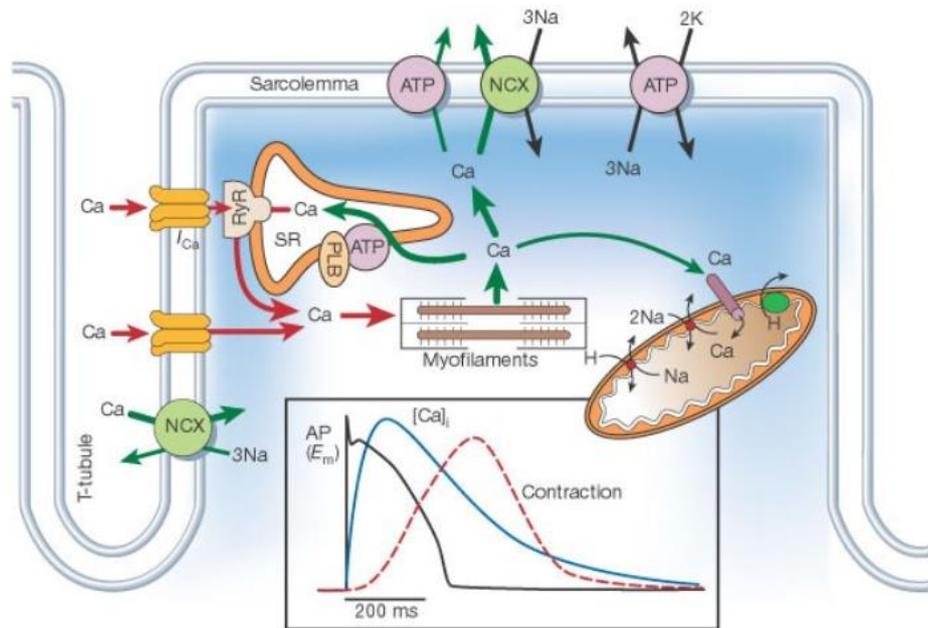


Figura 5: Schema dell'accoppiamento eccitazione/contrazione in un miocita. In basso sono mostrati gli andamenti temporali del potenziale d'azione, del transiente di Ca^{2+} e della contrazione. Immagine elaborata da [12].

I potenziali d'azione si verificano in altre cellule eccitabili ma quello delle cellule cardiache ha la caratteristica di durare un centinaio di millisecondi in più.

I potenziali d'azione si differenziano inoltre in base al distretto cardiaco, differenze che riflettono le specifiche e diverse funzioni le quali sono riconducibili alle correnti che causano la loro generazione e la cui specificità dipende dai differenti canali ionici.

Si hanno conseguentemente due tipi di potenziale d'azione cardiaci (Figura 7):

1. a risposta rapida, localizzata nella muscolatura atriale e ventricolare, nel fascio di His e nelle fibre del Purkinje;
2. a risposta lenta, specifica delle cellule del nodo seno atriale e del nodo atrio ventricolare.

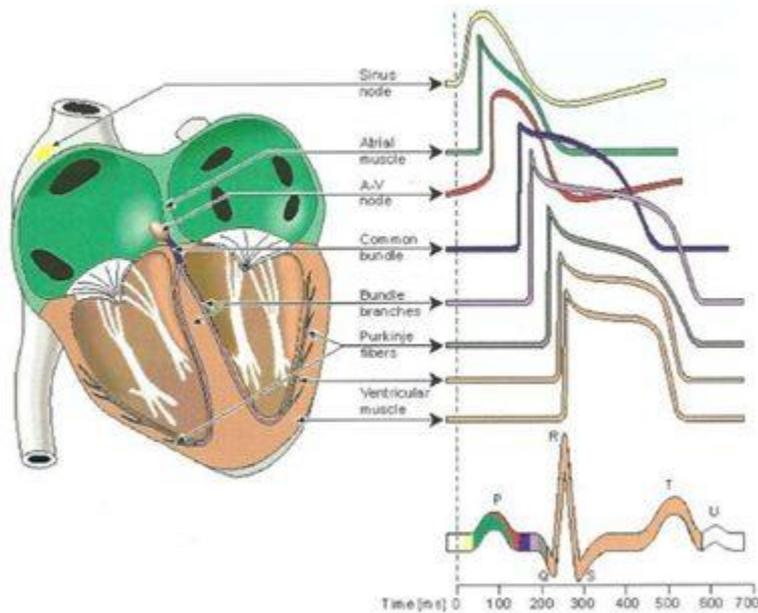


Figura 6: Rappresentazione del potenziale d'azione per il tessuto cardiaco nelle varie regioni del cuore. Immagine elaborata da [22].

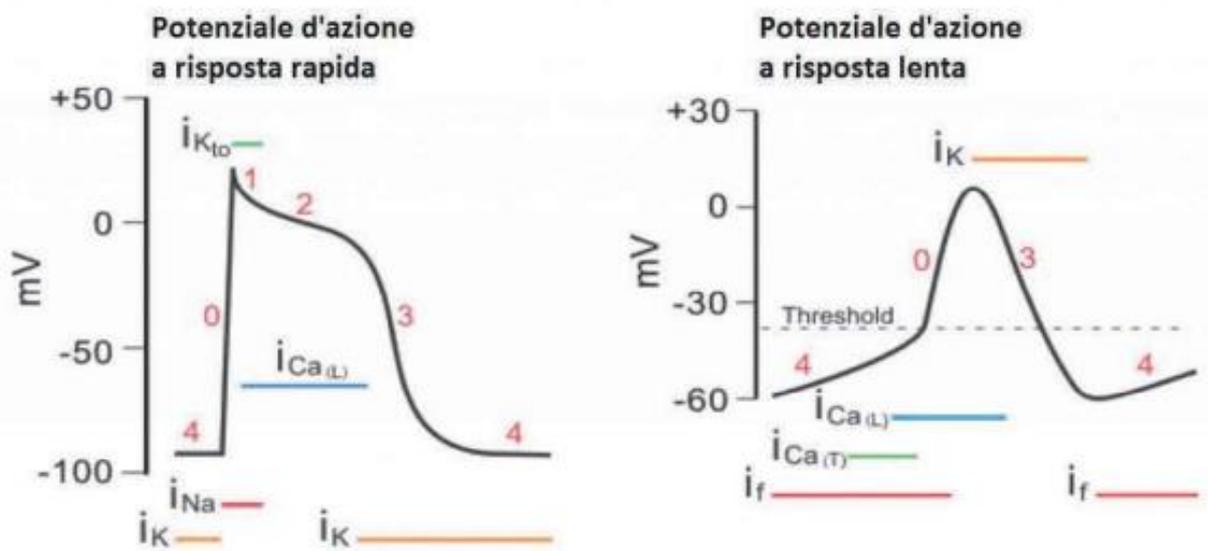


Figura 7: Rappresentazione schematica dei due tipi di potenziale d'azione cardiaci che evidenzia le differenti correnti ioniche coinvolte. Immagine elaborata da [9].

Il potenziale d'azione dei cardiomiociti a risposta rapida può essere sintetizzato in 5 fasi:

- Fase 0: Fase di depolarizzazione rapida dovuta all'ingresso di ioni Na^+ ;

- Fase 1: Fase di ripolarizzazione transiente dovuta a una corrente transitoria in uscita I_{to} ;
- Fase 2: Si verifica il plateau caratteristico del PA cardiaco associato allo ione calcio responsabile del prolungato potenziale di azione cardiaco;
- Fase 3: Ripolarizzazione, che riporta il potenziale di membrana al suo valore di riposo originario;
- Fase 4: Fase di riposo con ripristino delle concentrazioni ioniche.

La fase 0 di depolarizzazione rapida è dovuta sostanzialmente all'entrata rapida di ioni di sodio. Si verifica quando il potenziale di membrana dal valore di riposo di -90mV passa al valore di $-65/-70\text{mV}$ che è il potenziale di apertura dei canali di Na^+ voltaggio dipendenti rapidi. Con l'apertura di alcuni di questi canali si ha l'ingresso in cellula di ioni di sodio (corrente I_{Na}) che rende il potenziale meno negativo, così che nuovi canali per il sodio voltaggio dipendenti si aprono continuamente. Dopo l'apertura di un numero sufficiente di canali il fenomeno diventa autocatalitico con il conseguente ingresso pesante di ioni Na^+ . L'ingresso di Na^+ rende l'interno della cellula positivo e l'esterno negativo con conseguente inversione della polarità di membrana che comincia a opporsi all'ingresso di ioni Na^+ . Tale flusso si arresta quando il gradiente chimico diretto verso l'interno è superiore al gradiente elettrostatico diretto verso l'esterno, i canali rapidi per il sodio si inattivano e la conduttanza torna ai valori di riposo fino a quando la cellula non si è almeno parzialmente ripolarizzata.

La fase 1 di ripolarizzazione precoce è una breve ripolarizzazione parziale dovuta sia all'inattivazione dei canali rapidi di sodio, che all'apertura dei canali di potassio, che consentono una corrente transitoria in uscita chiamata I_{to} . L'attivazione dei canali del potassio comporta una breve fuoriuscita di questi ioni dovuta alla maggiore concentrazione interna del potassio.

La fase 2 è la fase di plateau, tipica delle cellule miocardiche. Si ha il plateau quando l'ingresso di ioni calcio è controbilanciata dalla fuoriuscita di una uguale quantità di ioni potassio. Questa fase è quindi responsabile della durata del PA. In questa fase la corrente è definita lenta a causa dei particolari canali ionici che la regolano i quali hanno periodi di attivazione, inattivazione e recupero più lenti del normale. Essi si attivano durante la fase 0, causando l'aumento della conduttanza della membrana al calcio e favoriscono l'entrata di ioni, anche grazie al gradiente chimico che ne facilita l'ingresso nella cellula. Essendo in presenza di potenziali più positivi, gli ioni K^+ presenti in ambiente intracellulare, vengono spinti al contrario fuori dal cardiomiocita.

La fase 3 di ripolarizzazione finale avviene quando i canali calcio si chiudono ma continua la fuoriuscita di K^+ , in questo modo l'interno della cellula diventa man mano negativo, mentre l'esterno diviene positivo.

L'efflusso di ioni di potassio fuori dalla cellula con il concomitante arresto della corrente di calcio in entrata, provoca il ritorno del potenziale di membrana a valori molto negativi. Questo cambiamento è favorito dal parallelo aumento della conduttanza della cellula al potassio che è voltaggio-dipendente, ossia più il valore del potenziale diventa negativo, più essa aumenta, facilitando la fuoriuscita di potassio ed il ritorno del potenziale di membrana ai valori negativi di riposo.

La fase 4 è la fase in cui avviene il ripristino delle concentrazioni ioniche ai valori di equilibrio elettrochimico del K^+ di riposo. Nei miociti a risposta lenta il potenziale d'azione è privo della fase 1 e nella fase 4 la depolarizzazione diastolica è lenta.

1.7 Comportamento del Calcio in una cellula cardiaca

La funzione contrattile del cardiomiocita è garantita dalla concentrazione intracellulare di calcio attraverso l'accoppiamento di eccitazione e contrazione. Quando il potenziale d'azione proveniente da una cellula si propaga nella membrana di una cellula a riposo

adiacente, si aprono i canali voltaggio dipendenti per il calcio presenti nel sistema T di tubuli trasversali, detti canali L-type.

Questi canali sono definiti L-Type, ossia canali lenti, perché i meccanismi di attivazione, inattivazione e recupero (quindi parliamo dell'uscita dallo stato di inattivazione ed il conseguente recupero della possibilità di attivarsi a fronte di uno stimolo elettrico adeguato) sono più lenti rispetto ai canali T-type. La lentezza dei meccanismi nei canali L-type rappresenta un fattore determinante della corrente I_{CaL} .

All'apertura di questi canali, il calcio viene rilasciato in un compartimento ristretto chiamato spazio diadico, caratterizzato da una stretta vicinanza tra il sarcolemma e il reticolo sarcoplasmatico. Nello spazio diadico il calcio si lega ai recettori della Rianodina, che sono particolari molecole presenti nella membrana del reticolo sarcoplasmatico. Questo legame innesca un meccanismo, detto rilascio di calcio indotto dal calcio stesso (Calcium-Induced Calcium Release, CICR), il quale consiste in un ulteriore rilascio di calcio che dalle cisterne terminali del reticolo sarcoplasmatico, dove è immagazzinato, si dirige verso il citoplasma.

Il calcio rilasciato dal reticolo sarcoplasmatico è molto più concentrato rispetto a quello entrato nello spazio diadico tramite i canali L-type.

Il calcio agisce nell'interazione di actina-miosina. L'actina e la miosina sono due proteine delle cellule muscolari, l'actina è costituita da filamenti sottili mentre la miosina da filamenti spessi. Il calcio rilasciato si lega alla subunità della troponina, una proteina che in condizioni di riposo della cellula blocca lo scorrimento delle fibre muscolari. Il legame con il calcio rimuove il blocco e permette alle fibre di scorrere. Scorrendo una sull'altra l'actina e la miosina causano l'accorciamento del sarcomero con riaccumulo di calcio all'interno del reticolo sarcoplasmatico mediante trasporto attivo ad opera della pompa Ca^{2+} -ATPasi. Il calcio quindi si diffonde nelle cisterne finché la concentrazione all'esterno non

si è sufficientemente abbassata con conseguente cessazione dell'interazione fra actina e miosina e il rilassamento del muscolo. Nel citoplasma però vi è ancora calcio in eccesso che viene estromesso dalla cellula mediante particolari pompe, tra cui la pompa $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ e la pompa $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPasi}$, mentre la concentrazione di sodio viene ripristinata tramite la pompa $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPasi}$. Ora si hanno le medesime concentrazioni ioniche iniziali fino all'arrivo di un nuovo potenziale d'azione che innesca un altro ciclo.

CAPITOLO 2

INSUFFICIENZE CARDIACHE

2.1 Fisiologia dell'insufficienza cardiaca (IC)

Si definisce insufficienza cardiaca una condizione in cui la gittata cardiaca non è sufficiente a soddisfare i bisogni dell'organismo.

L'insufficienza cardiaca, anche chiamata *Heart Failure* (HF), è quindi una patologia che si manifesta quando il cuore non riesce più a fornire una adeguata quantità di sangue all'organismo per soddisfare le normali esigenze.

L'insufficienza cardiaca si stima colpisca circa 26 milioni di persone in tutto il mondo e circa 1 milione di persone solo in Italia (circa 1.7% della popolazione) con una stima che tende ad aumentare considerevolmente in relazione al maggior invecchiamento della popolazione. Infatti la prevalenza della malattia aumenta di circa il 2% ogni decade di età sino a raggiungere il 10% nei pazienti over 70.

Diverse sono le cause della comparsa di questo problema, in quanto lo stesso si può verificare come conseguenza di un evento improvviso ma può anche svilupparsi in modo lento e graduale nel soggetto affetto. Si individuano solitamente come cause:

- difetti strutturali cardiaci quali difetti congeniti o malattie vascolari;
- anomalie del ritmo, per esempio la frequenza cardiaca persistentemente elevata;
- elevate richieste metaboliche derivanti per esempio dalla tiretossicosi.

Certamente la patologia viene scatenata dall'indebolimento del muscolo cardiaco che porta ad una ridotta forza contrattile. Questa minore contrattilità del muscolo ha come prima conseguenza una riduzione del volume di eiezione ventricolare (quindi della gittata sistolica) che causa ulteriormente una carenza di ossigeno e nutrienti

nei tessuti periferici (il cuore non riesce a pompare il sangue con una potenza tale da soddisfare il fabbisogno fisiologico di questi tessuti). Sinteticamente si può differenziare l'insufficienza cardiaca come:

- Con frazione di eiezione ridotta o scompenso cardiaco sistolico
- Con frazione di eiezione preservata o eiezione conservata o scompenso cardiaco diastolico
- Con frazione di eiezione lievemente ridotta
- Insufficienza ventricolare sinistra
- Insufficienza del ventricolo destro

Fortunatamente il corpo umano è in grado di mettere in atto dei meccanismi di compensazione per mantenere la propria funzionalità, i quali permettono che, per un certo periodo, la patologia rimanga asintomatica; questi compensi consistono in un adattamento delle fibrocellule miocardiche.

La condizione limite dell'insufficienza cardiaca, oltre la quale bisogna intervenire, si ha in caso di shock cardiogeno causato da un grave malfunzionamento della pompa: questa condizione può rappresentare sia lo stato finale di uno scompenso cardiaco in repentino peggioramento ma anche la manifestazione clinica di un infarto del miocardio.

Ad oggi lo shock cardiogeno rappresenta la più frequente causa di decesso nei pazienti affetti da infarto miocardico acuto.

Per i medici spesso combattere l'insufficienza cardiaca significa, in primo luogo, cercare di frenare l'avanzamento dei danni cardiaci, in secondo luogo, provare a ristabilire le condizioni di salute migliori grazie a terapie attive o dispositivi impiantabili.

2.2 Diverse definizioni di insufficienza cardiaca

Un' insufficienza cardiaca può essere di vario tipo:

- Cronica: si ha a seguito di un'azione continuativa di una patologia che agisce sul cuore e va a compromettere la funzionalità della pompa in modo graduale (non è completamente curabile ma è possibile alleviare i sintomi);
- Acuta: si ha a seguito di un aggravamento improvviso della condizione, solitamente a seguito di una congestione polmonare o periferica;
- Congestiva: situazione avanzata di insufficienza cardiaca dove si verifica un accumulo di fluidi nel cuore;
- Decompensata: è una condizione grave in cui il cuore prova a correggere automaticamente uno scompenso nel flusso cardiaco fino al punto di perdere la capacità di compensarlo, smettendo di pompare sangue in maniera corretta;
- Sistolica/diastolica: indica la fase predominante dove le pompe non funzionano correttamente (indica quindi se il difetto è legato all'eiezione o al riempimento)
- Destra/sinistra: indica quale ventricolo riguarda il danneggiamento (il difetto nel ventricolo sinistro è il più comune, quello nel ventricolo destro il più raro).

2.3 Trattamenti farmacologici

Per andare a trattare le insufficienze cardiache la medicina ha sviluppato trattamenti farmacologici tramite:

- ACE-inibitori e bloccanti del recettore per l'angiotensina II: utilizzati per un'interferenza diretta con il sistema reina-angiotensina-aldosterone vanno a diminuire il post - carico;
- Beta-bloccanti: antagonizzano gli effetti delle catecolamine, riducono la frequenza cardiaca e possono ripristinare la normale sensibilità del miocardio alla stimolazione simpatica; inizialmente somministrati con dosi molto basse possono venire gradualmente aumentate;
- Anti-aldosteronici: interferiscono con gli effetti dell'aldosterone;

- Diuretici: diminuiscono la congestione venosa; i vasodilatatori favoriscono il lavoro del ventricolo sinistro diminuendo il post - carico mentre il nersiride diminuisce il pre - carico stimolando la diuresi e il post - carico in conseguenza all'effetto di vaso dilatatore;
- Digossina: interferisce con la pompa sodio - potassio della cellula cardiaca aumentandone la contrattilità.

2.4 Trattamenti non farmacologici

Esercizio fisico: migliora il flusso periferico producendo maggiore tolleranza allo sforzo;

Terapia di re - sincronizzazione mediante pacemaker: in caso di un marcato difetto di conduzione intra - ventricolare va a migliorare l'efficienza contrattile del ventricolo sinistro.

CAPITOLO 3

CCM (CARDIAC CONTRACTILITY MODULATION)

3.1 La modulazione della contrattilità cardiaca

La modulazione della contrattilità cardiaca (CCM) è un nuovo trattamento per l'insufficienza cardiaca.

La CCM ha lo scopo di facilitare la contrattilità cardiaca tramite l'erogazione di una quantità minima di energia in modo tale da innescare le modifiche cellulari atte a far aumentare il calcio intracellulare al fine di assicurare contrazioni più efficaci che si propagano progressivamente alle cellule circostanti. Si basa su impulsi non eccitatori ad alto voltaggio erogati durante il periodo refrattario assoluto della contrazione cardiaca, cioè quando nessuno stimolo può provocare contrazioni o aritmie, così da non interferire con il normale ritmo cardiaco o la propagazione dei potenziali.

L'erogazione degli impulsi avviene per conto di un device impiantato nel paziente a livello della regione sottoclaveare (Figura 8) e collegato al cuore tramite elettrocatereteri responsabili dell'invio degli impulsi elettrici ad alta intensità. Tali impulsi sono erogati durante cicli di 1 ora 7 volte al giorno intervallati ciascuno da pause di 2-3 ore.

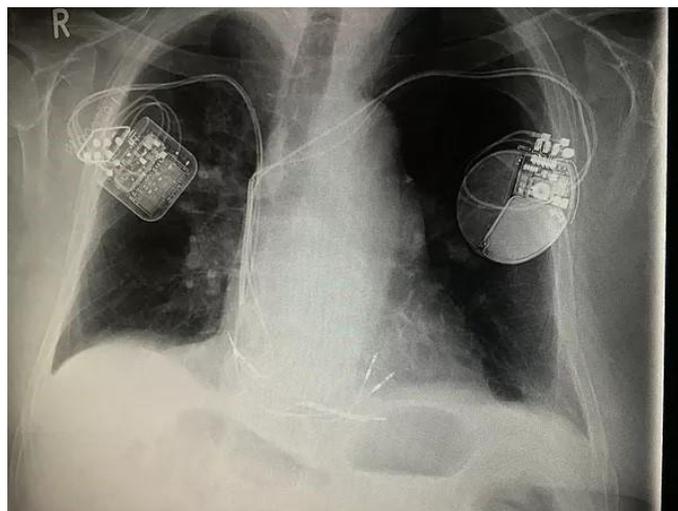


Figura 8: In questa radiografia si possono osservare due dispositivi impiantabili, uno per ogni lato del torace, nella parte superiore sotto la clavicola. Immagine tratta da [67].

Numerosi studi clinici hanno validato l'impiego del CCM nei pazienti con scompenso cardiaco a frazione di eiezione ventricolare sinistra 25-45% e QRS stretto tra cui:

- Studio PILOT del 2006 [43] ha rappresentato un primo passo nell'esplorazione dell'efficacia della terapia CCM in pazienti con insufficienza cardiaca grave. Questo trial clinico randomizzato, condotto su 49 pazienti, ha suggerito un potenziale ruolo della CCM nel ridurre il rischio di ricovero ospedaliero. Tuttavia, la dimensione relativamente piccola del campione e le caratteristiche specifiche della popolazione studiata impongono cautela nell'estendere questi risultati ad altri contesti clinici.
- Studio FIX-HF-4 [2] condotto nel 2008 su 164 pazienti con cuore debole (frazione di eiezione < 35%), ha mostrato che un nuovo trattamento (CCM) ha migliorato la capacità di svolgere attività fisica in questi pazienti. I partecipanti allo studio sono stati trattati con CCM per 3 mesi e poi per altri 3 mesi senza trattamento, per valutarne l'effetto.
- Studio FIX-HF-5 [3] condotto nel 2011, ha confrontato due gruppi di pazienti con insufficienza cardiaca grave: un gruppo ha ricevuto un nuovo trattamento (CCM) in aggiunta alle terapie standard, mentre l'altro ha ricevuto solo le terapie standard. I risultati hanno mostrato che nei pazienti con una forma intermedia di insufficienza cardiaca (frazione di eiezione tra 25 e 45%), il trattamento CCM ha ridotto del 50% il rischio di morte per cause cardiache.
- Studio CCM-REG [14] condotto nel 2019, ha seguito per tre anni 140 pazienti con una forma intermedia di insufficienza cardiaca ($25\% \leq$ frazione di eiezione ventricolo sinistro (LVEF) $\leq 45\%$) trattati con una terapia specifica (CCM REG 25-45). I risultati hanno mostrato una riduzione del 75% dei ricoveri ospedalieri rispetto a quanto previsto da un modello matematico. Per confermare questi risultati, i ricercatori hanno confrontato

questi pazienti con altri che non avevano ricevuto il trattamento.

- Nel 2021 è stato pubblicato un ulteriore studio prospettico sul CCM-REG compiuto per valutare gli effetti a lungo termine della CCM fornita dal sistema Optimizer Smart sulla frazione di eiezione ventricolare sinistra in termini di qualità della vita, sulla mortalità, sull'insufficienza cardiaca e sui ricoveri. Lo studio è stato effettuato su 503 pazienti provenienti da 51 centri europei con risultati migliori delle aspettative. Come si può vedere da figura 9 la terapia CCM-REG ha dimostrato di migliorare significativamente la qualità di vita dei pazienti con insufficienza cardiaca. Inoltre, si è osservato un aumento della funzione cardiaca, misurata attraverso la FEVS. Questi benefici si sono mantenuti stabili nel tempo, a 24 mesi dall'inizio del trattamento.

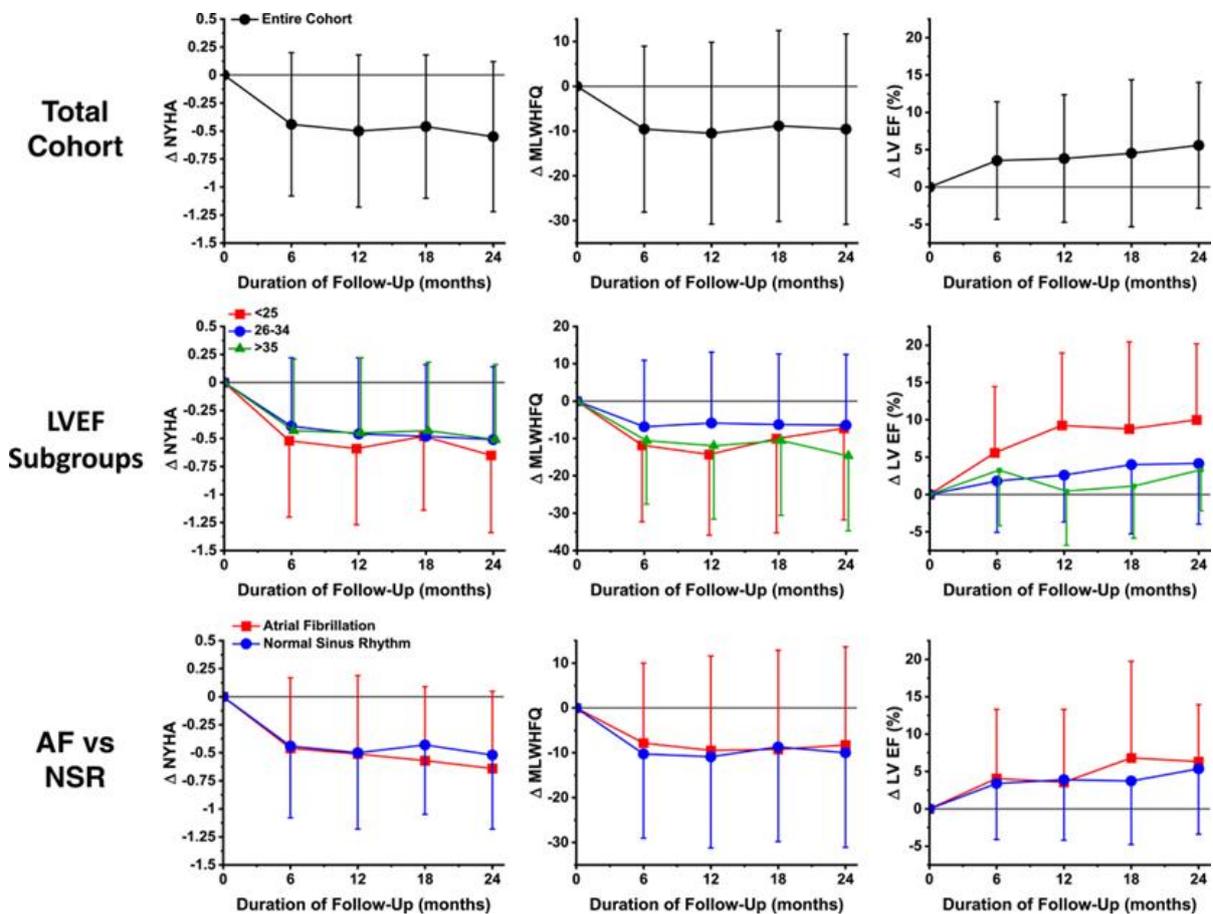


Figura 9: Variazione delle misure di efficacia in funzione della durata del follow-up in mesi. Il set di grafici "Total Cohort" mostra questi risultati per il cohort totale, mentre il set centrale di grafici fornisce i risultati per i sottogruppi di LVEF. Nel set inferiore di grafici sono mostrati i risultati per i sottogruppi con fibrillazione atriale (FA) e ritmo sinusale normale (RSN). Immagine tratta da [42].

Come si può vedere da figura 10, l'analisi della sopravvivenza ha dimostrato che i pazienti trattati con terapia CCM hanno presentato una sopravvivenza significativamente superiore rispetto a quella prevista dal modello MAGGIC, sia a breve che a lungo termine (a 1 e a 3 anni dall'inizio della terapia CCM). Questo beneficio è stato osservato nell'intero campione di pazienti, ad eccezione del sottogruppo con frazione di eiezione del ventricolo sinistro (FEVS) particolarmente ridotta. Il modello MAGGIC è uno strumento statistico che, sulla base di caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti, stima la probabilità di sopravvivenza a lungo termine in pazienti con scompenso cardiaco. In altre parole, il MAGGIC funge da "punto di riferimento" per valutare l'efficacia di nuove terapie, come nel caso della CCM, che mirano a migliorare la prognosi di questi pazienti.

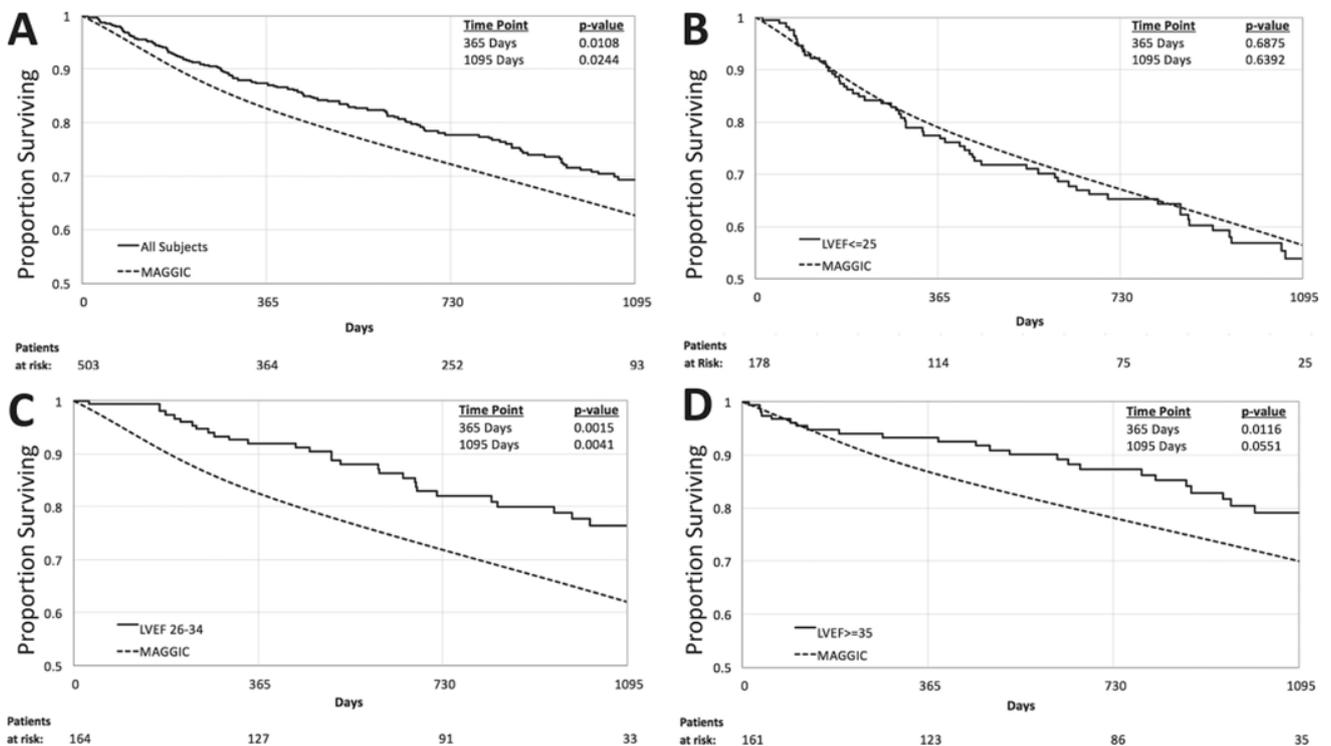
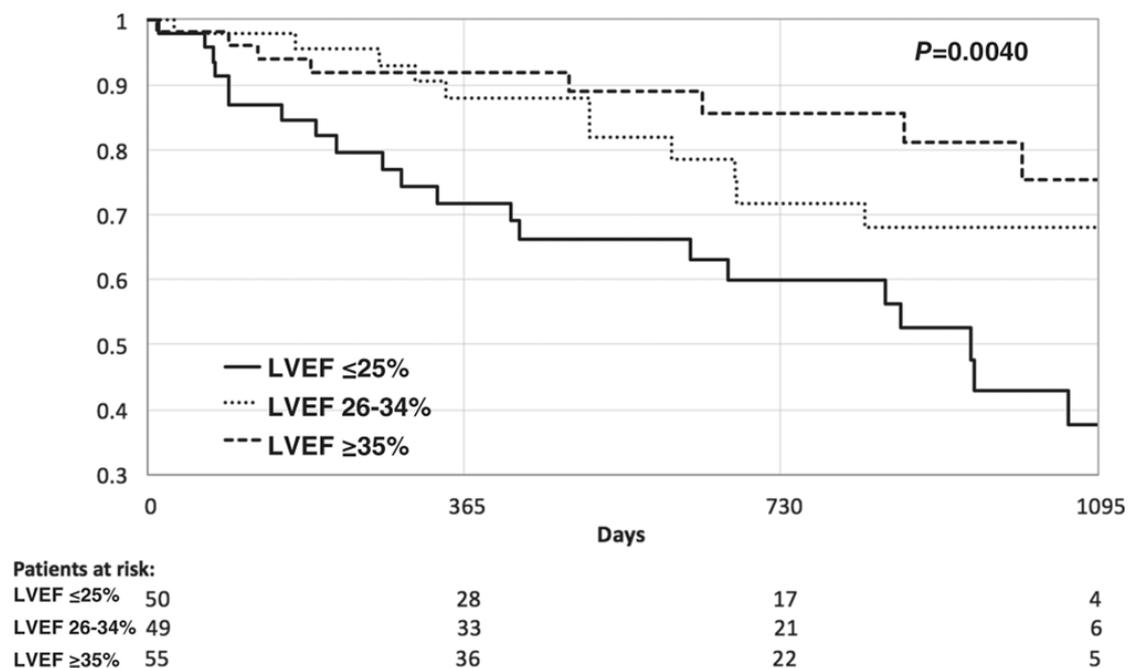


Figura 10: Curve di sopravvivenza che confrontano i dati osservati con le previsioni

del modello MAGGIC per l'intero campione di pazienti e per diversi gruppi di frazione di eiezione del ventricolo sinistro (FEVS). Il grafico mostra la proporzione di pazienti sopravvissuti durante un periodo di follow-up di 3 anni. I risultati indicano un miglioramento significativo della sopravvivenza rispetto alle previsioni del modello MAGGIC nella maggior parte dei gruppi di pazienti. I pazienti a rischio in ciascun intervallo di tempo sono mostrati nella parte inferiore di ciascun grafico. I valori forniti nell'angolo in alto a destra di ogni singolo grafico dimostrano che la sopravvivenza osservata è stata statisticamente migliore della sopravvivenza prevista dal punteggio di rischio MAGGIC per la coorte totale (A), il gruppo LVEF 26-34% (C) e LVEF Gruppo $\geq 35\%$ (D). Non è stata riscontrata alcuna differenza tra la sopravvivenza osservata e quella prevista nel gruppo LVEF $\leq 25\%$ (B). Immagine tratta da [42].

Come evidenziato nella Figura 11, l'intervento terapeutico ha determinato un miglioramento significativo della sopravvivenza rispetto alle aspettative, in particolare nei pazienti con una frazione di eiezione del ventricolo sinistro superiore.



- *Figura 11: Curve di sopravvivenza secondo Kaplan-Meier per i pazienti con fibrillazione atriale, suddivisi in tre gruppi in base alla frazione di eiezione del ventricolo sinistro (FEVS). I risultati indicano una stretta associazione tra la sopravvivenza e la FEVS in questa popolazione di pazienti. Immagine tratta da [42]. Nel 2022 è stato pubblicato uno studio che mirava a confrontare gli effetti della frazione di eiezione più bassa e più alta sugli esiti a lungo termine nella terapia CCM.*

Sono stati campionati 172 pazienti i cui dati di follow up sono stati raccolti fino a 5 anni dopo l'impianto con il risultato di poter concludere che il recupero sistolico biventricolare a lungo termine nella terapia CCM poteva essere migliore per valori di frazione di eiezione preimpiantato $\leq 30\%$.

CAPITOLO 4

METODI E RISULTATI OTTENUTI

4.1 Descrizione del protocollo Feaster

Nello studio *Feaster et al.* [28] sono stati usati dei cardiomiociti umani derivati da cellule staminali pluripotenti indotte umane (hiPSC - CMs), tutti derivanti dalla stessa linea hiPSC, per ottenere una valutazione della modulazione della contrattilità cardiaca, o CCM, in vitro tramite un modello.

Il protocollo Feaster si distingue per le sue caratteristiche innovative che lo rendono uno strumento prezioso per la ricerca cardiovascolare:

1. Cardiomiociti derivati da iPSC (hiPSC-CMs): al centro del modello troviamo le hiPSC-CMs, cellule staminali pluripotenti indotte a differenziarsi in cardiomiociti. Questa scelta offre notevoli vantaggi rispetto ai cardiomiociti primari:

- **Disponibilità illimitata:** le hiPSC-CMs possono essere prodotti in laboratorio in quantità illimitate, eliminando le limitazioni legate alla disponibilità di tessuto cardiaco prelevato da donatori.
- **Standardizzazione genetica:** la natura pluripotente delle hiPSC permette di ottenere cardiomiociti con un background genetico uniforme, facilitando la riproducibilità degli studi e la comparazione dei risultati.

2. Valutazione della contrattilità cardiaca (CCM): il protocollo Feaster è specificamente progettato per misurare la risposta contrattile del cuore a vari stimoli e farmaci. Questa capacità lo rende ideale per:

- **Valutare l'effetto di potenziali modulatori della contrazione cardiaca:** il modello può essere utilizzato per testare l'effetto di nuovi farmaci o molecole sulla funzione cardiaca, accelerando

il processo di sviluppo di nuove terapie per le malattie cardiache.

- Studiare i meccanismi di base della contrazione cardiaca: la precisa misurazione della CCM permette di approfondire la comprensione dei meccanismi che regolano la contrazione del cuore a livello cellulare e molecolare.

3. Piattaforma in vitro: essendo un modello in vitro offre numerosi vantaggi rispetto agli studi su animali o clinici:

- Ambiente controllato: le condizioni sperimentali possono essere accuratamente controllate e standardizzate, minimizzando la variabilità e aumentando l'affidabilità dei risultati.
- Etica e logistica: il modello evita le implicazioni etiche e logistiche associate agli studi sugli animali, velocizzando il processo di ricerca e riducendo i costi.

4. Potenziale di personalizzazione: un aspetto rivoluzionario del protocollo Feaster è la sua capacità di essere personalizzato:

- Creazione di modelli di malattia: le hiPSC possono essere derivati da pazienti affetti da specifiche malattie cardiache, permettendo di creare modelli di malattia in vitro per studiare i meccanismi patogenetici e sviluppare terapie personalizzate.
- Medicina di precisione: il modello personalizzato apre la strada alla medicina di precisione, permettendo di testare l'efficacia di farmaci e terapie su modelli cardiaci geneticamente identici a quelli del singolo paziente.

Il modello può essere utilizzato per:

- Sviluppo di farmaci: testare l'effetto di potenziali farmaci sulla contrattilità cardiaca, accelerando il processo di scoperta di nuovi trattamenti per malattie cardiache.

- Meccanismi di disfunzione cardiaca: studiare i meccanismi sottostanti la disfunzione cardiaca in diverse condizioni patologiche.
- Cardiomiopatie: analizzare cardiomiopatie specifiche, come la cardiomiopatia ipertrofica o dilatativa, e per lo sviluppo di terapie mirate.
- Tossicità cardiaca: valutare la potenziale tossicità cardiaca di nuovi farmaci o composti chimici.

Feaster et al. [28] nel suo studio ha valutato l'effetto di diversi composti sulla contrattilità cardiaca in hiPSC-CMs. I risultati dello studio hanno dimostrato che il modello è in grado di identificare composti con effetti inotropici positivi e negativi sulla contrazione cardiaca, suggerendo la sua potenziale utilità per lo screening di nuovi farmaci cardiaci.

Lo studio è avvenuto mediante l'analisi di contrattilità, gestione del calcio ed elettrofisiologia cellulare tramite fluorescenza e video. Le hiPSC - CMs sono state disposte come monolayer su un substrato flessibile a più pozzetti (o multi-well) e stimolate con un generatore di impulsi commerciale con supporto per il software AM-system 4100; per il trattamento dei dati si è sfruttato l'appoggio della piattaforma CelloPTIQ.

Come era stato precedentemente descritto in *Blinova et al.*[12], pacing ed impulsi elettrici CCM sono stati erogati attraverso la stessa coppia di elettrodi tramite impulsi di stimolazione elettrica a forma di onda quadra monofasica.

Nello studio *Feaster et al.*[28], come si può vedere nelle figure 12 e 13, le hiPSC - CMs sono state eccitate con due tipi di stimolazione:

1. Pacing ad 1 Hz, per la durata di 2 ms, con ampiezza 14 V/cm (64 mA);
2. Stimolazione CCM erogata tramite quattro impulsi bifasici con durata dell'impulso di 5,14 ms (per comodità useremo

l'approssimazione di 5 ms), con ampiezza 28 V/cm (128 mA, ampiezza di fase) e intervallo interfascico nullo; tra il primo impulso a 1 Hz e la successiva onda bifasica intercorre un ritardo di 30 ms .

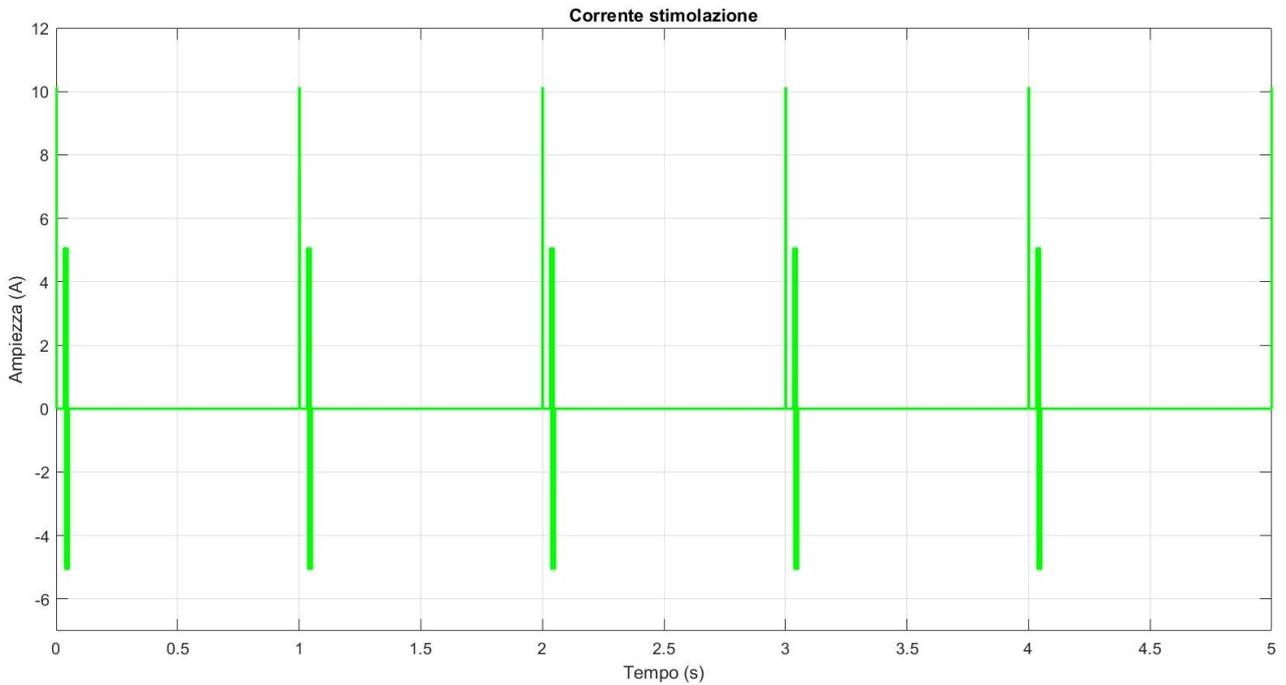


Figura 12: Questo grafico mostra un treno di impulsi bifasici generato usando una funzione in MATLAB. Il primo impulso ha ampiezza di 10 A mentre i successivi quattro hanno ampiezza di 5 V. La successione di impulsi si ripete ogni secondo. Lungo l'asse delle ascisse abbiamo il tempo in secondi mentre lungo le ordinate l'ampiezza degli impulsi. Gli impulsi bifasici alternano tra valori positivi e negativi con un intervallo di tempo tra due impulsi che rimane costante.

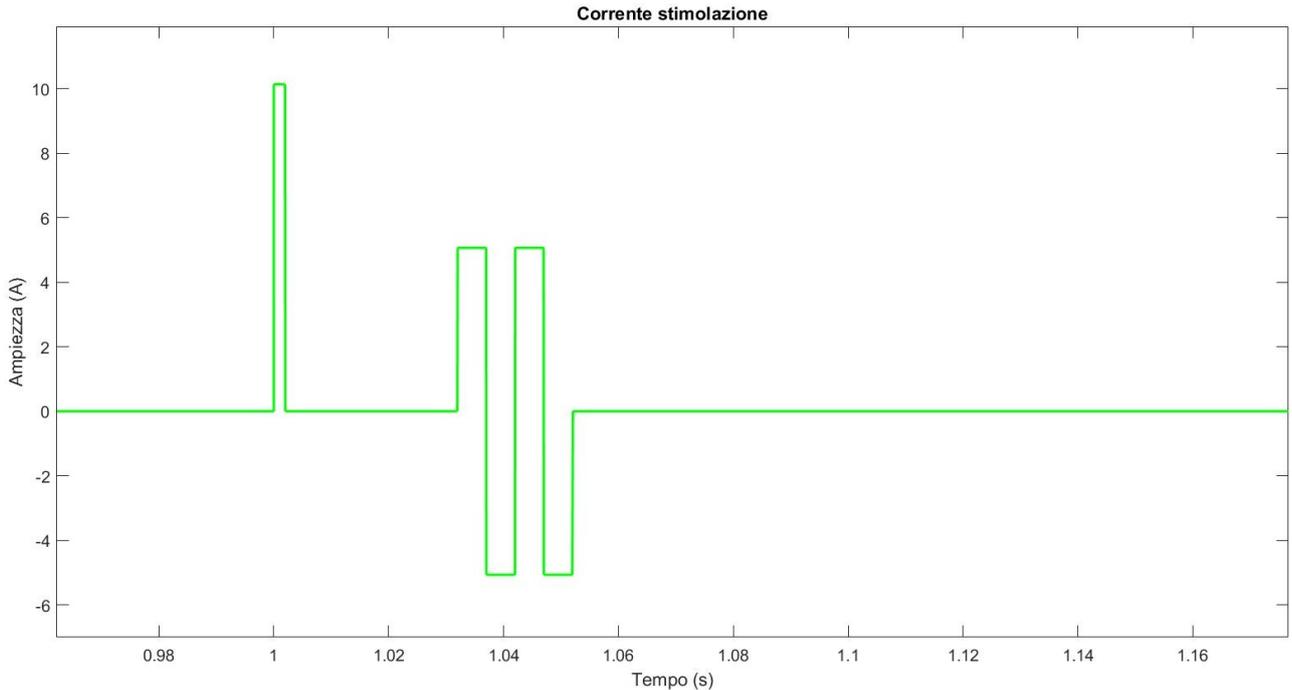


Figura 13: Zoom di un impulso bifasico con l'obiettivo di evidenziare meglio l'andamento degli impulsi.

Nello studio di Feaster sono state testate diverse ampiezze dell'impulso CCM per determinare quella ottimale pari a 10 A.

Per ciascun monolayer è stata selezionata una ROI (region of interest); in questa regione si è effettuata la valutazione del potenziale d'azione, grazie all'uso di una sonda sensibile alla tensione, andando a studiarne le caratteristiche, tra cui tempo di salita e durata del potenziale d'azione al 50%, 75% e 90% della ripolarizzazione. Tutte queste valutazioni sono state fatte prima della stimolazione CCM, durante la stimolazione e successivamente alla stimolazione CCM.

Nello studio sono state misurate: le proprietà contrattili (tensione), la concentrazione di calcio intracellulare ed i potenziali d'azione; grazie a questi dati ed attraverso un'analisi statistica è stato realizzato un modello matematico del campo elettrico.

I risultati emersi dalla ricerca condotta da *Feaster et al.* [28] forniscono un solido fondamento per il presente studio, il quale si propone di esaminare la riproducibilità di tali risultati attraverso l'utilizzo del modello *Paci et al* [49] in un contesto simulato.

I risultati dello studio di *Feaster et al* [28] più significativi per questa tesi, si sono dimostrati essere:

1. Modello per spiegare la modulazione della contrattilità cardiaca umana in vitro.

All'aumentare della concentrazione di calcio, si osserva un effetto inotropo (positivo o negativo) che viene mitigato dalla CCM.

La forza di contrazione del miocardio è influenzata dalla presenza di calcio intracellulare, il quale deriva sia dal liquido extracellulare che dal rilascio dal reticolo sarcoplasmatico. Questa concentrazione di calcio regola la contrattilità del miocardio, che rappresenta la sua capacità intrinseca di sviluppare tensione attraverso le interazioni tra actina e miosina, nonché la velocità di tali interazioni. Pertanto, fattori che determinano un aumento nella concentrazione di calcio contribuiscono ad aumentare la contrattilità e di conseguenza la forza di contrazione del miocardio, producendo un effetto inotropo positivo.

L'effetto inotropo, in medicina, riflette l'azione di alcuni farmaci sulla contrattilità del miocardio. Questi farmaci possono avere un effetto inotropo positivo, aumentando la forza di contrazione del cuore, oppure un effetto inotropo negativo, diminuendola.

2. Aumento della contrattilità nelle hiPSC - CMs

Le cellule staminali pluripotenti indotte (hiPSC-CMs), esposte a stimolazione CCM, hanno mostrato differenze misurabili nella contrattilità cardiaca che si riducevano immediatamente alla cessazione del segnale CCM. Il primo battito sottoposto a CCM presentava un significativo aumento dell'ampiezza di contrazione (Figura 14). Questi risultati dimostrano che le proprietà contrattili

in un modello hiPSC-CM di cardiomiociti umani vengono potenziate dalla stimolazione acuta della CCM clinica, almeno nell'ambito del modello in vitro.

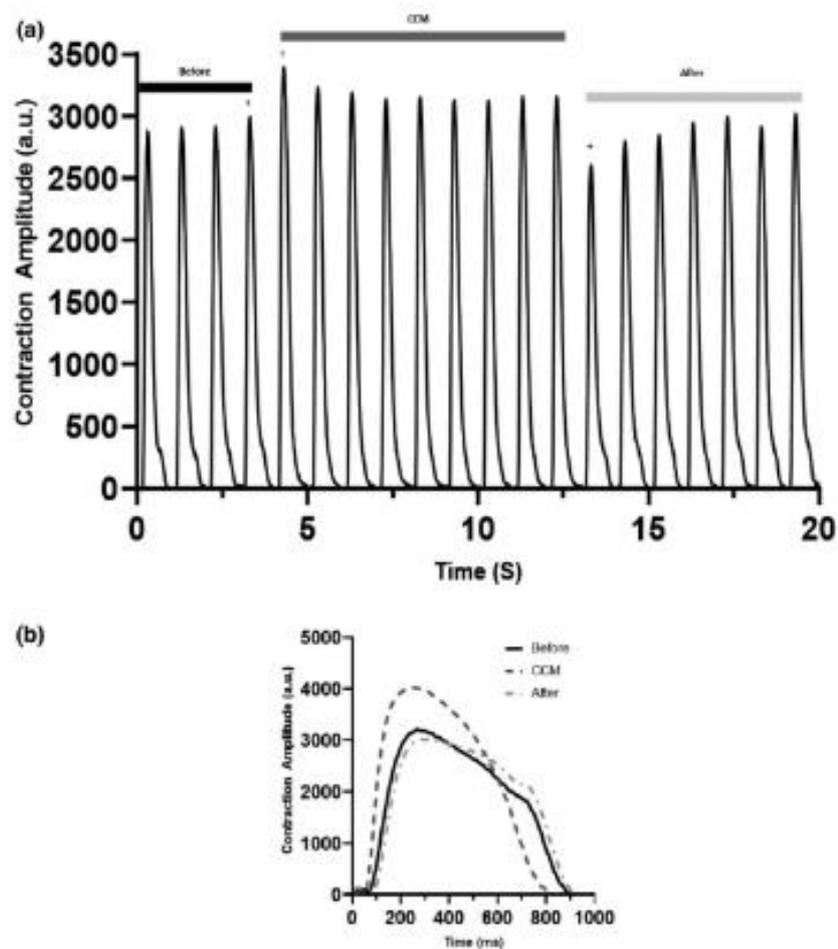


Figura 14: Effetti acuti della modulazione della contrattilità cardiaca (CCM) sulle proprietà contrattili dei cardiomiociti derivati dalle cellule staminali pluripotenti indotte umane. (a) Registrazione rappresentativa della contrazione prima (5V), durante la CCM (10V) e dopo (5V). (b) Tracciati rappresentativi della contrazione degli effetti immediati. Immagine tratta da [25].

3. Effetti della CCM sulle proprietà di gestione del calcio nelle hiPSC - CMs

In seguito ad una stimolazione CCM delle hiPSC - CM le proprietà di gestione del calcio sono diminuite quando il segnale CCM è stato eliminato. Per proprietà di gestione del calcio si intendono le capacità delle hiPSC-CM, di regolare e gestire i livelli di calcio all'interno della cellula. La stimolazione CCM ha dato come risultati un aumento nell'ampiezza della transizione del calcio intracellulare

e una cinetica di calcio più rapida, effetti rimasti fino a quando la stimolazione CCM non è stata eliminata (figura 15).

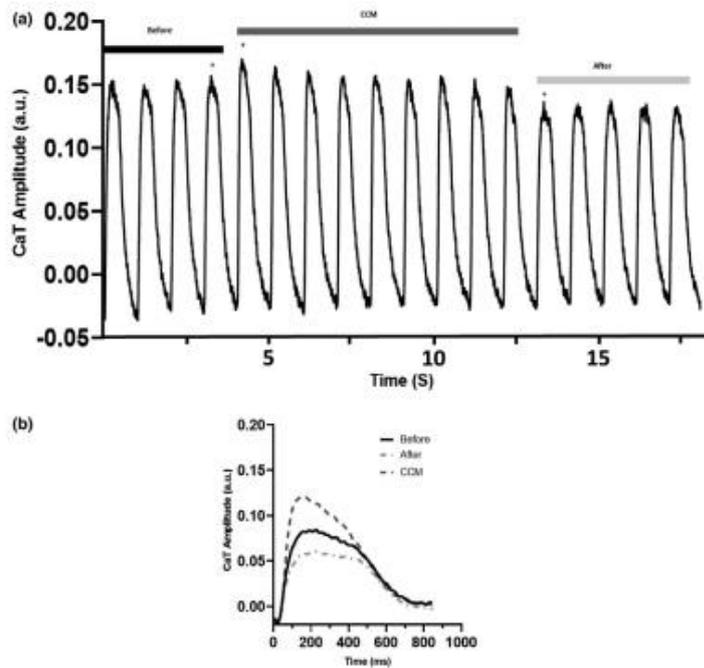


Figura 15: Effetti acuti della modulazione della contrattilità cardiaca (CCM) sulle proprietà di gestione del calcio dei cardiomiociti derivati dalle cellule staminali pluripotenti indotte umane. (a) Registrazione rappresentativa del calcio prima (5V), durante la CCM (10V) e dopo (5V). (b) Tracciati rappresentativi dei transienti di calcio degli effetti immediati (cioè, l'ultimo battito prima, il primo battito CCM e il primo battito dopo). Immagine tratta da [25].

4. Azione della CCM sulla durata del potenziale d'azione nelle hiPSC - CMs

La CCM viene erogata nel miocardio durante il periodo refrattario assoluto; tale stimolazione, nel primo battito di CCM, ha accorciato in modo evidente e significativo la durata del potenziale d'azione, effetto rimasto per tutta la stimolazione CCM ed eliminato una volta tolto il segnale della CCM (Figura 16).

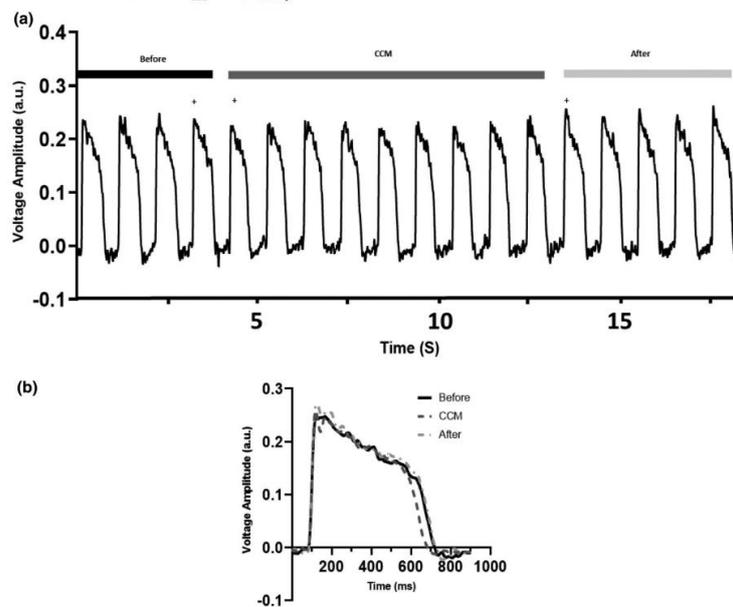


Figura 16: Effetti acuti della modulazione della contrattilità cardiaca (CCM) sull'elettrofisiologia dei cardiomiociti derivati dalle cellule staminali pluripotenti indotte umane. (a) Registrazione rappresentativa del potenziale d'azione prima (5V), durante la CCM (10V) e dopo (5V). (b) Morfologia rappresentativa del potenziale d'azione degli effetti immediati (cioè, l'ultimo battito prima, il primo battito CCM e il primo battito dopo, indicati dal simbolo + nel pannello a). Immagine tratta da [25].

5. Esito della stimolazione β -adrenergica sulla risposta alla Modulazione della Contrattilità Cardiaca nelle hiPSC-CM

La CCM ha provocato, unito ad un pretrattamento con metaprololo, un'attenuazione dell'ampiezza della contrazione delle hiPSC - CM senza però andare ad inibirla.

Questo risultato suggerisce che, insieme alla CCM, sono presenti altri meccanismi che vanno a contribuire alla risposta inotropica, sebbene l'effetto sulla cinetica di contrazione indotta dalla CCM sia rimasta intatta, indipendentemente dal blocco β -adrenergico.

6. Potenziamento della sensibilità al calcio del miofilamento nelle hiPSC-CM mediato dalla stimolazione della CCM

Gli effetti della CCM sulle hiPSC - CM sono stati valutati sulla base della concentrazione di calcio extraellulare dimostrando che tale stimolazione ha aumentato la sensibilità al calcio (si nota uno

spostamento verso sinistra della curva) e quindi un aumento dell'ampiezza di contrazione a concentrazione più basse di calcio extracellulare. La stimolazione CCM, quindi, aumenta significativamente la sensibilità al calcio del miofilamento nelle hiPSC-CM, suggerendo un potenziamento del meccanismo di accoppiamento eccitazione-contrazione.

Dai risultati ottenuti nello studio la CCM è stata valutata un metodo valido per quantificare gli effetti acuti della stimolazione CCM, sfortunatamente tale metodo presenta grandi imprecisioni, soprattutto dovute al fatto che gli effetti della CCM sono transitori ed iniziano a decadere già successivamente al primo battito.

4.2 Descrizione del modello Paci

Durante lo sviluppo della tesi, si è impiegato il modello hiPSC-CMs proposto da *Paci et al.* [49].

Tale modello simula l'attività spontanea del potenziale d'azione (AP) in cellule staminali pluripotenti umane (hiPSC), differenziate per ottenerne dei cardiomiociti.

Questo modello si basa sul formalismo di Hodgkin-Huxley, una descrizione matematica dettagliata delle correnti ioniche che determinano il potenziale d'azione cardiaco.

L'equazione fondamentale del modello Paci descrive la variazione del potenziale di membrana (V) nel tempo, in base alla corrente totale che fluisce attraverso la membrana cellulare è data da:

$$C \frac{dV}{dt} = - (I_{Na} + I_{CaL} + I_f + I_{K1} + I_{Kr} + I_{Ks} + I_{t0} + I_{NaCa} + I_{NaK} + I_{pCa} + I_{bNa} + I_{bCa} + I_{NaL} + I_{stim})$$

Dove C è la capacità di membrana e V è il potenziale di membrana, I_{stim} è la corrente di stimolo utilizzata per replicare protocolli specifici di test di farmaci sperimentali nella pubblicazione originale.

Nella seguente immagine possiamo vedere lo schema del modello:

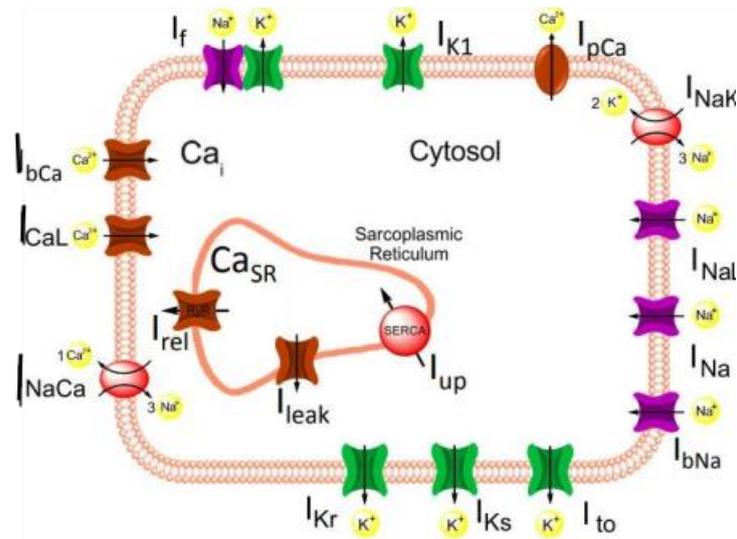


Figura 17: Schema del modello; l'immagine è stata presa da Paci M, Hyttinen J, Aalto-Setälä K. "Modelli computazionali di cardiomiociti umani derivati da cellule staminali pluripotenti indotte con caratteristiche sia ventricolari che atriali", pubblicato negli *Annals of Biomedical Engineering*, 2020.

Facendo riferimento alla Figura 17 sopra riportata, il modello evidenzia diversi elementi:

- Correnti ioniche: corrente di calcio di tipo L (I_{CaL}), corrente rapida di potassio (I_{Kr}), corrente lenta di potassio (I_{Ks}), corrente transitoria di potassio in uscita (I_{to}), corrente di potassio rettificante in entrata (I_{K1}), corrente "funny" (I_f), corrente di sodio (I_{Na}), corrente di sodio tardiva (I_{NaL}), corrente di background di calcio (I_{bCa}), corrente di background di sodio (I_{bNa});
- Scambiatore sodio/calcio (I_{NaCa});
- Pompe: pompa sodio/potassio (I_{NaK}) e pompa calcio (I_{pCa});
- Flussi da/verso il SR, dove con SR si indica il reticolo sarcoplasmatico: rilascio di calcio dal SR (I_{rel}), pompa ATP-asi (I_{up} , SERCA) e flusso di perdita (I_{leak}).

Le correnti ioniche I_{Na} , I_{CaL} , I_f , I_{to} , I_{K1} , I_{Kr} e I_{Ks} sono state calibrate utilizzando i dati sperimentali di Ma et al. [38] come punto di

riferimento. In assenza di dati sperimentali specifici, le caratteristiche delle correnti ioniche sono state adattate da un modello di cellule staminali embrionali umane (hESC-CM), al fine di riflettere le differenze fisiologiche tra i due tipi cellulari.

Le forme del potenziale d'azione (AP) sono state confrontate analiticamente utilizzando indicatori morfologici che includono le seguenti caratteristiche:

- Lunghezza del ciclo;
- Frequenza di battito spontaneo espressa in battiti al minuto (bpm);
- MDP: Massimo Potenziale Diastolico;
- Picco: Tensione massima raggiunta durante il potenziale d'azione;
- APA: Ampiezza del potenziale d'azione, calcolata da MDP ad APA;
- Vmax: Massimo valore della pendenza durante l'ascesa del potenziale d'azione.

Il modello Paci è stato utilizzato per studiare una vasta gamma di fenomeni elettrofisiologici cardiaci, tra cui:

- Propagazione dell'onda di depolarizzazione: per simulare la propagazione dell'onda di depolarizzazione attraverso un reticolo di cellule cardiache, permettendo di studiare la velocità e il pattern di conduzione dell'impulso elettrico;
- Effetti di farmaci: per prevedere gli effetti di farmaci cardiaci sull'attività elettrica dei cardiomiociti hiPSC. L'utilizzo di questo modello può facilitare lo sviluppo di nuovi farmaci più efficaci e sicuri, attraverso la simulazione di test preclinici e l'identificazione di potenziali bersagli farmacologici e tossici;
- Malattie cardiache: per studiare i meccanismi sottostanti alle malattie cardiache e per sviluppare nuove strategie terapeutiche.

Vantaggi del modello Paci:

- È un modello biofisico dettagliato che riproduce fedelmente l'attività elettrica dei cardiomiociti hiPSC;
- È flessibile e può essere utilizzato per studiare una vasta gamma di fenomeni elettrofisiologici cardiaci;
- È stato validato sperimentalmente e ha dimostrato una buona concordanza con i dati sperimentali.

Limiti del modello Paci:

- È un modello complesso che richiede competenze specifiche per la sua implementazione e utilizzo;
- Non tiene conto di tutti i fattori che possono influenzare l'attività elettrica cardiaca, come la struttura geometrica del cuore e la perfusione sanguigna;
- È in continua evoluzione e viene aggiornato con nuove informazioni e dati sperimentali.

L'originario codice Paci2020 riproduceva un singolo impulso rettangolare, di ampiezza 10 Ampere e durata 2ms il quale genera il grafico riportato in Figura 18.

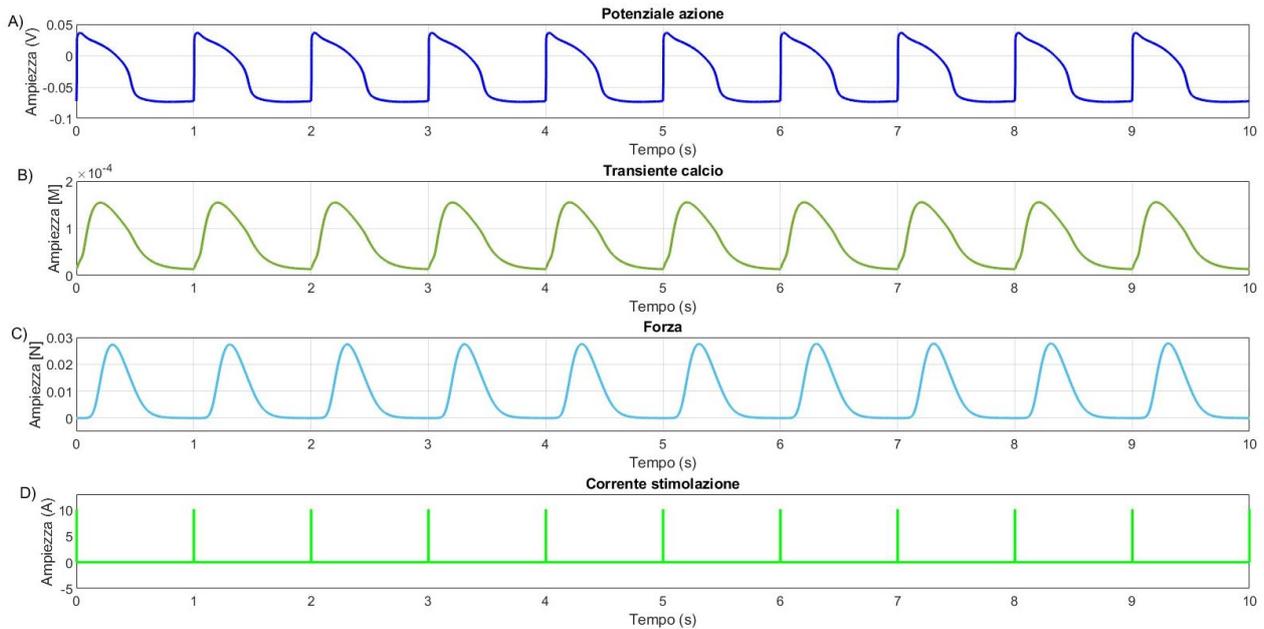


Figura 18: Grafico di potenziale d'azione, transiente del calcio, forza e corrente di stimolazione nel modello Paci2020. L'immagine mostra quattro grafici che rappresentano diverse caratteristiche. In tutti e quattro i grafici sull'asse x viene rappresentato il tempo. Grafico A): potenziale d'azione; il primo grafico rappresenta il potenziale d'azione con la depolarizzazione e ripolarizzazione. Grafico B): transiente del calcio; il secondo grafico mostra il transiente del calcio, che è la concentrazione di ioni calcio durante un potenziale d'azione; Grafico C): forza; il terzo grafico mostra la forza della corrente di stimolazione. Grafico D): corrente di stimolazione; il quarto grafico rappresenta la corrente di stimolazione al quale vengono sottoposte le hiPSC-CMs.

Nella funzione vengono chiamate tutte le varie variabili dell'onda quadra (come `i_stim_Amplitude`, `i_stim_End`, `i_stim_PulseDuration`, `i_stim_Start`, `i_stim_frequency`, `i_stim_Period`) mentre lo `stim_flag` ci indica se la stimolazione è attiva o meno (se lo `stim_flag` si trova a 0 nel main della funzione, allora non avrò nessun nessuna stimolazione).

```
if ((time >= i_stim_Start) && (time <= i_stim_End) && (time-
i_stim_Start-floor((time-i_stim_Start)/i_stim_Period)*i_stim_Period
<= i_stim_PulseDuration))
```

```
    i_stim = stim_flag*i_stim_Amplitude/Cm;
```

```
else
```

```
i_stim = 0.0;
```

```
end
```

Nelle righe di codice sopra riportate, troviamo le condizioni affinché avvenga la stimolazione con i relativi intervalli. La funzione sarà strutturata come un ciclo che si ripete nel tempo un numero definito di volte, come specificato nel blocco principale del programma; nel caso sopra rappresentato abbiamo imposto che la funzione abbia lunghezza di stimolazione pari a 10 secondi.

4.3 Nuovo codice per la stimolazione

In questa tesi siamo partiti dalla stimolazione del modello Paci2020, la quale riproduceva il singolo impulso di 1 Hz, a cui abbiamo aggiunto l'onda bifasica descritta nel protocollo Feaster.

```
%% Stimulation
```

```
i_stim_Amplitude      = 10e-10; %5.5e-10;%7.5e-10;    % ampere (in  
stim_mode)
```

```
i_stim_End           = 1000.0;    % second (in stim_mode)
```

```
i_stim_PulseDuration = 0.002;    % second (in stim_mode)
```

```
i_stim_PulseDuration1 = 0.005;
```

```
i_stim_Start         = 0.0;    % second (in stim_mode)
```

```
i_stim_frequency     = 60.0;    % per_second (in stim_mode)
```

```
stim_flag            = 1;    % dimensionless (in stim_mode)
```

```
stim_flag1           = 1;
```

```
i_stim_Period        = 60.0/i_stim_frequency;
```

```
t1                   = 0.03 + i_stim_PulseDuration;
```

```
t2                   = t1 + i_stim_PulseDuration1;
```

```

t3          = t2 + i_stim_PulseDuration1;
t4          = t3 + i_stim_PulseDuration1;

if stim_flag~=0 && stim_flag~=1
error('Paci2020: wrong pacing! stimFlag can be only 0 (spontaneous)
or 1 (paced) ');
end

if stim_flag1 ~=0 && stim_flag1~=1
error('Paci2020: wrong pacing! stimFlag1 can be only 0 (spontaneous)
or 1 (paced) ');
end

if ((time >= i_stim_Start) && (time <= i_stim_End) && (time-
i_stim_Start-floor((time-i_stim_Start)/i_stim_Period)*i_stim_Period
<= i_stim_PulseDuration))
    i_stim = stim_flag*i_stim_Amplitude/Cm;
elseif ((time >= i_stim_Start) && (time <= i_stim_End) && (time-t1-
floor((time-t1)/i_stim_Period)*i_stim_Period <=
i_stim_PulseDuration1))
    i_stim = stim_flag1*i_stim_Amplitude/(2*Cm);
elseif ((time >= i_stim_Start) && (time <= i_stim_End) && (time-t2-
floor((time-t2)/i_stim_Period)*i_stim_Period <=
i_stim_PulseDuration1))
    i_stim = - stim_flag1*i_stim_Amplitude/(2*Cm);

```

```

elseif ((time >= i_stim_Start) && (time <= i_stim_End) && (time-t3-
floor((time-t3)/i_stim_Period)*i_stim_Period <=
i_stim_PulseDuration1))

    i_stim = stim_flag1*i_stim_Amplitude/(2*Cm);

elseif ((time >= i_stim_Start) && (time <= i_stim_End) && (time-t4-
floor((time-t4)/i_stim_Period)*i_stim_Period <=
i_stim_PulseDuration1))

    i_stim = - stim_flag1*i_stim_Amplitude/(2*Cm);

else

    i_stim = 0.0;

end

```

Queste righe di codice simulano l'applicazione di stimolazione elettrica a un sistema biologico all'interno di un programma MATLAB più ampio. Definisce parametri per la stimolazione e controlla gli errori, quindi calcola la corrente di stimolazione in base a diverse condizioni.

1. Definizione dei parametri di stimolazione:

- o `i_stim_Amplitude`: Intensità della corrente di stimolazione (10 Ampere in questo caso)
- o `i_stim_End`: Durata del periodo di stimolazione (1000 secondi)
- o `i_stim_PulseDuration`: Durata di ogni singolo impulso di stimolazione (2 millisecondi)
- o `i_stim_PulseDuration1`: Durata di un diverso tipo di impulso di stimolazione (5 millisecondi)
- o `i_stim_Start`: Momento temporale in cui inizia la stimolazione (0 secondi)

- o `i_stim_frequency`: Frequenza degli impulsi di stimolazione (60 al secondo)
- o `stim_flag` e `stim_flag1`: Flag che indicano se un tipo specifico di stimolazione è attivo (1) o no (0)
- o `i_stim_Period`: Calcolato in base a `i_stim_frequency` (1/60 secondo)
- o `t1`, `t2`, `t3`, `t4`: Punti temporali che segnano l'inizio di diversi tipi di impulso all'interno del periodo di stimolazione

Il codice verifica se `stim_flag` e `stim_flag1` sono 0 (non attivo) o 1 (attivo). Se sarà a 1 verrà applicata la stimolazione CCM mentre se è a 0 non avrò nulla; qualsiasi altro valore attiva un messaggio di errore per garantire la selezione della modalità di stimolazione corretta.

2. Calcolo della corrente di stimolazione (`I_stim`):

- o Nel codice si è utilizzato una serie di istruzioni `if...elseif...else` per determinare la corrente di stimolazione in base al tempo corrente (`time`) e rispetto ai tempi di inizio e fine della stimolazione, nonché alla durata e al tipo di impulso.
- o Se `time` rientra nel periodo di stimolazione, durante una finestra di impulso definita da `I_Stim_PulseDuration`, la corrente viene impostata su $\text{Stim_flag} * \text{I_Stim_Amplitude} / \text{Cm}$ (dove `Cm` è una costante relativa alla capacità cellulare). Questo indica un impulso con ampiezza determinata da `I_Stim_Amplitude` e polarità basata su `Stim_flag` (potenzialmente positiva o negativa).
- o Se `time` cade al di fuori del periodo di stimolazione o delle finestre di impulso, la corrente viene impostata su 0.

Analizzando la funzione Matlab, per prima cosa si sono individuati gli intervalli dell'onda bifasica andando a graficare il primo impulso, di ampiezza 10A e durata 2 ms; in un secondo momento si sono studiati anche i successivi intervalli, dopo 30 ms dal primo impulso, che sono andati a creare un'onda con ampiezza totale sempre di 10V (ripartita tra positivo e negativo) e durata, invece, di 5ms (infatti, gli intervalli del primo stimolo sono: da 32ms a 37ms e da 42ms a 47ms con ampiezza di 5V, mentre da 37ms a 42ms e da 47ms a 52ms con ampiezza -5V).

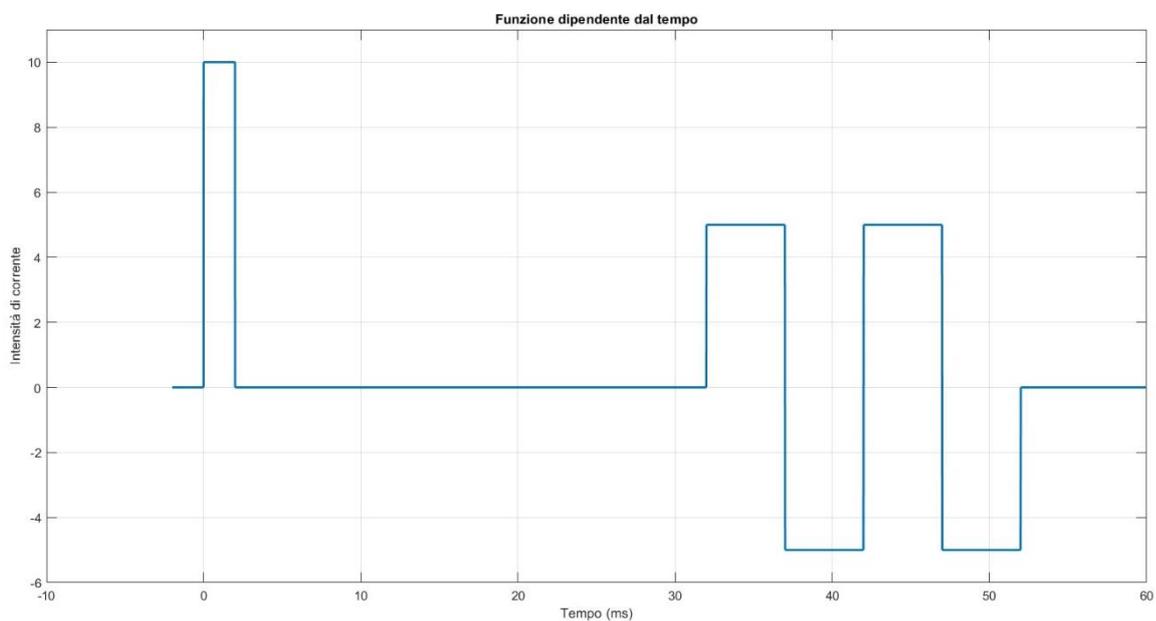


Figura 19: l'immagine mostra l'unione della stimolazione dovuta al modello Paci, primo impulso di ampiezza 10A, con l'onda bifasica di Feaster.

Successivamente si è modificato il codice, affinché si ripetesse nel tempo, tramite la funzione if/elseif per osservare gli effetti della CCM nel tempo (impostando sempre un intervallo di 10 ripetizioni).

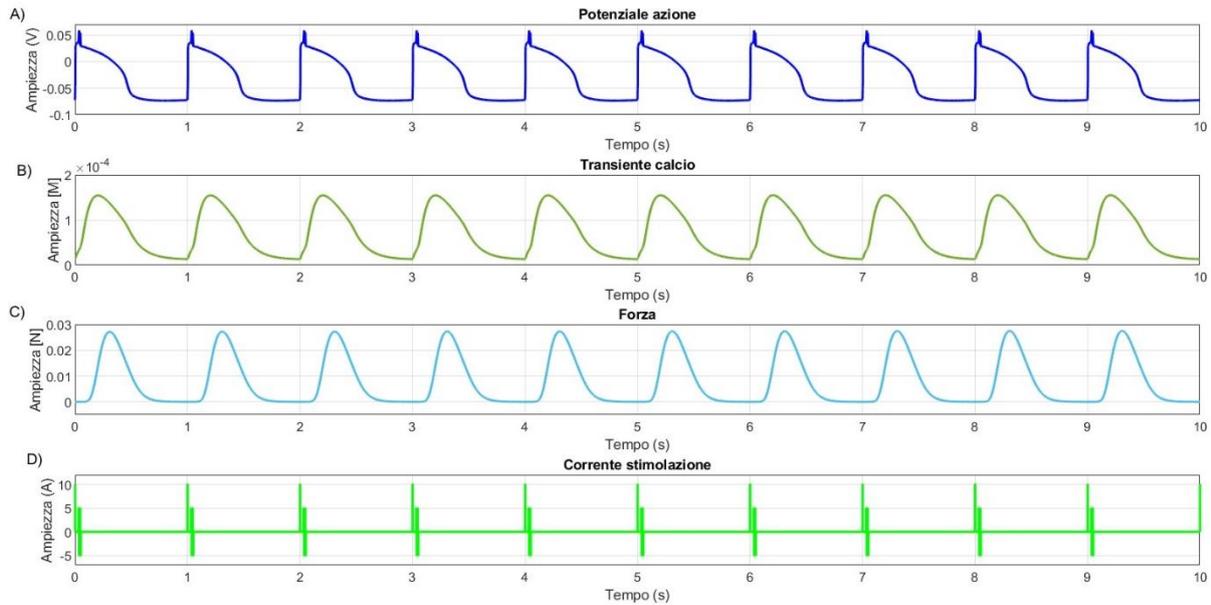


Figura 20: l'immagine mostra un set di quattro grafici rappresentanti elementi diversi e le loro variazioni nel tempo. I grafici sono relativi all'analisi della stimolazione e della risposta delle hiPSC-CM. I grafici rappresentano A) il potenziale d'azione nel quale viene rappresentata la variazione del potenziale d'azione nel tempo, caratterizzato da picchi periodici. B) transiente del calcio nel quale viene mostrata la concentrazione di calcio nel tempo, che presenta delle oscillazioni che possono essere legate ai picchi del potenziale d'azione. C) forza di contrazione delle cellule nel tempo in risposta ai cambiamenti nei livelli di calcio e del potenziale d'azione. D) corrente di stimolazione, rappresentata come impulsi bifasici nel tempo.

Inoltre, per evidenziare l'effetto della CCM, si è intervallata la presenza e l'assenza della stimolazione, facendo i primi 5 secondi senza stimolazione, 20 secondi con stimolazione, altri 5 secondi senza, per poi introdurre nuovamente la stimolazione e mantenerla per il tempo rimanente. In questo modo si è riusciti ad evidenziare gli effetti che ha la CCM su potenziale d'azione, transiente del calcio e forza di contrazione dei cardiomiociti.

Per farlo si sono usate queste righe di codice:

```
% Imposta gli intervalli di attivazione/disattivazione dello stimflag
if time >= 0 && time < 5

    stim_flag = 0;
```

```

stim_flag1 = 0; % Disattiva stimflag tra 0 e 5 secondi
elseif time >= 5 && time < 20
    stim_flag = 1;
    stim_flag1 = 1; % Attiva stimflag tra 5 e 20 secondi
elseif time >= 20 && time < 25
    stim_flag = 0;
    stim_flag1 = 0; % Disattiva stimflag tra 20 e 25 secondi
else
    stim_flag = 1;
    stim_flag1 = 1; % Mantieni stimflag attivo al di fuori degli
intervalli specificati
end

```

Si è ottenuto il grafico riportato in Figura 21.

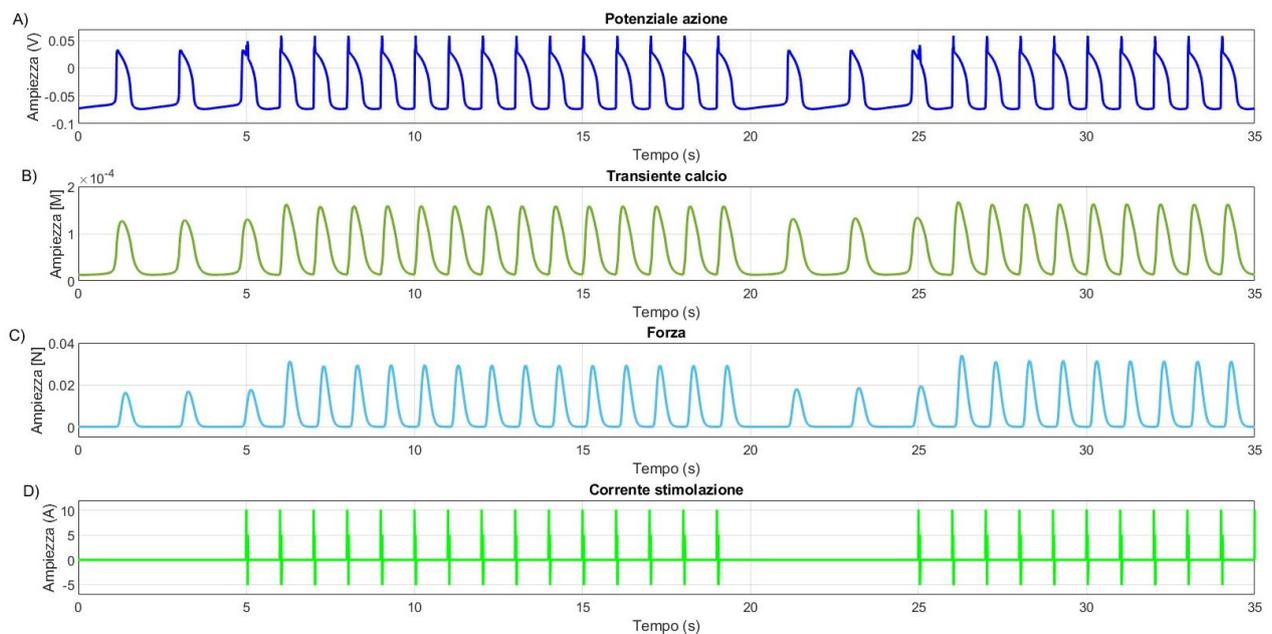


Figura 21: l'immagine mostra l'influenza della corrente di stimolazione (grafico D) sul potenziale d'azione (grafico A), sul transiente del calcio (grafico B) e

sulla forza (grafico C). Nell'immagine si alterna l'assenza di stimolazione alla stimolazione tramite impulso Paci e onda quadra bifasica.

Per approfondire ulteriormente gli effetti della stimolazione con l'onda quadra bifasica proposta nello studio di *Feaster et al.* [28], si propone un'ulteriore analisi al fine di ottenere un confronto più diretto degli effetti sul potenziale d'azione, sul transiente del calcio e sulla forza.

L'analisi confronterà i risultati di due scenari: si metterà a confronto gli effetti della sola stimolazione tramite impulso singolo con gli effetti dell'impulso singolo e onda quadra bifasica insieme. Per fare questo si andranno ad alternare i due tipi di stimolazione come si è precedentemente fatto. Tale alternanza si avrà dalle seguenti righe di codice Matlab:

```
%Imposta gli intervalli di attivazione/disattivazione dello stimflag
if time >= 0 && time < 5

    stim_flag = 1;

    stim_flag1 = 0;

elseif time >= 5 && time < 20

    stim_flag = 1;

    stim_flag1 = 1;

elseif time >= 20 && time < 25

    stim_flag = 1;

    stim_flag1 = 0;

else

    stim_flag = 1;

    stim_flag1 = 1;

end
```

Obiettivo primario di questa ulteriore modifica del codice Paci2020 originario, è quello di valutare in che modo varia l'andamento dei grafici una volta che ci si avvicina maggiormente agli esperimenti considerando il modello stimolato anche prima della CCM e non auto oscillante. Tale aggiunta ha come scopo quello di approfondire la nostra comprensione dei meccanismi d'azione e degli effetti fisiologici indotti dalla stimolazione con onda quadra bifasica.

Le righe di codice sopracitate generano le seguenti forme d'onda, che si andranno a vedere successivamente, in figura 22:

- Onda quadra bifasica (Feaster): questa forma d'onda è caratterizzata da impulsi rettangolari con due fasi distinte: una positiva e una negativa.
- Impulso Paci: questa forma d'onda è caratterizzata da un impulso solo positivo ma di ampiezza maggiore rispetto all'onda quadra, di breve durata, seguito da un periodo di silenzio.

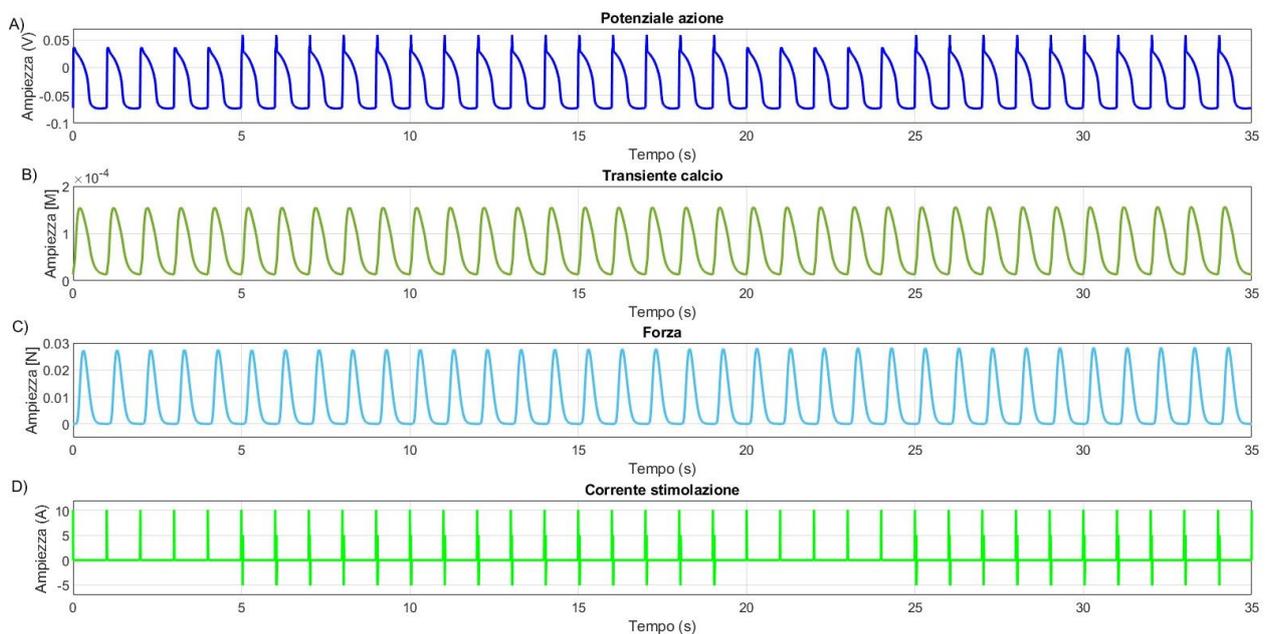


Figura 22: l'immagine mostra l'influenza della corrente di stimolazione sul potenziale d'azione (grafico A), sul transiente del calcio (grafico B) e sulla forza (grafico C). Nell'immagine si alterna la sola stimolazione tramite impulso Paci alla stimolazione tramite impulso Paci e onda quadra bifasica.

CAPITOLO 5

RISULTATI

Nel capitolo precedente si sono studiati i due modelli oggetto della tesi, il modello Paci2020 e il protocollo Feaster.

Nel presente capitolo saranno presentati e messi a confronto i risultati di una simulazione in ambiente MATLAB.

Nel dettaglio si cercherà di analizzare con maggior precisione l'andamento delle curve del potenziale d'azione, del transiente del calcio e della contrattilità cardiaca.

5.1 Potenziale d'Azione

Modello Paci



Figura 23: Andamento del Potenziale d'Azione ottenuto tramite l'utilizzo del codice MATLAB Paci2020.

Modello assenza stimolazione alternato con protocollo Feaster usando l'implementazione del modello MATLAB di Paci

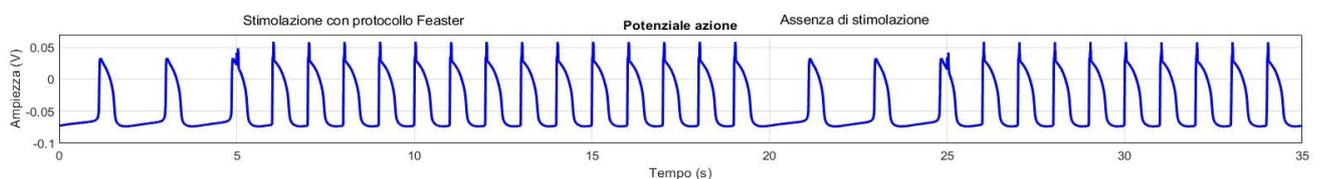


Figura 24: Andamento del potenziale d'azione ottenuto a partire dal codice MATLAB Paci2020 con l'aggiunta del protocollo di stimolazione proposto nello studio Feaster.

Modello stimolazione solo Paci alternata con protocollo Feaster usando l'implementazione del modello MATLAB di Paci

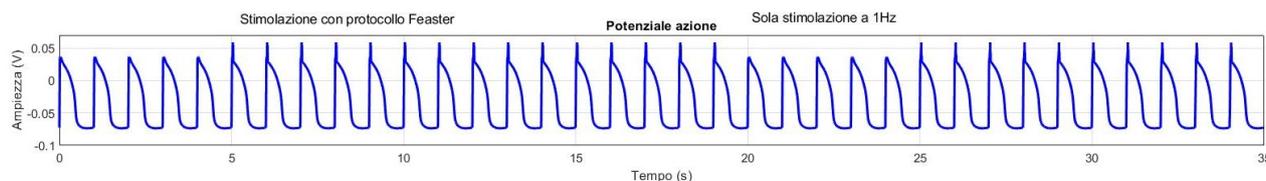


Figura 25: Andamento del Potenziale d'Azione ottenuto a partire dal codice MATLAB Paci2020 con l'aggiunta delle modifiche introdotte dallo studio Feaster mettendo in evidenza la differenza che si crea con la sola stimolazione Paci e con la stimolazione Paci e Feaster unite.

Come evidenziato dallo studio di *Feaster et al.* [28], l'introduzione della CCM può indurre modifiche significative nel potenziale d'azione dei cardiomiociti derivanti da cellule staminali pluripotenti indotte umane.

L'analisi dei grafici rivela che la CCM determina un aumento dell'ampiezza del potenziale d'azione, ovvero la differenza di voltaggio tra la base e il picco massimo. Questo incremento si osserva principalmente nella fase 2 (plateau), con un contributo minore della fase 0 (depolarizzazione rapida).

L'aumento dell'ampiezza del potenziale d'azione indica una maggiore depolarizzazione della membrana cellulare, che a sua volta può tradursi in una forza di contrazione più vigorosa del cardiomiocita. Tale effetto positivo potrebbe avere implicazioni benefiche per la funzione cardiaca, in particolare in pazienti con scompenso cardiaco.

Tuttavia, è importante sottolineare che la CCM induce anche un accorciamento della durata del potenziale d'azione. Come mostra la figura 26, il primo battito sotto stimolazione CCM (potenziale 6, rappresentato in verde) ha una durata più breve rispetto all'ultimo battito prima della stimolazione (potenziale 5, rappresentato

invece in rosso).

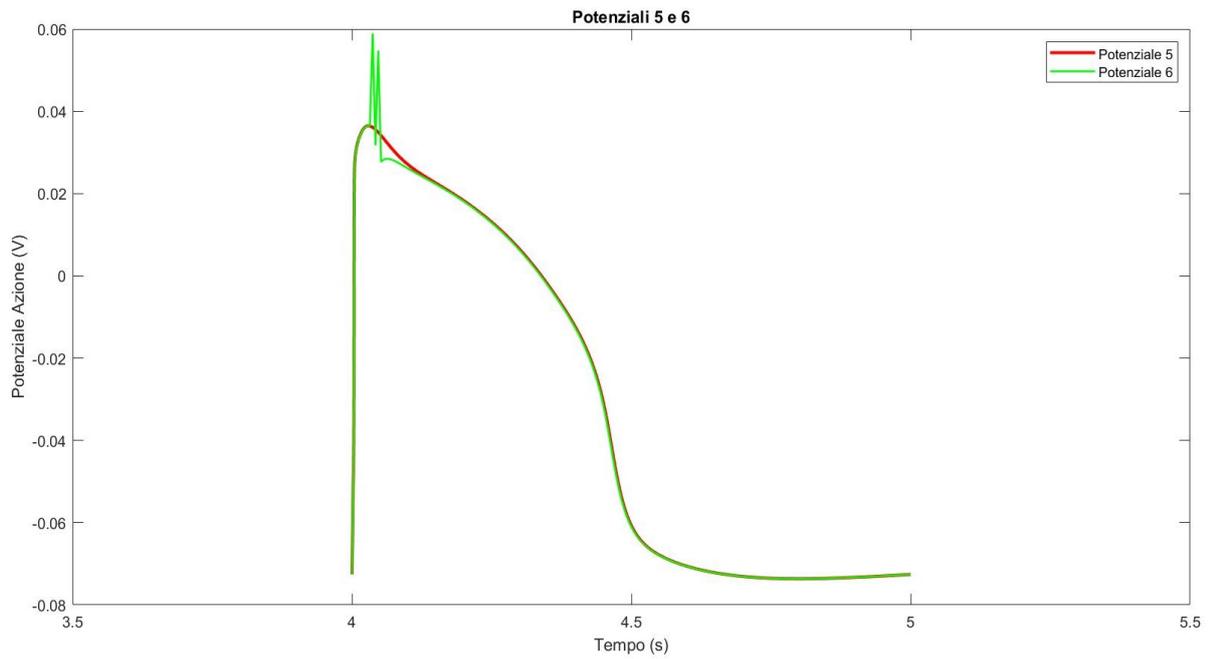


Figura 26: rappresentazione grafica dei potenziali d'azione prima (potenziale 5) e dopo (potenziale 6) l'applicazione della CCM per evidenziarne l'allungamento.

Questa differenza di durata sottolinea l'impatto significativo della CCM sulla dinamica del potenziale d'azione dei cardiomiociti hiPSC-CMs.

In figura 27 si può vedere uno zoom della ripolarizzazione dovuta all'introduzione della CCM

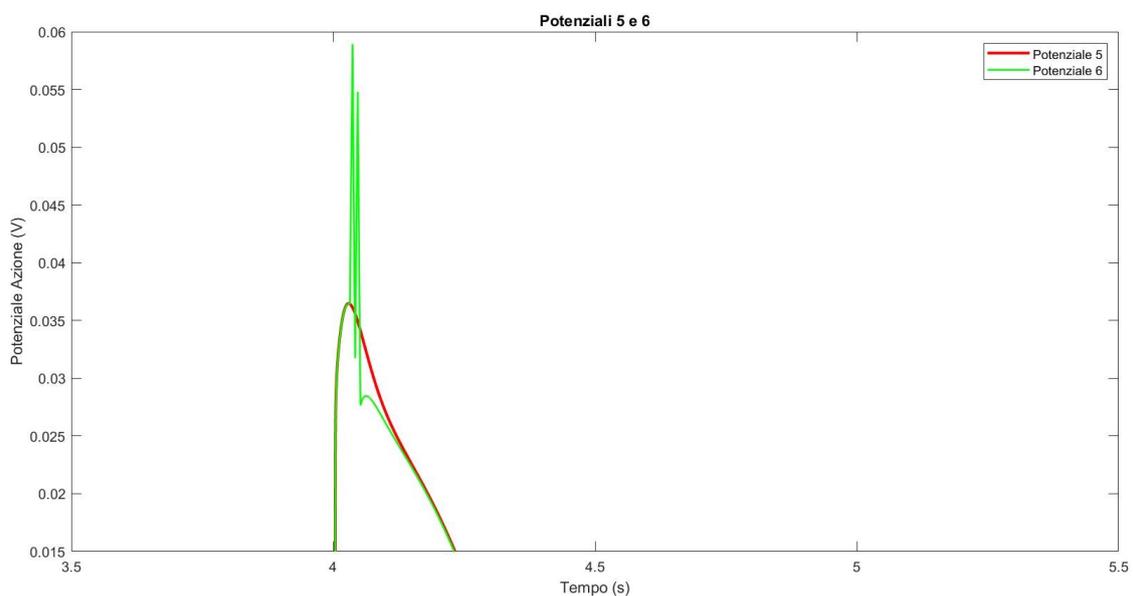


Figura 27: zoom sulla ripolarizzazione per mettere in evidenza gli effetti della CCM

Se osserviamo attentamente l'andamento del potenziale d'azione rappresentato nella figura 25, notiamo un interessante fenomeno: dopo una fase di variazione, l'intensità del segnale elettrico torna a stabilizzarsi ai livelli iniziali, quando era stimolato solamente tramite il singolo impulso. È come se il sistema tornasse alla sua condizione di partenza, dopo una momentanea perturbazione. I risultati presentati in figura 25 quantificano in modo preciso l'effetto dell'impulso quadrato bifasico (Feaster et al. [28]) sulla durata dei potenziali, integrando le informazioni delle figure 23 e 24.

Si può quindi dire che l'analisi approfondita del potenziale d'azione nella Figura 25 rivela un'influenza notevole dell'onda quadra bifasica di Feaster. L'aumento iniziale di ampiezza, probabilmente dovuto a un incremento del flusso di ioni calcio, potrebbe migliorare la forza di contrazione dei cardiomiociti e quindi la funzione cardiaca. Tuttavia, il successivo ritorno all'ampiezza iniziale suggerisce che questo effetto sia temporaneo e necessiti di una stimolazione continua.

5.2 Transiente del Calcio

Modello Paci

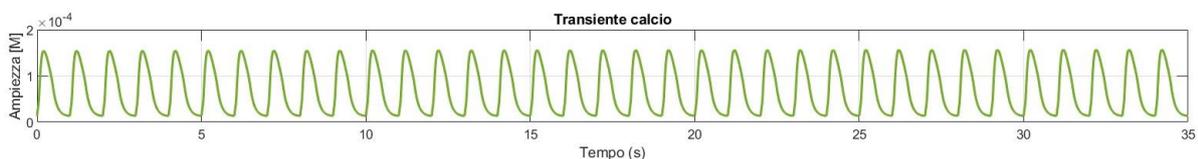


Figura 28: Andamento del transiente del calcio ottenuto tramite l'utilizzo del codice MATLAB Paci2020.

Modello assenza stimolazione alternato con protocollo Feaster usando l'implementazione del modello MATLAB di Paci

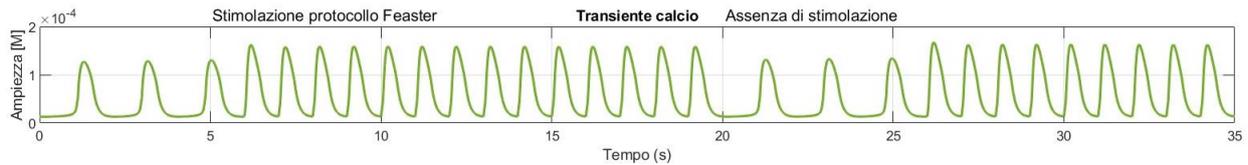


Figura 29: Andamento del transiente del calcio ottenuto a partire dal codice MATLAB Paci2020 con l'aggiunta delle modifiche introdotte dallo studio Feaster.

Modello stimolazione solo Paci alternata con protocollo Feaster usando l'implementazione del modello MATLAB di Paci

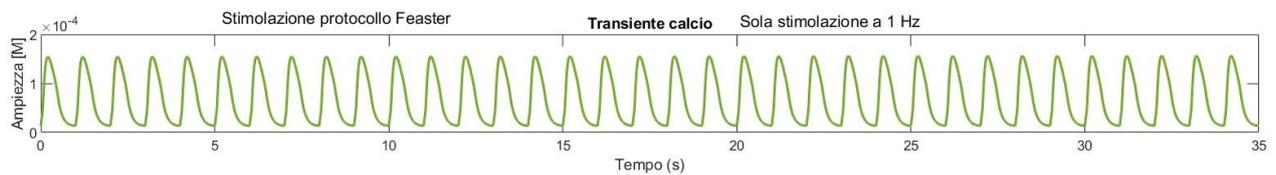


Figura 30: Andamento del transiente del calcio ottenuto a partire dal codice MATLAB Paci2020 con l'aggiunta delle modifiche introdotte dallo studio Feaster mettendo in evidenza la differenza che si crea con la sola stimolazione Paci e con la stimolazione Paci e Feaster unite.

Come evidenziato nelle figure 28 e 29, l'introduzione della CCM induce diverse modifiche nella gestione del calcio all'interno dei cardiomiociti derivati da cellule staminali pluripotenti indotte umane (hiPSC-CMs).

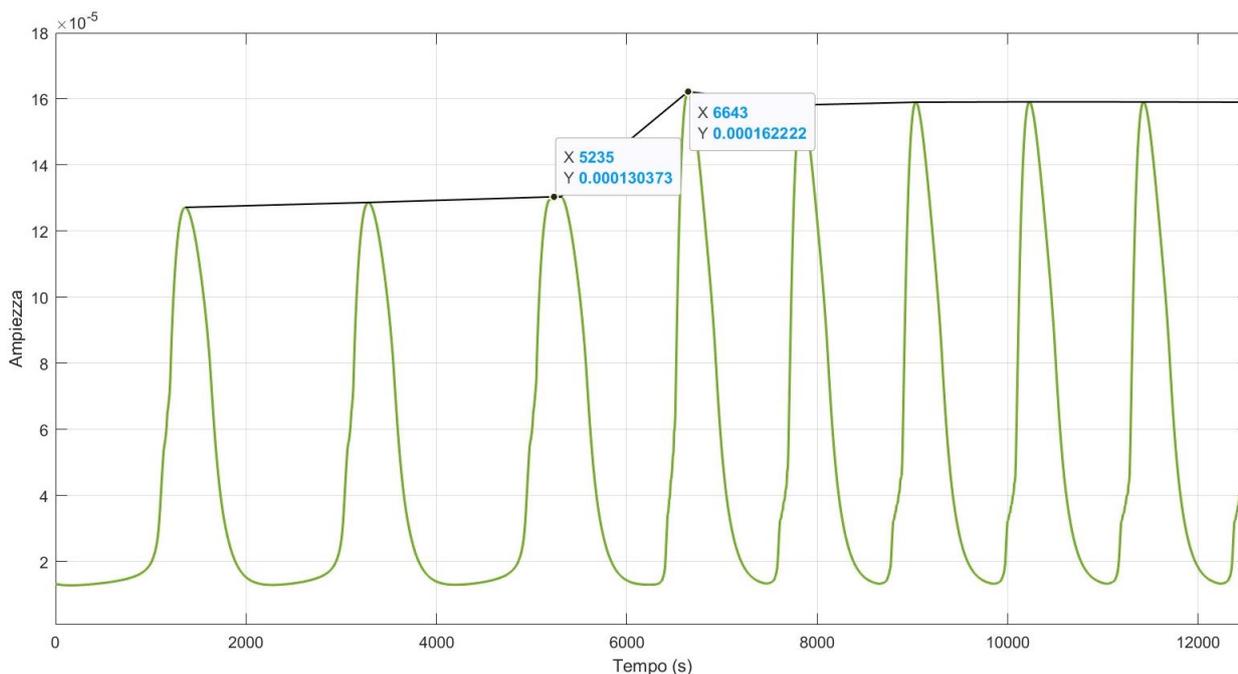


Figura 31: In figura viene messo in evidenza l'andamento del transiente del calcio e in particolare la differenza di altezza del picco di ingresso del calcio.

Come si può notare in figura 31, in presenza della stimolazione CCM, si osserva un picco di ingresso del calcio significativamente più alto rispetto all'assenza di stimolazione. Questo incremento è principalmente dovuto all'aumento della disponibilità di calcio all'interno del cardiomiocita, indotto dagli impulsi elettrici della CCM.

L'aumento dell'ingresso di calcio indica una maggiore attivazione dei canali ionici del calcio di tipo L, responsabili del flusso di calcio all'interno delle cellule. Questa attivazione intensificata può tradursi in una forza di contrazione più forte del cardiomiocita, con potenziali implicazioni benefiche per la funzione cardiaca.

Il transiente del calcio, ovvero l'aumento transitorio della concentrazione intracellulare di calcio, è un evento fondamentale per la contrazione del muscolo cardiaco. Durante un potenziale d'azione, l'ingresso di calcio nelle cellule muscolari cardiache (cardiomiociti) innesca la liberazione di calcio dal reticolo sarcoplasmatico, determinando un aumento marcato della concentrazione

intracellulare di calcio. Questa fase, detta plateau del potenziale d'azione, è prolungata durante la CCM.

Il prolungamento del plateau del calcio nella CCM è dovuto principalmente a due fattori:

- a. Aumentata disponibilità di calcio: la CCM determina un aumento della quantità di calcio disponibile per l'ingresso nella cellula e per la sua liberazione dal reticolo sarcoplasmatico. Questo incremento contribuisce a prolungare la fase di plateau e a potenziare la contrazione muscolare.
- b. Riduzione dell'attività della pompa SERCA: la pompa SERCA è responsabile della rimozione del calcio dal citoplasma, riportandolo nel reticolo sarcoplasmatico. La sua attività ridotta nella CCM determina un rallentamento della ricaptazione del calcio, prolungando così il transiente del calcio e favorendo una contrazione più prolungata e vigorosa.

Tale prolungamento potrebbe avere implicazioni sia positive che negative per la funzione cardiaca: per quanto riguarda il suo effetto positivo, un plateau del calcio più lungo potrebbe migliorare l'efficienza del pompaggio cardiaco, permettendo al cuore di pompare più sangue con minor dispendio di energia. Se andiamo a vedere il lato negativo di tale prolungamento, un plateau del calcio eccessivamente prolungato potrebbe aumentare il rischio di aritmie cardiache, alterazioni del ritmo cardiaco dovute a un'eccessiva eccitabilità del miocardio.

L'analisi della Figura 29 rivela che la rimozione della stimolazione a onda quadra bifasica, introdotta da *Feaster et al [28]*, non comporta modifiche apprezzabili nel fenomeno osservato.

Similmente, in Figura 30, in cui si alterna la stimolazione secondo il protocollo di *Feaster* e la stimolazione a impulso singolo proposto da *Paci et al. [49]*, non mostra differenze significative nell'andamento del transiente del calcio.

Questi risultati indicano che entrambi i tipi di stimolazione, pur essendo differenti, non esercitano un'influenza rilevante sul processo biologico in esame.

5.3 Contrattilità Cardiaca (Forza)

Paci

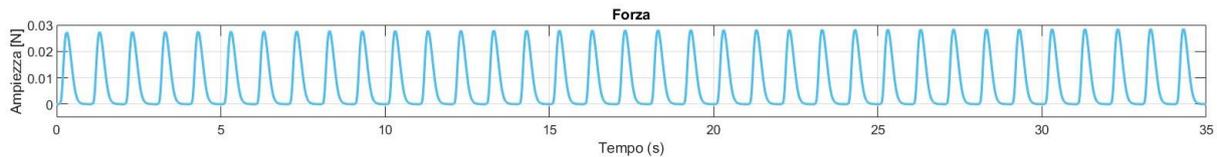


Figura 32: Andamento della forza di contrazione ottenuto tramite l'utilizzo del codice MATLAB Paci2020.

Modello assenza stimolazione alternato con protocollo Feaster usando l'implementazione del modello MATLAB di Paci

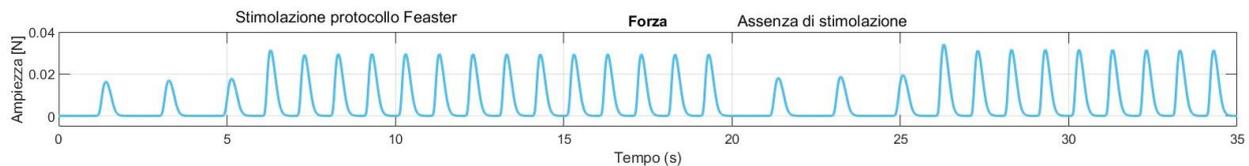


Figura 33: Andamento della forza di contrazione ottenuto a partire dal codice MATLAB Paci2020 con l'aggiunta delle modifiche introdotte dallo studio Feaster.

Modello stimolazione solo Paci alternata con protocollo Feaster usando l'implementazione del modello MATLAB di Paci



Figura 34: Andamento della forza di contrazione ottenuto a partire dal codice MATLAB Paci2020 con l'aggiunta delle modifiche introdotte dallo studio Feaster mettendo in evidenza la differenza che si crea con la sola stimolazione Paci e con la stimolazione Paci e Feaster unite.

Come evidenziato dai grafici di Figura 33, la forza di contrazione dei cardiomiociti hiPSC-CMs presenta una variabilità nel tempo. Tuttavia, si osserva un netto incremento della forza di contrazione in presenza della CCM rispetto all'assenza di stimolazione (come si può notare in figura 31).

Questo aumento di forza contrattile è principalmente dovuto all'effetto della CCM sulla disponibilità di calcio all'interno dei cardiomiociti: la CCM aumenta l'ingresso di calcio nelle cellule e ne riduce la rimozione, rendendo il calcio più disponibile per la contrazione muscolare.

Le figure 32 e 33 forniscono una visione più approfondita dell'impatto della CCM sulla forza di contrazione. Si osserva un incremento significativo della forza contrattile durante la stimolazione CCM rispetto ai periodi senza stimolazione; questo incremento è particolarmente evidente nel primo battito dopo l'introduzione della CCM, con un picco di tensione più alto e una cinetica di contrazione e rilassamento più rapida rispetto all'assenza di stimolazione.

L'aumento della forza di contrazione indica una maggiore capacità dei cardiomiociti di generare forza durante la sistole, la fase di contrazione del cuore. Questo potrebbe tradursi in un miglioramento della gittata sistolica, ovvero della quantità di sangue pompata dal cuore ad ogni contrazione, con potenziali benefici per la funzione cardiaca.

L'analisi visiva dei grafici ottenuti alternando fasi di assenza e di stimolazione tramite protocollo FESTER ha evidenziato che la CCM, oltre ad incrementare la forza di contrazione, induce un lieve aumento della velocità di contrazione e rilassamento dei cardiomiociti. L'ispezione dei tracciati ha permesso di attribuire tale effetto, in parte, all'accresciuta disponibilità di calcio intracellulare e, in parte, all'attivazione di ulteriori meccanismi contrattili e di rilassamento. La maggiore pendenza delle curve relative alla fase di contrazione e rilassamento suggerisce un'accelerazione della cinetica contrattile, potenzialmente in grado di ottimizzare l'efficienza di

pompaggio cardiaco. Tuttavia, l'allungamento del plateau della forza di contrazione, chiaramente visibile nei grafici, ha evidenziato un prolungamento della fase di sistole, che potrebbe compromettere il riempimento diastolico e ridurre la gittata cardiaca.

L'assenza dell'onda quadra bifasica caratteristica del protocollo di Feaster non sembra influenzare in modo apprezzabile l'evoluzione temporale della forza di contrazione. Come mostrato in Figura 33, la curva ottenuta con questa stimolazione risulta praticamente identica a quella ottenuta con il protocollo di Paci, indicando che la componente bifasica non apporta un contributo significativo all'attivazione della contrazione nel modello considerato.

CAPITOLO 6

CONCLUSIONI

Nel campo della medicina rigenerativa, la Modulazione della Contrazione Cardiaca (CCM) emerge come una possibile soluzione rivoluzionaria per riparare e rigenerare il tessuto cardiaco danneggiato. Lo studio condotto da Feaster, oggetto di questa analisi, ha esplorato gli effetti complessi della CCM sui cardiomiociti derivati da cellule staminali pluripotenti indotte umane (hiPSC-CMs), aprendo nuove strade verso potenziali terapie cardiache.

Dall'analisi svolta nel confronto tra l'assenza di stimolazione e la combinazione di stimolazione tramite impulso singolo (elaborato da Paci2020) e onda quadra bifasica (come riporta lo studio condotto da *Feater et al* [25]) si può affermare che la CCM agisce sulla forma d'onda del potenziale d'azione delle hiPSC-CMs, il segnale elettrico che regola la loro contrazione.

Tuttavia, gli effetti della CCM non si limitano a modificare il potenziale d'azione delle hiPSC-CMs poiché, tale stimolazione, regola anche un altro processo fondamentale per la contrazione cardiaca: la gestione del calcio. Favorire l'ingresso di calcio nelle cellule potrebbe aumentare la gittata sistolica, la quantità di sangue pompata ad ogni battito, un beneficio per pazienti con cuore debole.

In ultimo, dai dati grafici è emerso che la CCM non solo incrementa la forza di contrazione delle hiPSC-CMs, ma ne accelera anche la cinetica contrattile, rendendole più "veloci e agili". Inoltre, una valutazione dei dati ha mostrato una maggiore pendenza delle curve relative alla fase di contrazione e rilassamento, suggerendo un'ottimizzazione del ciclo cardiaco e un miglioramento dell'efficienza di pompaggio.

I risultati più significativi per questo elaborato di tesi derivano dall'analisi degli effetti che ha avuto la CCM su potenziale d'azione, transiente del calcio e forza di contrazione una volta applicata l'alternanza tra la sola stimolazione tramite modello Paci2020 e la

stimolazione descritta dal protocollo Feaster, avvicinandoci così maggiormente a quanto studiato da *Feaster et al* [28], principale oggetto di studio di questo elaborato. L'obiettivo di tale alternanza è stato quello di mettere maggiormente in evidenza le migliorie apportate al modello grazie allo studio condotto da *Feaster et al* [28].

I risultati ottenuti evidenziano come l'alternanza di stimolazione Paci e Feaster causi un accorciamento del potenziale d'azione, effetto comune a entrambi i modelli. Tuttavia, la combinazione dei due modelli non riesce a mantenere le modifiche indotte dalla sola stimolazione Paci a livello di altri parametri fisiologici, come il transiente del calcio e la forza di contrazione. In particolare, l'aggiunta dell'onda bifasica caratteristica del modello Feaster sembra interferire con i meccanismi cellulari alla base delle variazioni di calcio, ripristinando un meccanismo di attivazione più simile a quello osservato in condizioni di stimolazione a singolo impulso (1 Hz) secondo il modello Paci.

L'accorciamento del potenziale d'azione, comune a entrambe le stimolazioni, è un fenomeno di notevole interesse in quanto influisce sulla durata della fase refrattaria e sulla frequenza massima di scarica delle fibre muscolari. Questa modificazione può avere importanti implicazioni sulla forza tetanica e sulla fatica muscolare.

L'alternanza di stimolazione ha rivelato un meccanismo di modulazione selettiva dell'attività elettrica cardiaca, influenzando specificatamente il potenziale d'azione senza compromettere significativamente il transiente del calcio e la forza di contrazione. Questo dato suggerisce l'esistenza di meccanismi cellulari altamente specializzati che dissociano la componente elettrica dalla meccanica della contrazione cardiaca.

Tale scoperta ha importanti implicazioni per la comprensione dei meccanismi fisiologici che regolano l'attività cardiaca e apre nuove

prospettive per lo sviluppo di strategie terapeutiche mirate. Intervenedo selettivamente sulla componente elettrica, potrebbe essere possibile correggere aritmie cardiache senza compromettere la funzione pompante del cuore.

Per comprendere a fondo questi meccanismi, sono necessarie ulteriori indagini a livello cellulare e molecolare. Sarà fondamentale caratterizzare i canali ionici specifici coinvolti nella generazione e nella propagazione del potenziale d'azione, nonché i meccanismi di regolazione della concentrazione intracellulare di calcio.

I risultati di questo studio suggeriscono che la CCM potrebbe essere una strategia promettente per migliorare la funzionalità del cuore in pazienti con malattie cardiache, ma il suo percorso verso la pratica clinica richiederà un'attenta ottimizzazione e una valutazione rigorosa dei suoi effetti a lungo termine.

I risultati di questo studio *in silico* evidenziano il ruolo cruciale dei modelli computazionali di potenziali d'azione sia nella predizione che nella conferma di dati sperimentali. Da un lato, i modelli permettono di simulare scenari virtuali e di prevedere l'impatto di diverse variabili sui potenziali d'azione, facilitando la progettazione di nuovi esperimenti. Dall'altro lato, la capacità di riprodurre i risultati sperimentali esistenti valida i modelli e ne consolida l'affidabilità. In conclusione, lo studio *in silico* si configura come un approccio complementare alle tecniche sperimentali, offrendo nuove prospettive per la comprensione e il trattamento delle patologie correlate ai potenziali d'azione.

Sicuramente si è potuto dimostrare che la CCM potrebbe essere una chiave importante per sbloccare nuove terapie e salvare vite umane.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

1. Abi-Samra F., Gutterman D. "Cardiac contractility modulation: a novel approach for the treatment of heart failure" PMID: 27394714 PMCID: PMC5082590 DOI: 10.1007/s10741-016-9571-6 in National Library of Medicine [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27394714/;](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27394714/)
2. Abraham WT, Lindenfeld J, Reddy VY, Hasenfuss G, Kuck KH, Boscardin J, Gibbons R, Burkhoff D; FIX-HF-5C Investigators and Coordinators. A randomized controlled trial to evaluate the safety and efficacy of cardiac contractility modulation in patients with moderately reduced left ventricular ejection fraction and a narrow QRS duration: study rationale and design. J Card Fail. 2015 Jan;21(1):16-23.
3. Anker SD, Borggrefe M, Neuser H, et al. Cardiac contractility modulation improves long-term survival and hospitalizations in heart failure with reduced ejection fraction. Eur J Heart Fail 2019;21:1103-13.
4. Ai, Z., et al. "Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes: A Review of Their Characteristics and Potential Applications." Journal of Molecular and Cellular Cardiology 51.6 (2012): 825-836;
5. AIAC (2022) "Terapie innovative nello scompenso cardiaco: la modulazione della contrattilità cardiaca" [https://aiac.it/aggiornamento/notizie-e-commenti/aiac-per-il-paziente/terapie-innovative-nello-scompenso-cardiaco-la-modulazione-della-contrattilita-cardiaca/;](https://aiac.it/aggiornamento/notizie-e-commenti/aiac-per-il-paziente/terapie-innovative-nello-scompenso-cardiaco-la-modulazione-della-contrattilita-cardiaca/)
6. American Heart Association: [https://www.heart.org/;](https://www.heart.org/)
7. Anker SD, Borggrefe M, Neuser H, et al. "Cardiac contractility modulation improves long-term survival and hospitalizations in heart failure with reduced ejection fraction" Eur J Heart Fail 2019;

8. Antzelevitch, T., et al. "Electrical Excitability and Arrhythmogenesis: From Basic Science to Clinical Translation." *Circulation Research* 120.4 (2017): 611-661;
9. Anselmo Simone: Ricerca di mutazioni in proteine associate ai canali HCN in pazienti affetti da disturbi del ritmo cardiaco ed epilessia idiopatica.
https://air.unimi.it/bitstream/2434/169154/4/phd_unimi_R08185.PDF
10. Barbuti A., Mazzani M., Zoia Stefano "I canali HCN e il loro ruolo nell'eccitabilità cardiaca e neuronale" Tesi dottorato di Ricerca Università degli Studi di Milano 2012-2013
file:///E:/CCM/phd%20unimi.pdf;
11. Basi del potenziale d'azione (PdA): potenziale di membrana di riposo
<https://www.microbiologiaitalia.it/didattica/potenziale-dazione/>
12. Bers, D. M. "Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractility: Studies Based on Cardiac Myocytes and Isolated Hearts." *Progress in Cardiovascular Diseases* 48.1 (2005): 3-29;
13. Bers, D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(6868), 198-205.
<https://doi.org/10.1038/415198a>
14. Blinova, K., Q. Dang, ., G. Gintant. 2018. International multisite study of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for drug proarrhythmic potential assessment. *Cell Rep.* 24:3582-3592.
15. Beuches, S., et al. "Calcium and Excitation-Contraction Coupling in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 58 (2013): 140-150;

16. Borggrefe MM, Lawo T, Butter C, Schmidinger H, Lunati M, Pieske B, Misier AR, Curnis A, Böcker D, Remppis A, Kautzner J, Stühlinger M, Leclercq C, Táborsky M, Frigerio M, Parides M, Burkhoff D, Hindricks G. Randomized, double blind study of non-excitatory, cardiac contractility modulation electrical impulses for symptomatic heart failure. Eur Heart J. 2008 Apr;29(8):1019-28.
17. Burrige et al., 2020 "Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes: Advancing Cardiac Disease Modeling and Drug Discovery." <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8245367/>;
18. Cheng, H., et al. "Enhanced Force Generation and Calcium Handling by Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes After Gene Editing of SERCA2a." Circulation Research 122.2 (2018): 270-280;
19. Choi, K. J., et al. "Action Potential and Contraction Characteristics of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes." Journal of Molecular and Cellular Cardiology 51.6 (2012): 860-867;
20. Cuore: funzionamento e malattie cardiache: <https://healthy.thewom.it/anatomia-e-fisiologia/cuore/>
21. Cuore: sistema di propagazione dell'impulso elettrico <https://nursetimes.org/cuore-sistema-propagazione-dellimpulso-elettrico/14837>
22. De Giusti Marco "La modulazione della contrattilità cardiaca: una nuova arma contro lo scompenso cardiaco" https://www.centrolottainfarto.com/allnews/la-modulazione-della-contrattilita-cardiaca-una-nuova-arma-contro-lo-scompenso-cardiaco/#_edn14;
23. DeStefano, M. E., et al. "Cardiac Electrical Restitution and Arrhythmogenesis." Frontiers in Physiology 8 (2017): 472;

24. E. Passini, "Population of model: the importance of biological variability and how to include it in cardiac computational modeling", Alma Mater Studiorum Università di Bologna, seminario novembre 2014
25. Esch et al., 2014: "Cardiac Contractility: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications." https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-19131-3_3;
26. Feaster TK, Casciola M, Narkar A, Blinova K. "Cardiac contractility modulation: Computational modeling in isolated cardiomyocytes" <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34729935/>;
27. Feaster et al., 2019 "A Human iPSC-Based Platform for Physiological and Pharmacological Studies of Cardiac Contractility." <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10771368/>;
28. Feaster TK, Maura Casciola, Akshay Narkar, Ksenia Blinova in "Acute effects of cardiac contractility modulation on human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes"
29. Feaster, S. J., et al. (2019) "A high-throughput drug discovery platform for evaluating in vitro human cardiac contractility using induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes" *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 369(1), 108;
30. Feaster, S. J., et al. "Modulation of Cardiac Contraction Dynamics by Electrical Field Stimulation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes." *Circulation Research* 132.10 (2023): 1254-1267;
31. *Giornale Italiano di Cardiologia* (2021) "Modulazione della contrattilità cardiaca: un'opzione terapeutica per il paziente con insufficienza cardiaca refrattaria" <https://www.giornaledicardiologia.it/archivio/3557/articoli/35341/>;

32. Giornale Italiano di Cardiologia (2023) "Modulazione della contrattilità cardiaca nello scompenso cardiaco a frazione di eiezione ridotta: revisione critica delle evidenze ed aspetti decisionali pratici "
[https://www.giornaledicardiologia.it/archivio/3660/articoli/36450/;](https://www.giornaledicardiologia.it/archivio/3660/articoli/36450/)
33. Gindro R."Cuore: funzionamento e malattie cardiache"
<https://healthy.thewom.it/anatomia-e-fisiologia/cuore/;>
34. GitHub per modello Paci:
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/circulationaha.112.000570;>
35. Gullà F. "Analisi Computazionale della Morfologia del Potenziale d'Azione in un Cardiomiocita Atriale Umano in Risposta a Variazioni di Calcio Extracellulare"
https://amslaurea.unibo.it/5841/1/gulla_francesca_tesi.pdf;
36. Heidenreich PA, Bozkurt B, Aguilr D, et al: 2022 "AHA/ACC/HFSA Guideline for theManagement of Heart Failure: A report of the American College of Cardiology/American Heart Assocation Joint Committee n Clinical Practice Guidelines. Circulation" 145:e876-e894, 2022 doi : 10.1161/cir.0000000000001062;
37. Hodgkin e Huxley (1952) "A Quantitative Description of Membrane Current and Its Application to Conduction and Excitation in Nerve";
38. International Society for Stem Cell Research:
[https://www.isscr.org/;](https://www.isscr.org/)
39. Italian Journal of Cardiology "Terapia di modulazione della contrattilità cardiaca: basi molecolari e rationale per l'impiego in modelli di insufficienza cardiaca sistolica e diastolica"
[https://www.giornaledicardiologia.it/archivio/3660/articoli/36450/;](https://www.giornaledicardiologia.it/archivio/3660/articoli/36450/)

40. JoVE Protocol "Evaluation of Cardiac Contractility Modulation Therapy in 2D Human Stem Cell-Derived Cardiomyocytes" <https://www.jove.com/t/64848/evaluation-cardiac-contractility-modulation-therapy-2d-human-stem>;
41. J. Ma, L. Guo, S. J. Fiene, B. D. Anson, J. A. Thomson, T. J. Kamp, K. L. Kolaja, B. J. Swanson, and C. T. January, "High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: electrophysiological properties of action potentials and ionic currents.," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 301, no. 5, pp. H2006-17, 2011
42. Jurgen Kuschyk, Peter Falk, Thomas Demming, Oliver Marx, Deborah Morley, Ishu Rao, Daniel Burkhoff "Long-term clinical experience with cardiac contractility modulation therapy delivered by the Optimizer Smart system" 2021
43. Kuschyk J., Falk P., Demming T., Marx O., Morley D, Rao I, Burkhoff D. "Esperienza clinica a lungo termine con la terapia di modulazione della contrattilità cardiaca fornita dal sistema Optimizer Smart" <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.translate.google/34002440/>;
44. M. Honda, J. Kiyokawa, M. Tabo, and T. Inoue, "Electrophysiological characterization of cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells.," *J. Pharmacol. Sci.*, vol. 117, no. 3, pp. 149-59, 2011.
45. Maccione, A., et al. "Electrical Field Stimulation Promotes Cardiac Differentiation and Contraction of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes." *Biomaterials* 32.15 (2011): 3719-3728;
46. Monfredi o., Dobrzynski H. Mondal T. Boyett MR and Morris GM. "The anatomy and physiology of the sinoatrial node - A contemporary review. *Pcing Clin Electrophysiol* " 2010;
47. Neelagaru SB, Sanchez JE, Lau SK, et al. Nonexcitatory, cardiac contractility modulation electrical impulses:

- feasibility study for advanced heart failure in patients with normal QRS duration. Heart Rhythm 2006;3:1140-7.
48. NIH National Heart, Lung, and Blood Institute: [https://www.nhlbi.nih.gov/;](https://www.nhlbi.nih.gov/)
 49. Paci M., Elisa Passini, Aleksandra Klimas, Stefano Severi, Jari Hyttinen, Blanca Rodriguez,² and Emilia Entcheva in "All-Optical Electrophysiology Refines Populations of In Silico Human iPSC-CMs for Drug Evaluation"
 50. Paci M., Penttinen K., Pekkanen-Mattila M., T Koivumäki J. Arrhythmia Mechanisms in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33323698/;](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33323698/)
 51. Paci et al. (2013): A Physiologically Based Model of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes;
 52. Patel, P., et al. "Calcium Handling in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes: A Review of Current Understanding and Future Directions." Stem Cells International 2014 (2014): 820175;
 53. Potenziale di membrana e il potenziale d'azione <https://www.biopills.net/potenziale-di-membrana-potenziale-azione/>
 54. Richard E. Cardiovascular Physiology Concepts Lippincott Williams & Wilkins; 2° edizione (2011);
 55. Romanò M. "Principi generali di anatomia ed elettrofisiologia cellulare";
 56. Sanità & Benessere in <https://www.sanitaebenessere.it;>
 57. Sachse F. LNCS 2966 "Computational Cardiology";
 58. Website del Cardiac Electrophysiology Laboratory: [https://www.ouh.nhs.uk/services/referrals/cardiothoracic/rhythm/electrophysiology.aspx;](https://www.ouh.nhs.uk/services/referrals/cardiothoracic/rhythm/electrophysiology.aspx)

59. Yoram R. "Cardiac electrophysiology, a modeling and imaging approach" <https://rudylab.wustl.edu/publications/book-cardiac-electrophysiology-a-modeling-and-imaging-approach/>;
60. Yücel G., Fastner C., Hetjens S., Toepel M., Schmiel G, Yazdani B., Husain-Syed F., Liebe V., Rudic B., Akin J., Borggreffe M., Kuschyk J. "Impatto della frazione di eiezione ventricolare sinistra al basale sugli esiti a lungo termine nella terapia di modulazione della contrattilità cardiaca" <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35262210/>;

Casi studio:

61. AMS Tesi di Laurea (2022) Modulazione della contrattilità cardiaca <https://amslaurea.unibo.it/30213/>;
62. <https://appuntiuniversitari.online/wp-content/uploads/2020/05/85.pdf>;
63. <https://app.testammissione.com/potenziale-dazione-cardiaco/>;
64. Italian Cardiologist of Tomorrow (2023) Utilizzo della Cardiac Contractility Modulation e della Mitraclip in paziente con scompenso cardiaco a frazione moderatamente ridotta ed insufficienza mitralica severa <https://www.italiancot.it/2023/04/07/utilizzo-della-cardiac-contractility-modulation-e-della-mitraclip-in-paziente-con-scompenso-cardiaco-a-frazione-moderatamente-ridotta-ed-insufficienza-mitralica-severa/>;
65. <https://nursetimes.org/cuore-sistema-propagazione-dellimpulso-elettrico/14837>;
66. <https://app.testammissione.com/potenziale-dazione-cardiaco/>
67. <https://impulse-dynamics.com/global/ccm-information/>.

