

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA

II FACOLTA' DI INGEGNERIA CON SEDE A CESENA
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**Analisi comparativa di modelli
matematici di potenziale d'azione
atriale umano**

Elaborato in

Bioingegneria Molecolare e Cellulare LM

Relatore:

Prof. Stefano Severi

Presentata da:

Lucia Bandiera

Correlatore:

Dott.sa Elisa Passini

Sessione II

Anno accademico 2011-2012

*Vorrei essere libero, libero come un uomo.
Come l'uomo più evoluto che si innalza con la propria intelligenza
e che sfida la natura con la forza incontrastata della scienza,
con addosso l'entusiasmo di spaziare senza limiti nel cosmo
e convinto che la forza del pensiero sia la sola libertà.*

Da "La libertà"

Tratta da "Dialogo tra un impegnato e un non so"

Giorgio Gaber(1972)

INDICE

OBIETTIVI	3
CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	5
1.1 Il cuore ed il sistema cardiocircolatorio	5
1.1.1 Anatomia del cuore	5
1.1.2 Il ciclo cardiaco	6
1.1.3 Il sistema di conduzione cardiaco	7
1.2 Elettrofisiologia cardiaca	9
1.2.1 Il cardiomiocita	9
1.2.2 La membrana cellulare ed i canali ionici .	10
1.2.3 I canali ionici cardiaci	12
1.2.4 Il potenziale d'azione cardiaco	14
1.2.5 Il reticolo sarcoplasmatico e la dinamica del calcio intracellulare	16
CAPITOLO 2: MODELLISTICA DELL'ELETTROFISIOLOGIA CARDIACA	19
2.1 Nascita della modellistica elettrofisiologica ..	20
2.1.1 Il modello di Hodgkin-Huxley	21
2.1.2 Storia dei modelli di potenziale d'azione cardiaco	24
2.2 Tecniche sperimentali per la caratterizzazione di correnti ioniche e del potenziale d'azione ..	25
2.2.1 <i>Current-clamp</i>	25
2.2.2 <i>Voltage-clamp</i>	26
2.2.3 <i>Patch-clamp</i>	26

2.3 Caratterizzazione del potenziale d'azione: memoria, restituzione e rientro	28
CAPITOLO 3: PRIME SIMULAZIONI DEL POTENZIALE D'AZIONE ATRIALE UMANO	31
3.1 Courtemanche-Ramirez-Nattel	32
3.1.1 Formulazione dei flussi ionici	33
3.1.2 Caratteristiche del PA	38
3.2 Nygren et al.	43
3.2.1 Formulazione dei flussi ionici	44
3.2.2 Morfologia del PA simulato	46
3.3 I due modelli a confronto	51
CAPITOLO 4: MODELLI RECENTI DI MIOCITI ATRIALI UMANI	53
4.1 Maleckar et al.	53
4.1.1 Formulazione dei flussi ionici	54
4.1.2 Morfologia e ripolarizzazione del PA	57
4.2 Koivumäki et al.	60
4.2.1 Dinamica del calcio intracellulare e APD .	62
4.2.2 Adattamento in frequenza dell'APD	66
4.3 Grandi et al	69
4.3.1 Modifiche apportate al modello ventricolare per riprodurre il PA atriale.....	70
4.3.2 Adattamento in frequenza dell'APD.....	73
CONFRONTI E CONCLUSIONI	79
BIBLIOGRAFIA	89
RINGRAZIAMENTI	97

OBIETTIVI

Nel contesto dell'elettrofisiologia computazionale e del suo impiego per la comprensione di processi pato-fisiologici cardiaci, il presente lavoro di tesi propone un'analisi comparativa dei modelli matematici di potenziale d'azione di cardiomiociti atriali umani.

Le difficoltà riscontrate nell'allestimento di prove sperimentali *in vitro*, e la conseguente scarsità di dati misurati su cellule umane, identificano nella modellistica matematica uno strumento di grande utilità per l'interpretazione dei meccanismi ionici che determinano il funzionamento fisiologico dei cardiomiociti, dalla cui alterazione derivano manifestazioni patologiche. Oltre all'evidente ruolo nella ricerca di base, lo sviluppo della modellistica cardiaca è stimolato dalla potenziale applicazione nel processo di diagnosi e pianificazione di interventi terapeutici.

L'elaborato ripercorre l'evoluzione storica dei modelli di potenziale d'azione atriale umani, in cui si riscontra il vantaggio derivante da una crescente disponibilità di dati sperimentali acquisiti su singola cellula e dal corrispondente ampliamento delle conoscenze circa il funzionamento di cardiomiociti atriali.

- Nel primo capitolo vengono brevemente illustrati la fisiologia del sistema cardiocircolatorio e gli elementi di base dell'elettrofisiologia cardiaca.

- Nel secondo capitolo viene riportata l'evoluzione storica della modellistica del potenziale d'azione e si delineano le tecniche sperimentali utilizzate per l'acquisizione dei dati su cui questa si fonda.
- Nel terzo capitolo si prendono in esame i primi tentativi di simulazione del potenziale d'azione atriale umano, analizzando i modelli di Courtemanche-Ramirez-Nattel (1998) e Nygren et al. (1998). Ne viene valutata la struttura cellulare proposta, l'implementazione analitica delle correnti ioniche di sarcolemma e del reticolo sarcoplasmatico e l'impatto di queste sulla morfologia e sulle proprietà di restituzione del potenziale d'azione riprodotto.
- Nel quarto capitolo si analizzano i modelli di potenziale d'azione atriale umano più recenti: Maleckar et al. (2008), Koivumäki et al. (2011) e Grandi et al. (2011). I primi due, derivati dal modello di Nygren et al. sono focalizzati, rispettivamente, sulla fedele riproduzione delle curve di restituzione della durata del potenziale d'azione e sulla dettagliata descrizione della dinamica del Ca^{2+} intracellulare. Il modello di Grandi et al. si discosta dai precedenti poiché adattato dal modello di cardiomiocita ventricolare sviluppato dallo stesso gruppo di ricerca.
- Nell'ultimo capitolo si sottolineano le innovazioni distintive dei singoli modelli considerati e se ne confrontano le principali caratteristiche. Inoltre, si cerca di evidenziare per ognuno i principali punti di forza, così come i limiti, valutandone l'adeguatezza nella riproduzione dei dati sperimentali utilizzati per la loro validazione, e le possibilità di integrazione su larga scala.

CAPITOLO 1:

INTRODUZIONE

1.1 Il cuore ed il sistema cardiocircolatorio

Il sistema cardiocircolatorio, negli organismi di dimensioni superiori al millimetro, è responsabile del rapido trasporto di sostanze (ossigeno, glucosio, amminoacidi, acidi grassi, vitamine, acqua, ormoni e cataboliti) dai punti di produzione o entrata, alle immediate vicinanze dei punti di utilizzo o eliminazione. Il mezzo trasportatore è costituito dal sangue, tessuto che, come stabilito dal medico londinese William Harvey nel 1628, fluisce in un sistema di condotti, i vasi sanguigni appunto, nel senso imposto da valvole ad una via presenti nel cuore e nelle vene. La spinta propulsiva necessaria allo scopo è fornita dalla conversione di energia chimica in meccanica ad opera del cuore.

1.1.1 Anatomia del cuore. Il cuore è un organo muscolare cavo di forma semi-conica, collocato, posteriormente allo sterno, nella cavità toracica. E' costituito da due pompe intermittenti, dette cuore destro e sinistro, che alimentano rispettivamente la circolazione polmonare e sistemica. Ogni metà è articolata in una cavità superiore (atrio), ed una inferiore (ventricolo): in tutto quindi, il cuore consiste di quattro camere distinte. Struttura e dimensione di atri e ventricoli sono correlate alle loro rispettive funzioni. La minor pressione che gli atri devono sviluppare per garantire il flusso sanguigno ai ventricoli, rispetto alla pressione

ventricolare necessaria all'alimentazione dei circoli polmonare e sistemico, ne giustifica infatti il più ridotto volume e spessore di parete. E' peraltro degno di nota che lo sbilanciamento volumetrico tra ventricolo destro e sinistro, coerente con il maggior carico associato al grande circolo, è sostituito, a livello atriale, da un maggior spessore di parete dell'atrio sinistro.



Figura 1.1. Base ventricolare esposta mediante rimozione degli atri.

Gli orifizi attraverso cui si ha ingresso ed uscita di sangue dai ventricoli, sono connotati, come visualizzabile in figura 1.1, dalla presenza di valvole collocate su un piano detto piano valvolare. Le valvole sono membrane collaginee sottili e con flessibilità confrontabile al pericardio. Si

indica con tale termine il sacco, contenente fluido pericardico ad azione lubrificante, che racchiude l'organo cardiaco e, collegandosi superiormente ai tronchi arteriosi ed inferiormente al diaframma, ne limita l'escursione volumetrica.

Le valvole atrio-ventricolari, tricuspide e mitrale, sono connesse ai muscoli papillari i quali, contraendosi in sistole, evitano il danneggiamento delle stesse per inversione nell'atrio e modulano la pressione ventricolare.

1.1.2 Il ciclo cardiaco. Mediante la contrazione del cuore il sangue è pompato, attraverso le arterie, ai distretti corporei periferici. Tali contrazioni si verificano regolarmente, ad una frequenza di circa 72 battiti/minuto (bpm). Ogni onda di contrazione, detta anche periodo di attività, è seguita da un periodo di riposo, unitamente al quale costituisce ciò che è definito ciclo cardiaco.

Ogni ciclo cardiaco si articola in tre fasi che si susseguono nell'ordine:

- **Sistole atriale:** breve contrazione di entrambi gli atri che, originando in corrispondenza alle aperture venose e diffondendo nelle cavità, causa lo svuotamento attraverso l'orifizio atrio-ventricolare nei ventricoli;
- **Sistole ventricolare:** la riduzione del volume delle camere causa l'apertura passiva delle valvole polmonare ed aortica in risposta a gradiente pressorio, permettendo il flusso sanguigno negli omonimi vasi arteriosi. Al cessare della contrazione la diminuzione di pressione nei ventricoli ripristina la chiusura delle valvole semilunari;
- **Diastole:** periodo di riposo, durante il quale l'intero cuore è rilassato ed il sangue fluisce dalle vene cave superiore ed inferiore all'atrio destro, e dalla vena polmonare all'atrio sinistro, grazie alla pressione intratoracica negativa.

1.1.3 Il sistema di conduzione cardiaco. I cardiomiociti, come tutte le cellule muscolari, sono elettricamente eccitabili e la propagazione della loro attività elettrica riveste un ruolo essenziale nella contrazione coordinata del cuore. Oltre alla muscolatura atriale e ventricolare, nell'organo cardiaco si riscontra la presenza di tessuto nodale, una rete di cardiomiociti specializzati per la genesi e la conduzione dell'eccitazione, dalla cui disfunzione originano molte patologie cardiache.

Il sistema di conduzione cardiaco include:

- il nodo seno-atriale (SA), agglomerato di qualche centinaio di cellule collocato nella parte posteriore dell'atrio destro, dove forma una struttura a mezzaluna lunga circa 1 cm e larga circa 3 mm. Descritto per la prima volta nel cuore di mammifero nel 1906, esso è in grado di generare spontaneamente un segnale elettrico

periodico ad una frequenza di 60-100 bpm. Dal momento che questa frequenza è superiore a quella delle altre strutture cardiache, esso è pertanto identificato come il naturale pacemaker cardiaco. Dal nodo SA l'impulso di depolarizzazione elettrica si propaga radialmente attraverso le fibre miocardiche atriali, mentre le vie intra-nodali lo conducono al nodo atrio-ventricolare (AV).

- Il nodo AV rappresenta l'unica struttura di connessione elettrica tra atri e ventricoli, al fine di garantire l'ottimale svuotamento atriale prima della sistole ventricolare e limitare superiormente la frequenza di lavoro del ventricolo. Dal nodo AV l'eccitazione si propaga quindi ai ventricoli attraverso il fascio di Hiss.
- Il fascio di Hiss è costituito da un insieme di fibre che decorrono parallelamente al setto inter-ventricolare prima di ramificarsi nelle branche destra e sinistra (fibre di Purkinje), ove lo stimolo si propaga ad una velocità di 1-4 m/s. L'ultimo stadio di propagazione è ad opera della muscolatura cardiaca e procede dall'apice alla base, per coadiuvare lo svuotamento ventricolare.

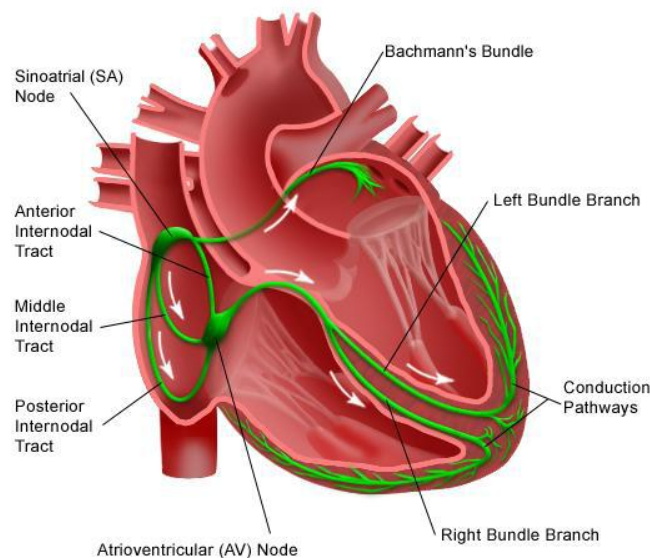


Figura 1.2. Il sistema di conduzione cardiaco.

1.2 Elettrofisiologia cardiaca

Si indica con tale termine la scienza che si propone la comprensione dei fenomeni profondi dai quali scaturisce l'attività elettrica cardiaca, cercandone correlazioni con eventuali stati fisio-patologici.

In particolare, per quanto concerne gli scopi del presente elaborato, si riporteranno di seguito le caratteristiche anatomiche dei cardiomiociti e delle diverse correnti ioniche di membrana, con particolare riguardo al loro contributo alla genesi del potenziale d'azione.

1.2.1 Il cardiomiocita. Le cellule muscolari cardiache vengono classificate come striate poiché l'osservazione al microscopio ottico di preparati tissutali, rivela la presenza di striature trasversali, ordinate in bande di colore più chiaro e più scuro, e presentano strutture microscopiche comparabili alle cellule scheletriche. Come queste infatti, sono strutturate in sarcomeri, estesi da linea Z a linea Z, in cui si denota una rete citoscheletrica organizzata in filamenti proteici spessi di miosina, che si intercalano con quelli sottili di actina ai fini della contrazione. Si tratta di cellule mononucleate, ad alta densità di mitocondri, le cui ramificazioni terminali portano ad interconnessioni tali da realizzare un sincizio funzionale: nonostante il singolo miocita sia infatti circoscritto dal sarcolemma, l'onda di depolarizzazione, originata dalla stimolazione elettrica di uno dei fuochi cardiaci, causa la contrazione del tessuto cardiaco in un unico spasmo coordinato.

I cardiomiociti, pur presentando forma e dimensioni variabili in relazione all'area di prelievo, sono tipicamente cilindrici con lunghezza di 50-150 μm e raggio di 10-20 μm .

1.2.2 La membrana cellulare e i canali ionici. Il sarcolemma è un doppio strato fosfolipidico che circonda fisicamente il cardiomiocita e regola finemente i flussi ionici tra il compartimento extracellulare ed il citosol grazie alla presenza di proteine transmembrana. Ai fini della classificazione di tali proteine, la cui struttura terziaria determina la permeabilità selettiva ad una o più specie ioniche, occorre ricordare che lo squilibrio elettrolitico esistente tra compartimento intra (LIC) ed extra-cellulare (LEC) dà origine ad un potenziale di membrana, convenzionalmente indicato come:

$$V_m = V_i - V_e$$

Il flusso ionico si attua attraverso tre tipi di proteine transmembrana: canali, scambiatori e pompe ioniche, la cui attività è causa dell'eccitabilità del cardiomiocita. I primi sono di norma permeabili ad una singola specie ionica che, qualora i canali si trovino in stato di apertura, fluisce secondo gradiente elettro-chimico; attuano pertanto un trasporto passivo che non richiede consumo energetico da parte della cellula. Gli scambiatori sfruttano l'energia potenziale originata dal trasferimento di uno ione secondo gradiente elettro-chimico per mobilitarne un secondo contro gradiente: se il flusso dei due ioni è concorde si parla di simporto, in caso contrario di antiporto. Differentemente dai due precedenti casi. Il terzo meccanismo di trasporto è costituito da canali ionici che, al contrario dei due meccanismi precedenti, realizzano un trasporto di tipo attivo: gli ioni vengono trasportati contro il loro gradiente elettrochimico, questo è possibile grazie al consumo di energia sotto forma di ATP.

Le dinamiche di apertura e chiusura dei canali ionici, indicate come attivazione e inattivazione, possono avvenire in

risposta a variazioni del V_m , alla presenza di specifici chemiocettori nel LIC o LEC o a parametri fisici (stress meccanico sulla membrana, pH, etc.), determinando la distinzione in canali voltaggio-dipendenti, chemio-dipendenti o mecano-dipendenti. La transizione di stato è spesso descritta analiticamente mediante variabili dette di *gating*; il valore da esse assunto consente di risalire alla presenza o assenza di flusso ionico, utilizzando una formulazione alla Hodgkin-Huxley, che verrà descritta meglio in seguito.

Data la selettività ad uno specifico ione, i canali ionici sono denominati in relazione alle specie cui sono permeabili. Ipotizzando che un canale ionico sia in stato di apertura, il flusso netto di carica attraverso lo stesso dipende dalla differenza tra il potenziale transmembrana ed il potenziale di equilibrio elettrochimico dello ione, detta *driving force*. Il potenziale di equilibrio di un singolo ione, o potenziale di Nernst, è definito come il potenziale che si avrebbe ai capi della membrana se questa fosse permeabile al solo ione in esame, ed è calcolabile mediante l'omonima equazione:

$$E_x = \frac{R \times T}{z \times F} \ln \frac{[X]_i}{[X]_o}$$

Dove $R=8,314472 \text{ J/mol K}$ è la costante universale dei gas

T è la temperatura assoluta, espressa in Kelvin [K]

z è la valenza ionica della specie X

$F=96485,34 \text{ C/mol}$ è la costante di Faraday

$[X]_i$ è la concentrazione dello ione X nel LIC

$[X]_o$ è la concentrazione dello ione X nel LEC

Il potenziale di Nernst è anche detto di inversione, poiché per potenziali transmembrana superiori ad esso si ha corrente ionica uscente, per convenzione positiva, mentre per valori inferiori il flusso è entrante, quindi negativa.

L'equazione di Goldman-Hodgkin-Katz esprime il potenziale di membrana come combinazione lineare dei singoli potenziali

ionici, pesati dalle rispettive permeabilità dei canali:

$$E_{m, Na^+, K^+, Cl^-} = \frac{R \times T}{F} \ln \frac{P_{Na^+} [Na^+]_o + P_{K^+} [K^+]_o + P_{Cl^-} [Cl^-]_i}{P_{Na^+} [Na^+]_i + P_{K^+} [K^+]_i + P_{Cl^-} [Cl^-]_o}$$

1.2.3 I canali ionici cardiaci. I **canali del sodio**, si attivano in risposta ad una depolarizzazione del potenziale di membrana, generando un breve ed intenso flusso entrante di Na^+ responsabile della fase di *upstroke* del potenziale d'azione. L'inattivazione a valori di tensione positivi previene la tetanizzazione del muscolo cardiaco in presenza di stimoli continui. Oltre alla *fast inward current*, è stata identificata una componente lenta della corrente di sodio, $I_{Na,L}$ o *late acting sodium current*, imputabile alla mancata o parziale inattivazione dei canali [1,2].

I **canali del calcio** si distinguono in canali L-type e T-type. I primi, preponderanti rispetto agli altri, devono la denominazione alle caratteristiche *large* e *long-lasting*, ovvero elevata conduttanza e lenta inattivazione, in opposizione a *tiny* e *transient*, ossia bassa conduttanza e breve attivazione. A fronte di una rapida attivazione, le due tipologie di canali si distinguono quindi per la dinamica di inattivazione; le corrispondenti correnti, $I_{Ca,L}$ e $I_{Ca,T}$ mostrano dipendenza, oltre che dal V_m anche dalla $[Ca^{2+}]_i$.

Nonostante l'esistenza di numerose tipologie di **canali del potassio**, la cui densità varia in relazione alla regione di estrazione del cardiomiocita esaminato, la corrente che fluisce attraverso essi è sempre uscente. La I_{K1} , detta *inwardly rectifying K^+ current* poiché contraddistinta da variabilità dei valori di conduttanza in relazione a V_m , si attiva a potenziali negativi, divenendo responsabile della stabilità del potenziale di riposo (*resting potential*) [3].

Altre correnti rettificanti sono la I_{Kr} e la I_{Ks} , rispettivamente *rapid* e *slow delayed rectifying*, distinte per l'entità della costante di tempo che descrive la dinamica di attivazione. Tra le meglio caratterizzate correnti di potassio

ricordiamo infine la I_{to} , transient outward, distinta in una componente lenta ed una rapida. E' invece più recente la scoperta delle I_{Kur} , ultra-rapid potassium current, e I_{sus} , corrente sostenuta, ovvero lenta e raramente inattiva [4,5].

I **canali del cloro**, attraverso cui fluisce l'omonimo anione monovalente, contribuiscono alla morfologia del potenziale d'azione mediante la I_{to2} , transient outward poiché l'effetto di entrata di ioni negativi coincide con quello di uscita di cationi. La denominazione è data dall'analogia delle condizioni di attivazione con I_{to} e dall'influenza su essa della $[Ca^{2+}]_i$ [6].

Symbol	Name	Type	Permeability
I_{Na}	Fast acting sodium current	Ion channel	Na^+
$I_{Na,L}$	Late acting sodium current	Ion channel	Na^+
$I_{Ca,L}$	L-type calcium current	Ion channel	Ca^{2+}
$I_{Ca,T}$	T-type calcium current	Ion channel	Ca^{2+}
I_{to}	Transient outward current	Ion channel	K^+
I_{Kur}	Ultra-rapid potassium current	Ion channel	K^+
I_{Kr}	Rapid delayed rectifying K+ current	Ion channel	K^+
I_{Ks}	Slow delayed rectifying K+ current	Ion channel	K^+
I_{K1}	Inwardly rectifying K+ current	Ion channel	K^+
I_{KACh}	Acetylcholine activated K+ current	Ion channel	K^+
I_f	Hyperpolarisation activated Funny current	Ion channel	Na^+ / K^+
I_{NaCa}	Sodium Calcium exchanger current	Ion exchanger	Na^+ / Ca^{2+}
I_{NaK}	Sodium potassium pump	Ionic pump	Na^+ / K^+
I_{CaP}	Calcium pump	Ionic pump	Ca^{2+}

Tabella 1.1. Principali correnti ioniche di sarcolemma nei miociti cardiaci.

1.2.4 Il potenziale d'azione cardiaco. Il potenziale d'azione cardiaco (AP), definito come la variazione transiente del potenziale di membrana a riposo, emblematica dell'eccitazione elettrica della cellula, scaturisce dall'azione delle correnti ioniche di sarcolemma.

Pur considerando l'eterogeneità morfologica, in relazione a differenti regioni cardiache ed alla specie in esame, il PA può essere descritto con riferimento a cinque distinte fasi, ognuna delle quali connotata dal predominare di una o più correnti ioniche.

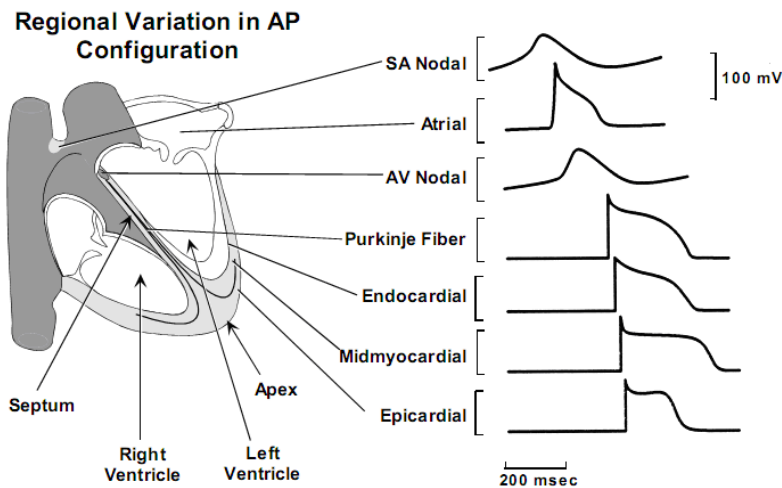


Figura 1.3. Andamento temporale del potenziale d'azione nelle diverse regioni cardiache.

Fase 4: in tale fase V_m assume un valore negativo, compreso tra -70 e -85mV e denominato potenziale di riposo, identificativo della capacità della cellula di rispondere a stimoli sopra soglia, provenienti da cardiomiociti adiacenti, che ne perturbino lo stato. Tale fase del PA corrisponde macroscopicamente alla diastole delle camere cardiache ed è primariamente determinata da I_{K1} , I_{NaK} , I_{NaCa} e dalle correnti di background $I_{Na,b}$ e $I_{Ca,b}$ [7]. La pompa Na^+-K^+ sfrutta l'energia derivante dall'idrolisi del legame fosfoanidridico tra fosforo α e β della molecola di ATP, per estrarre tre Na^+ ed importare

due K^+ . Codesta pompa elettrogenica, che genera quindi un flusso netto di carica verso il compartimento EC, è responsabile della conservazione del gradiente transmembrana di sodio, influenzando la durata del PA (APD) ed il potenziale di riposo. Durante la fase diastolica lo scambiatore Na^+-Ca^{2+} importa tre Na^+ per ogni Ca^{2+} estruso, costituendo il principale meccanismo di uscita dello ione Ca^{2+} entrato durante il PA. Tale scambiatore può operare, in altre fasi del PA, in modo inverso, generando quindi una corrente netta uscente.

Fase 0: corrisponde alla fase di upstroke, o rapida depolarizzazione, che si sviluppa in seguito all'applicazione di uno stimolo elettrico sopra-soglia che determina l'apertura di canali voltaggio-dipendenti del sodio e del calcio L-type, i quali conducono I_{Na} e $I_{Ca,L}$ rispettivamente. Tali correnti implicano l'evoluzione di V_m verso valori positivi (*overshoot*), fino al raggiungimento di un picco, compreso tra 30-50mV, in cui si realizza il bilancio istantaneo tra correnti entranti ed uscenti. La pendenza del profilo del PA in tale fase è denominata velocità di upstroke.

Fase 1: indicata come ripolarizzazione transiente o notch, è determinata dalla rapida inattivazione di I_{Na} e dall'attivazione di I_{to} e I_{to2} , responsabili di una ridotta deflessione del PA, che tendono a ripolarizzare leggermente la cellula.

Fase 2: anche nota come fase di plateau, è contraddistinta da una ridotta variazione temporale del potenziale transmembrana originata dal quasi perfetto equilibrio tra correnti entranti ($I_{Ca,L}$) ed uscenti (I_{Kr}, I_{Ks}, I_{Kur}). Lo scambiatore Na^+-Ca^{2+} e la pompa Na^+-K^+ rivestono un ruolo minore in tale fase, responsabile della maggior durata del PA cardiaco, rispetto a quello neurale o muscolare scheletrico, nonché della caratteristica di refrattarietà, che riduce il rischio di tetanizzazione cardiaca garantendo l'espletamento dell'azione pompante dell'organo.

Fase 3: corrisponde alla ripolarizzazione rapida, o terminale, in cui l'inattivazione di $I_{Ca,L}$ e la permanenza in uno stato di apertura dei canali del potassio sovra citati, con un'intensità di corrente crescente grazie alla riduzione del V_m ed alle caratteristiche rettificanti, implicano il ripristino del potenziale di riposo, quindi il ritorno alla fase 4.

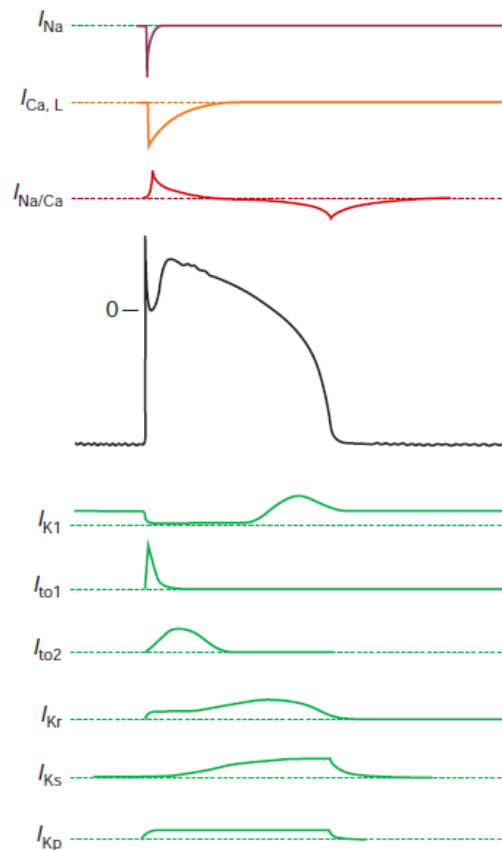


Figura 1.4. Correnti ioniche sottostanti il potenziale d'azione cardiaco. In alto correnti depolarizzanti in funzione del tempo. In basso correnti ripolarizzanti in funzione del tempo.

1.2.5 Il reticolo sarcoplasmatico e la dinamica del Calcio intracellulare. Le correnti ioniche descritte in precedenza, oltre ad indurre variazioni di V_m , sono responsabili dell'alterazione delle concentrazioni intracellulari dei principali elettroliti.

Tra questi lo ione calcio è considerato l'elemento di maggior rilievo nell'accoppiamento eccitazione-contrazione, termine con il quale si indica il processo che, originato dall'eccitazione elettrica del miocita, si conclude con la

contrazione cardiaca. A conferma di quanto affermato, evidenze sperimentali indicano l'alterata gestione del Ca^{2+} come principale causa di condizioni patologiche quali aritmie e disfunzioni contrattili [8]. Durante il PA l'afflusso di Ca^{2+} mediante l' $\text{I}_{\text{Ca,L}}$, oltre a contribuire alla fase di plateau, causa un incremento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$, con conseguente aumento della probabilità di legame dello ione ai recettori per la rianodina (RyR). Questi sono recettori-ligando posti sul versante citoplasmatico della membrana che circonda il reticolo sarcoplasmatico (SR), un organello con funzione di deposito e rilascio di Ca^{2+} . L'attivazione dei RyR, ad opera del calcio, consente il rilascio di tale ione dal SR realizzando un circuito di amplificazione noto come rilascio di calcio indotto dal calcio stesso (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release, o CICR). L'incrementata concentrazione di Ca^{2+} libero favorisce il legame del catione bivalente ad una subunità proteica della troponina C; l'alterazione conformazionale indotta su tale inibitore rende possibile lo scorrimento dei miofilamenti, permettendo l'inizio della contrazione. Ai fini del rilassamento, il richiesto declino della $[\text{Ca}^{2+}]_i$, con conseguente dissociazione ione-troponina C, è attuato mediante percorsi di estrusione che coinvolgono la Ca^{2+} -ATPasi del reticolo sarcoplasmatico (pompa SERCA), lo scambiatore Na^+ - Ca^{2+} , la Ca^{2+} -ATPasi di sarcolemma e l'uniporto di calcio mitocondriale [9].

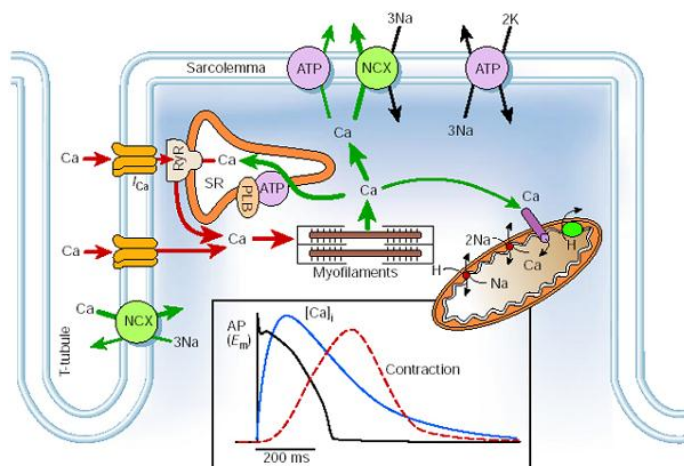


Figura 1.5. Ciclo del calcio intracellulare. Nell'insero la rappresentazione del potenziale d'azione, del transiente di calcio e della forza di contrazione.

CAPITOLO 2:

MODELLISTICA DELL' ELETTROFISIOLOGIA CARDIACA

Nella sua evoluzione storica, l'elettrofisiologia computazionale si è dimostrata un utile strumento per la comprensione integrata di processi fisio-patologici in generale, fornendo introspezioni su esiti sperimentali e guidando le procedure di laboratorio grazie alle sue capacità predittive. Negli ultimi anni, la maggiore disponibilità di dati sperimentali ha portato allo sviluppo di modelli matematici sempre più complessi e biologicamente fondati, seppure considerando che si tratta sempre di un'approssimazione del comportamento reale. La crescente complessità è giustificata, ad esempio, dalla necessità di catturare la natura subcellulare dei canali ionici o di compartimentalizzare la cellula e considerare la distribuzione delle proteine in diverse regioni del citoplasma. Considerano i modelli cardiaci, si sono così resi disponibili modelli di cellule di molteplici specie, così come di diversi tipi cellulari: atriali, ventricolari, seno-atriali, fibre del Purkinje.

Come delineato negli obiettivi, il presente elaborato propone un'analisi comparativa di modelli matematici di potenziale d'azione atriale umano, il cui sviluppo, a partire dal 1998, è stato ispirato dall'interesse scientifico per la diffusa comprensione dell'elettrofisiologia atriale e di come la sua alterazione potesse indurre suscettibilità alla fibrillazione

atriale. Tale patologia aritmica, considerata indice predittivo di mortalità precoce, colpisce infatti l'1% della popolazione, con un'incidenza crescente al progredire dell'età di questa [10]. A conferma del suddetto crescente interesse scientifico, in letteratura si riscontra la pubblicazione, a partire dall'anno 2000, di oltre 200 articoli inerenti molteplici aspetti di modellistica anatomica ed elettrofisiologica atriale.

In questo capitolo, dopo una digressione storica riguardante la modellistica dell'elettrofisiologia, verranno presentate le tecniche sperimentali adottate per la caratterizzazione del PA cardiaco.

2.1 Nascita della modellistica elettrofisiologica

Nonostante l'idea dell'esistenza di fenomeni elettrici nel corpo umano sia sorta e si sia sviluppata nel corso di secoli, l'ampliamento delle conoscenze ad essi inerenti è correlabile all'impiego di esiti sperimentali su sistemi biologici per lo sviluppo di modelli matematici. Questi, definiti come insieme di relazioni matematiche finalizzate alla rappresentazione formale ed approssimata dell'evoluzione temporale di un sistema biologico o di un suo aspetto fenomenologico, dovrebbero essere sviluppati secondo il principio di parsimonia; ciò consente di riferirsi ad un modello come frutto del compromesso tra la totalità delle conoscenze acquisite su un fenomeno e la necessità di dare rappresentazione quanto più semplice possibile delle stesse. L'utilizzo di un modello, di norma più semplice oggetto di studio rispetto al sistema cui si riferisce per la possibilità di implementarne modifiche strutturali o isolarne componenti, si pone l'obiettivo di formulare ipotesi, simulare o predire caratteristiche della realtà di interesse. Nel caso in cui la correlazione tra esiti sperimentali e modellistici sia

assente, il modello diviene strumento per un approccio metodologico all'analisi coerente della natura e dei meccanismi del fenomeno di interesse.

Nonostante i primi tentativi di modellistica cardiaca risalgano al 1928, con l'operato di B.van der Pol e J.van der Mark [11], la descrizione matematica dell'elettrofisiologia cardiaca su scala cellulare si fonda sul lavoro di Hodgkin e Huxley, che nel 1952 pubblicarono il primo modello di cellula neurale.

2.1.1 Il modello di Hodgkin-Huxley. La membrana cellulare, secondo il modello a mosaico fluido proposto da Singer e Nicolson nel 1972, è un doppio strato fosfolipidico, isolante, che separa i compartimenti intra ed extra cellulare, sedi di

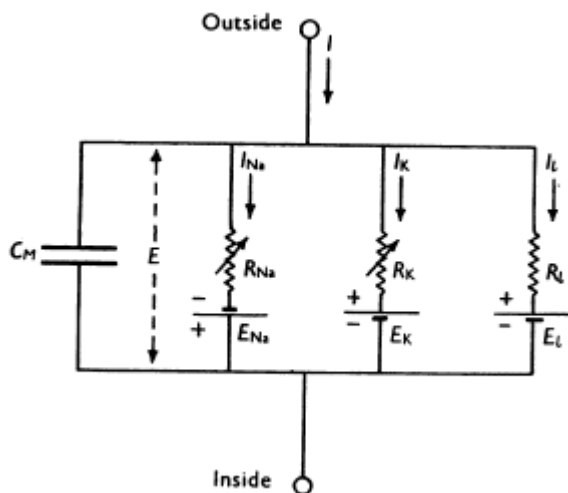


Figura 2.1. Circuito equivalente elettrico di membrana, R_{Na} e R_K sono funzioni del tempo e del potenziale di membrana.

soluzioni acquose contenenti ioni. La conduzione attraverso il plasmalemma, come indicato in introduzione, è resa possibile dall'inserzione in esso di strutture proteiche caratterizzabili mediante lo ione che le permea. Tale struttura equivale, in termini di analogo elettrico, al parallelo tra una capacità di membrana (C_m) e rami

conduttivi, ove il flusso ionico avviene in funzione di V_m , connotati da conduttanze varianti nel tempo e con valore dipendente dal potenziale ai capi della membrana [12]. L'applicazione della prima legge di Kirchhoff al circuito è esprimibile come:

$$I_{C_m} + I_s + I = 0$$

Dove I_{C_m} è la corrente che fluisce attraverso la capacità di membrana;

I_s è l'eventuale corrente di stimolo applicata;

I è l'insieme delle correnti ioniche fluenti attraverso le proteine transmembrana.

Ipotizzando l'assenza di stimoli applicati esternamente ed esprimendo I_{C_m} in funzione del potenziale transmembrana, si ottiene un'equazione differenziale dalla cui integrazione è possibile risalire alla dinamica temporale di V_m :

$$\frac{dV_m}{dt} = -\frac{I}{C_m}$$

Hodgkin e Huxley considerarono il termine I come somma di tre contributi:

$$I = I_{Na} + I_K + I_{leak}$$

Dove le correnti di sodio e potassio variano in funzione del tempo e di V_m , mentre la corrente di perdita attraverso la membrana è tempo-variante. Le tre correnti sono esprimibili secondo la legge di Ohm:

$$I_x = g_x (V_m - V_x) \quad \text{con } X = Na, K, leak.$$

Dove g_x è la conduttanza del canale attraverso cui fluisce la specie ionica X , il fattore tra parentesi è la sovra citata *driving-force* ed è dato dalla differenza tra il potenziale di membrana e quello di inversione di X (qualora il canale sia permeabile a più specie ioniche, il sottraendo è valutato mediante l'equazione Goldman-Hodgkin-Katz).

A partire dal fitting dei dati sperimentali, ottenuti con tecniche di voltage-clamp (vedi sezione 2.2.2) su assoni giganti di calamaro (*loligo paelei*), i due ricercatori espressero le conduttanze come prodotto di una conduttanza massima e di una o più variabili di gating che, elevate ad opportune potenze, descrivono l'evoluzione di g_x indotta dall'applicazione del gradino di tensione definito nel

protocollo sperimentale. In particolare si ha:

$$g_K = g_{K,max} n^4$$

$$g_{Na} = g_{Na,max} m^3 h$$

Dove n è la variabile di gating di attivazione del canale di potassio, mentre m e h sono le variabili di gating di attivazione ed inattivazione del canale del sodio. Le variabili di gating, con valore spaziabile tra 0 e 1, possono essere interpretate equivalentemente come probabilità che il singolo canale ionico sia aperto/chiuso o come frazione di canali in stato di apertura rispetto al numero totale dei presenti.

Con riferimento alla conduttanza di potassio, considerando che analoga trattazione può essere condotta per quella di sodio, l'andamento temporale della variabile di gating può essere descritto mediante l'equazione differenziale:

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n (1-n) - \beta_n n$$

Dove con α_n e β_n , funzioni del potenziale V_m , si indicano i ratei cinetici di transizione dallo stato aperto a quello chiuso e viceversa. Il vantaggio analitico derivante dal protocollo di voltage-clamp consiste nel rendere tali ratei meri parametri, quindi l'equazione sopra riportata diviene lineare. Ponendo:

$$\tau_n = \frac{1}{\alpha_n + \beta_n} \text{ costante di tempo}$$

$$n_\infty = \frac{\alpha_n}{\alpha_n + \beta_n} \text{ valore di steady-state della variabile di gating}$$

La risoluzione dell'equazione differenziale porta a:

$$n(t) = n_\infty - (n_\infty - n_0) e^{-t/\tau_n}$$

Il valore dei parametri $g_{K,max}$, τ_n ed n_∞ si determina mediante fitting degli andamenti temporali della conduttanza di potassio in corrispondenza a differenti potenziali di test degli esperimenti di patch-clamp.

La riproduzione di n_∞ in funzione di V_m si definisce curva di attivazione della corrente I_K e rappresenta il grado di

attività del canale per ogni V_m , nonché la sua responsività a variazioni di potenziale.

L'approccio di Hodgkin-Huxley, inerente la descrizione analitica di gate fisicamente presenti nei canali ionici e che valse loro il premio Nobel nel 1963, è risultato determinante nello sviluppo dell'elettrofisiologia cardiaca. Benché non venga trattato nel seguito, si evidenzia l'esistenza di paradigmi alternativi, come la rappresentazione Markoviana delle transizioni tra stati di apertura e chiusura di canali ionici.

2.1.2 Storia dei modelli di potenziale d'azione cardiaco. I primi modelli di potenziale d'azione cardiaco risalgono al 1960, anno in cui Denis Noble, incentivato dalla scoperta delle componenti *inward* e *delayed rectifier* della I_K , pubblicò il primo modello di PA di fibre del Purkinje [13]. Si trattava di un adattamento delle equazioni formulate da Hodgkin-Huxley al fine di riprodurre le caratteristiche di durata del PA cardiaco e, nonostante gli scostamenti tra esiti modellistici e risultati attesi, costituì una svolta epocale. L'evoluzione storica ha consentito la distinzione tra modelli di PA di prima e seconda generazione. I primi, sviluppati tra il 1960 ed il 1985, sono caratterizzati da una maggior semplicità computazionale, correlata alle ridotte capacità di calcolo, riscontrabile nell'adozione di concentrazioni ioniche intracellulari fisse.

Nei modelli di seconda generazione le concentrazioni ioniche sono rappresentate come variabili di stato; la disponibilità di dati sperimentali più accurati e specifici ed il parallelo sviluppo dei sistemi informatici si traduce in un elevato livello di dettaglio fisiologico, che arriva ad includere la caratterizzazione spaziale di processi cellulari (transiente di $[Ca^{2+}]_i$, ciclo CICR, etc.). Tra questi si annoverano il modello di Di Francesco-Noble inerente fibre del Purkinje (1985) ed il modello di Luo-Rudy relativo a cellule

ventricolari umane. L'ultimo, nella versione dinamica del 1994, costituisce la base per lo sviluppo del modello di PA atriale umano di Courtemanche-Ramirez-Nattel. A partire dagli anni '90, i modelli di singola cellula sono stati incorporati in modelli anatomicamente dettagliati di tessuto ed organo, funzionali alla creazione del primo organo virtuale (*VirtualHeart*) ed all'utilizzo nella valutazione dell'efficacia di farmaci [14].

2.2 Tecniche sperimentali per la caratterizzazione di correnti ioniche e del potenziale d'azione

2.2.1 *Current-clamp*. Questa tecnica, nota anche come inseguitore di tensione, costituisce il metodo classico per la registrazione del potenziale transmembrana. In essa, una micropipetta, contenente un elettrodo di registrazione ed inserita nella cellula in esame, è connessa ad un buffer a guadagno unitario con resistenza di ingresso diversi ordini di grandezza superiore a quella delle strutture a monte (resistenza di ingresso della cellula e della micropipetta). Questa architettura ha funzione di disaccoppiamento, riducendo l'errore di interconnessione che impedirebbe la misura. Nel caso più generale, la corrente iniettata nella cellula viene fissata ad un valore non nullo, dato da un generatore non visualizzato nello schema di funzionamento riportato [15].

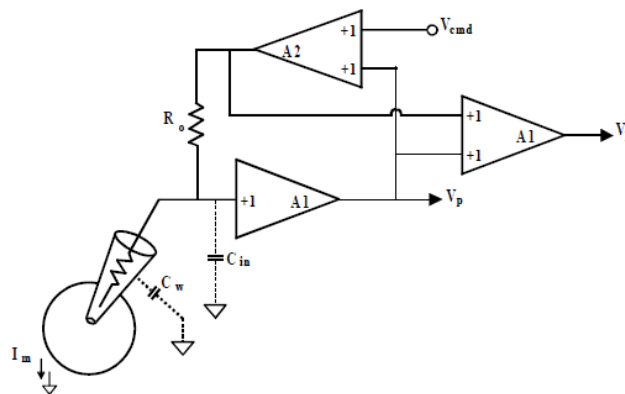


Figura 2.2. Schema circuitale per misure in *current-clamp*

2.2.2 Voltage-clamp. Consente di caratterizzare correnti ioniche tramite misura delle stesse a fronte di gradini di potenziale transmembrana di valore imposto. Nella configurazione *whole-cell* il potenziale V_m , misurato mediante un microelettrodo (ME1 in figura 2.3) inserito nel compartimento intracellulare e connesso ad un amplificatore operazionale in configurazione buffer, è confrontato con il potenziale imposto V_{cmd} tramite un amplificatore differenziale ad alto guadagno. L'uscita di questo forza il flusso di corrente, in un secondo elettrodo inserito (ME2) della cellula, tale da ridurre lo scostamento $\varepsilon = V_{cmd} - V_m$.

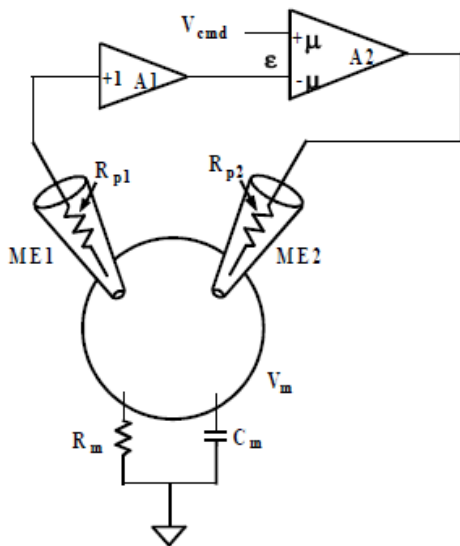


Figura 2.3. Schema circuitale per misure in voltage-clamp

Nel protocollo più semplice il potenziale di membrana, dapprima mantenuto ad un valore di *holding*, viene portato istantaneamente ad un valore di *test* al quale è mantenuto per un intervallo temporale noto come tempo di *clamp*, prima del ripristino dell'*holding potential*. La procedura descritta è di norma ripetuta su un range da -140 a 60mV, con incrementi di 10mV, sebbene esistano varianti

legate alle caratteristiche della corrente in esame. La corrente, misurata in uno degli istanti $t=0$, t_{clamp^-} , t_{clamp^+} , può essere riportata in un grafico in funzione di V_{cmd} originando una curva corrente-tensione (I-V).

2.2.3 Patch-clamp. Ideata da Neher e Sakmann nel 1976 e valse loro il premio Nobel nel 1991, tale tecnica è finalizzata alla registrazione di correnti ioniche che interessano una porzione ristretta di membrana cellulare, come l'esecuzione di misure

su singolo canale. Rispetto alle configurazioni precedentemente citate, il margine della pipetta, con punta arrotondata, viene fatto aderire al plasmalemma fino a formazione del *gigaseal*, termine che indica l'ordine di grandezza della resistenza del sigillo creatosi. La continuità creata tra la soluzione salina racchiusa nella pipetta ed il LIC riduce i problemi di perdite nel punto di perforazione della membrana. Inoltre tale tecnica consente l'esecuzione di misure di *current* e *voltage clamp* mediante un singolo elettrodo di registrazione, oltre all'elettrodo di riferimento immerso nel bagno elettrolitico termostato in cui è collocata la cellula. Uno schema delle possibili configurazioni sperimentali del *patch-clamp*, distinte in *on-cell*, *inside-out*, *whole-cell* ed *outside-out* è riportato in figura 2.4.

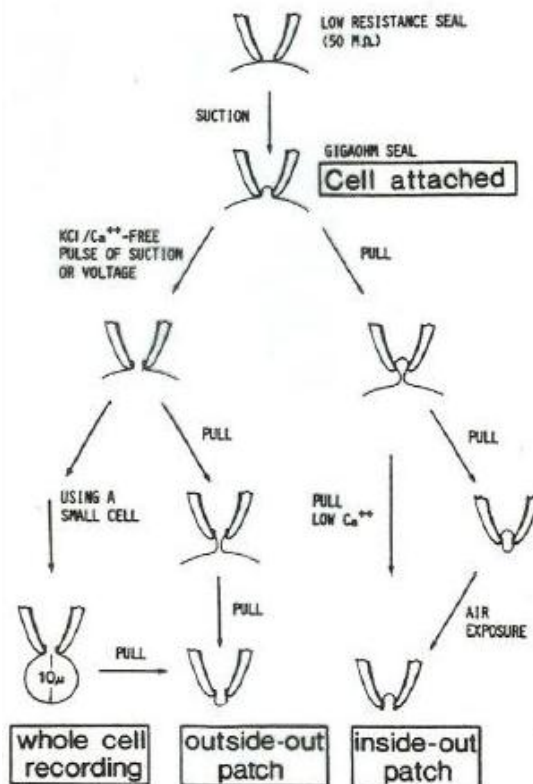


Figura 2.4. Diverse configurazioni sperimentali del *patch-clamp*.

2.3 Caratterizzazione del potenziale d'azione: memoria, restituzione e rientro

L'appropriata caratterizzazione del PA si rende necessaria ai fini dell'identificazione di differenze regionali, interspecie o alterazioni indotte da stati patologici. Si riportano di seguito le proprietà cui si fa generalmente riferimento.

Potenziale di riposo: indicato come il V_m registrabile in assenza di stimolazione, è il valore più negativo durante il PA ed è correlato all'eccitabilità del miocita.

Massima velocità di upstroke: corrisponde alla massima pendenza del profilo di PA nella fase di rapida depolarizzazione ed influenza la velocità di conduzione dell'impulso di eccitazione nel tessuto.

Picco di ampiezza: il più elevato V_m raggiunto durante il PA.

Ampiezza del PA: differenza tra il picco di ampiezza ed il potenziale di riposo.

Durata del potenziale d'azione (APD_x): indice della durata temporale del PA, è funzione del picco di ampiezza e si misura come differenza tra l'istante di raggiungimento di una percentuale x di ripolarizzazione, indicata a pedice, e l'inizio dell'upstroke. Si riportano di norma APD_{90} , APD_{95} , mentre APD_{30} e APD_{30} consentono di valutare la durata di plateau.

Il potenziale di notch, valore più negativo raggiunto nella ripolarizzazione transiente, ed il **potenziale di plateau**, valore di picco raggiunto dopo il notch, si adottano per specificare la morfologia del PA.

La memoria, influenza della frequenza di stimolazione e di precedenti PA sulla morfologia di un potenziale, viene generalmente rappresentata mediante le curve di **APD restitution**. La morfologia ed il gradiente di queste, in cui l'APD è riportata in funzione del *basic cycle length* (BCL),

ovvero del lasso temporale che intercorre tra stimoli consecutivi, influenza l'aritmogenesi. In generale l'aumento della frequenza di stimolazione, o equivalentemente la riduzione del BCL, causa un decremento di durata e velocità di *upstroke* del PA. Si definisce protocollo S1 la stimolazione del miocita a frequenza costante, mentre si indica con S1-S2 l'applicazione di un treno di stimoli che si succedono ad intervalli regolari seguiti da uno stimolo S2. Quest'ultimo protocollo è adottato per l'analisi della proprietà di memoria: il PA generato è denotato da ampiezza, velocità di *upstroke* e APD minori al ridursi l'intervallo temporale tra l'ultimo stimolo S1 e l'S2. Memoria e refrattarietà sono correlate ai gate di inattivazione di canali ionici ed alle concentrazioni intracellulari di ioni. L'adattamento della durata del PA alla frequenza, che evita la propagazione nel tessuto di stimoli ad alta frequenza, impedendo il "rientro", ossia la propagazione di onde di depolarizzazione autosostenute, che potrebbero sostituire l'azione dei pacemaker naturale.

CAPITOLO 3:

PRIME SIMULAZIONI DEL POTENZIALE D'AZIONE ATRIALE UMANO

I modelli di potenziale d'azione atriale umano sono basati su dati di *voltage-clamp* e PA registrati su cardiomiociti isolati mediante tecniche di dispersione enzimatica, ottenuti da lembi di tessuto asportati durante interventi chirurgici a cuore aperto, come parte delle procedure di cannulazione per il *bypass* cardio-polmonare o di sostituzione valvolare. Fonti alternative di campioni sono rappresentate da cuori malfunzionanti espianati o donati ma non idonei al trapianto in un organismo ricevente. Le alterazioni indotte sui campioni tissutali, da stati patologici o dall'assunzione di farmaci ad opera dei pazienti da cui questi sono stati isolati, sono ritenute principale causa dell'eterogeneità della morfologia del PA e dell'entità delle correnti ioniche ad essa sottostanti. In letteratura si riscontrano, ad esempio, dimostrazioni del perdurare degli effetti di bloccanti farmacologici dei canali del Ca^{2+} alla rimozione del farmaco stesso [16], e di depressione di numerose correnti ioniche a seguito del rimodellamento indotto da fibrillazione e *flutter* atriali [17,18,19]. Se la variabilità dei dati sperimentali disponibili costituisce un ostacolo allo sviluppo di modelli matematici dell'elettrofisiologia atriale umana, i modelli si configurano come strumento per l'analisi di cause e conseguenze di tale mutevolezza sulla fisiologia dell'atrio.

Nel presente capitolo, dopo aver introdotto le principali caratteristiche dei primi due modelli di PA atriale umano (Courtemanche-Ramirez-Nattel, Nygren et al.), se ne opererà un confronto teso a delineare come, a partire da una stessa base sperimentale, i due abbiano portato a conclusioni contraddittorie circa le proprietà del potenziale stesso.

3.1 Courtemanche-Ramirez-Nattel

Pubblicato nel 1998, il modello di Courtemanche-Ramirez-Nattel (CRN) [20], è nato dall'esigenza di dare idonea rappresentazione alle significative differenze inter-specie ed alla crescente disponibilità di dati sperimentali acquisiti su cardiomiociti atriali umani: si pone l'obiettivo di sviluppare un utile strumento di indagine del comportamento di tali cellule. Per la formulazione delle correnti ioniche, in caso di dati umani insufficienti a caratterizzare completamente le stesse, i ricercatori hanno fatto ricorso a modelli di cellule cardiache di mammifero precedentemente pubblicati ed in particolare al modello di Luo-Rudy, inerente cellule ventricolari di *guinea pig* [21]. Il modello, che adotta il formalismo introdotto da Hodgkin-Huxley, considera gli andamenti di: $[Na^+]_i$, $[K^+]_i$ e $[Ca^{2+}]_i$ mentre considera fisse le concentrazioni extracellulari di tali ioni.

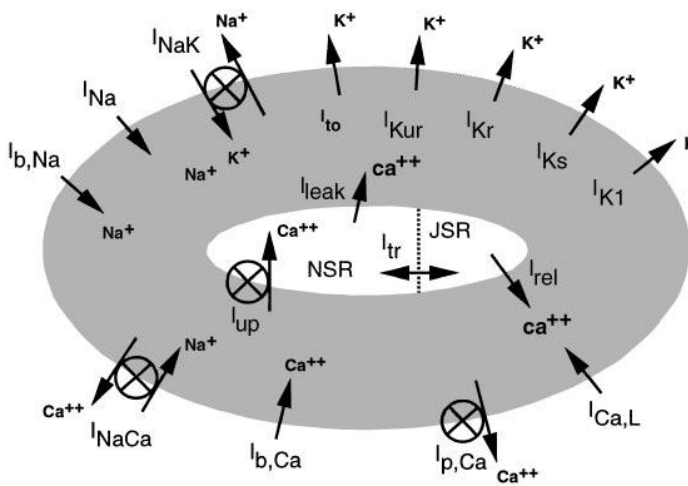


Figura 3.1. Rappresentazione schematica di correnti, scambiatori e pompe incluse nel modello. La cellula è strutturata in tre compartimenti intracellulari: il mioplasma e la suddivisione del reticolo sarcoplasmatico nelle componenti di rilascio ed uptake dello ione Ca^{2+} , dette rispettivamente junctional (JSR) e network (NSR).

3.1.1 Formulazione dei flussi ionici. *Fast inward Na⁺ current* o I_{Na} è una rapida ed intensa corrente entrante, difficile da misurare accuratamente mediante tecniche di voltage-clamp. La formulazione implementata nel modello, derivante dalla modifica di quella di Luo-Rudy, è:

$$I_{Na} = g_{Na} m^3 h j (V - E_{Na})$$

Dove $g_{Na} = 7.8 \text{ nS/pF}$ è stata adattata per riprodurre un adeguato valore di picco di ampiezza e della velocità di upstroke del potenziale d'azione, mentre j è la variabile di gating di lenta inattivazione.

Inward rectifier K⁺ current. Implementata, sulla base di dati sperimentali di corrente e resistenza di membrana a riposo, come indipendente dalla temperatura, secondo la formulazione:

$$I_{K1} = \frac{g_{K1} (V - E_K)}{1 + e^{0.07 (V + 80)}}$$

Con $g_{K1} = 0.09 \text{ nS/pF}$, dipendente dal solo potenziale transmembrana, che è circa 1/3 rispetto a quello riportato da Koumi et al. [22,23], al fine di ottenere un valore di resistenza di ingresso (~174 MΩ), per un gradino di potenziale imposto da -80 a -90mV, confrontabile con le misure sperimentali (~150 MΩ)[24]. E' degno di nota che i valori misurati della resistenza di ingresso spaziano su ampi range, probabilmente perché influenzati dalle procedure di isolamento dei miociti atriali.

Transient outward e ultra-rapid rectifier K⁺ currents.

Implementate sulla base dei dati sperimentali ottenuti dai ricercatori [ref25], le due correnti condividono comuni cinetiche di attivazione mentre differiscono per quelle di inattivazione (I_{to} inattiva rapidamente, I_{Kur} è denotata da lenta e parziale inattivazione). I_{Kur} assume rilievo nel bilancio di correnti in fase di plateau del PA dei cardiomiociti atriali umani. Le correnti sono state modellate

a temperatura ambiente ed il fattore $Q_{10}=2.2$ è stato adottato per riprodurre le cinetiche a 37°C . Sono state formulate come:

$$I_{to} = g_{to} o_a^3 o_i (V - E_K) \quad g_{to} = 0.1652$$

$$I_{Kur} = g_{Kur} u_a^3 u_i (V - E_K) \quad g_{Kur} = 0.05 + \frac{0.05}{1 + e^{-\frac{V-15}{13}}}$$

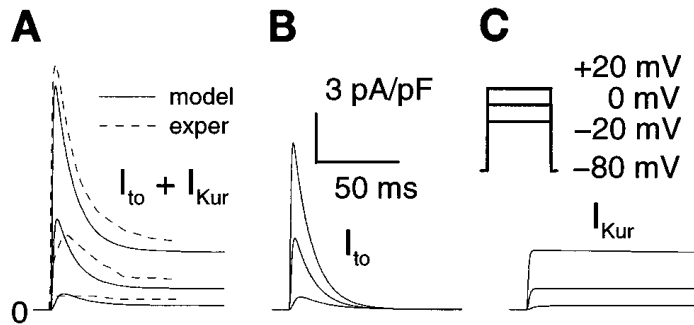


Figura 3.2. I_{Kur} e I_{to} generate in risposta a gradini di voltage-clamp (il modello è mantenuto per 1 s a -80 mV prima della transizione a potenziali di test di -20 , 0 e 20 mV). RegISTRAZIONI sperimentali effettuate da Wang et al. [25], scalate utilizzando $C_m=100$ pF per far coincidere i picchi delle tracce a $+20$ mV, sono riportate per confronto.

Rapid e slow delayed rectifier K^+ currents. Nei miociti atriali umani, come in altre specie di mammiferi, I_K è somma di una componente rapida ed una veloce. La formulazione adottata è quella proposta da Zeng et al. [26] e fittata su dati umani:

$$I_{Kr} = \frac{g_{Kr} x_r (V - E_K)}{1 + e^{22.4 \frac{V+15}{13}}} \quad g_{Kr} = 0.0294$$

$$I_{Ks} = g_{Ks} x_s^2 (V - E_K) \quad g_{Ks} = 0.129$$

Qui si può notare la presenza di un singolo gate di attivazione (elevato alla seconda nel caso di I_{Ks}), mentre la parziale inattivazione di I_{Kr} , osservata in alcune prove sperimentali, non è inclusa nel modello. Nonostante entrambe le componenti presentino una curva di attivazione descrivibile con una singola costante di tempo, l'elevato valore assunto da quella di I_{Ks} limita il ruolo di quest'ultima durante l'overshoot del potenziale d'azione. Date le evidenze sperimentali su cardiomiociti ventricolari di coniglio e guinea pig, che suggeriscono l'esistenza di costanti di tempo rapide e lente per le curve di attivazione e deattivazione di I_{Kr} e I_{Ks} , Courtemanche et al. hanno adottato, per le costanti

di tempo, la metà del valore misurato sperimentalmente da Wang et al.[27]. Tale formulazione attribuisce ad I_{Ks} un ruolo predominante nella fase di ripolarizzazione del PA e ad I_{Kr} ai valori di potenziale di plateau.

L-type Ca^{2+} current. Oggetto di studi estensivi nei tessuti atriali umani, l' $I_{Ca,L}$ è denotata da una complessa cinetica di inattivazione e la sua modellazione è funzione dell'accuratezza con la quale è formulata l'omeostasi della $[Ca^{2+}]_i$ ed il suo controllo ad opera del reticolo sarcoplasmatico. La descrizione analitica riportata è derivata da Luo-Rudy:

$$I_{Ca,L} = g_{Ca,L} d f_{Ca}(V-0.65) \quad g_{Ca,L} = 0.1238$$

Che include i gate di attivazione ed inattivazione voltaggio-dipendenti, oltre al gate di inattivazione Ca^{2+} -dipendente. Rispetto ad essa sono tuttavia state introdotte modifiche inerenti la curva di attivazione in stato stazionario, al fine di riprodurre i dati sperimentali di Li e Nattel [28] in cui si riscontra un più lento della stessa, e la curva di inattivazione Ca^{2+} -dipendente in stato stazionario, per ricalcare il transiente di Ca^{2+} e l'estensione di tale tipologia di inattivazione osservati empiricamente.

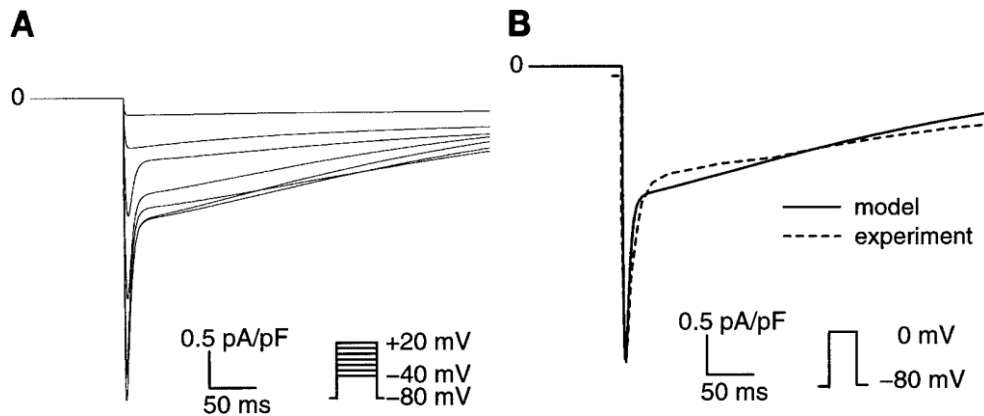


Figura 3.3. (A) Le tracce delle correnti $I_{Ca,L}$, fornite dal modello in risposta a gradini di *voltage-clamp*, evidenziano una rapida attivazione seguita da inattivazioni su due distinte scale temporali. La rapida, mediata da $[Ca^{2+}]_i$, che inattiva un'ampia frazione della corrente subito dopo l'applicazione del potenziale di test, è seguita da una più lenta inattivazione voltaggio-dipendente. (B) Confronto tra la risposta del modello all'applicazione di un potenziale di *voltage-clamp* di 0 mV e la media di 7 tracce sperimentali, ottenute nelle stesse condizioni. I dati sperimentali sono stati scalati per ottenere la coincidenza tra i picchi di corrente a 0 mV.

Pompa Na^+-K^+ . Derivata dalla formulazione di Luo-Rudy, è espressa come:

$$I_{NaK} = I_{NaK,max} f_{NaK} \frac{1}{1 + \left\{ \frac{K_{m,Na(i)}}{[Na^+]_i} \right\}^{1.5}} \frac{[K^+]_o}{[K^+]_o + K_{m,K(o)}}$$

Dove $I_{NaK,max} = 0.6$ è adattato per garantire la stabilità delle concentrazioni ioniche intracellulari a riposo.

Scambiatore Na^+-Ca^{2+} . Adotta una versione analoga a quella di Luo-Rudy a meno dell'adattamento del valore massimo di corrente $I_{NaCa,max}$, anche in questo finalizzato al mantenimento di concentrazioni ioniche intracellulari stabili a riposo.

Correnti di sodio e calcio di background e pompa di calcio. Con un approccio mutuato da precedenti modelli, le correnti di perdita di Ca^{2+} e Na^+ sono adattate per il mantenimento di concentrazioni intracellulari stabili di tali ioni a riposo. La pompa di calcio di sarcolemma è inclusa nel modello per mantenere $[Ca^{2+}]_i$ a livelli fisiologici.

$$\begin{aligned}
 I_{b,Ca} &= g_{b,Ca}(V-E_{Ca}) & g_{b,Ca} &= 0.00113 \\
 I_{b,Na} &= g_{b,Na}(V-E_{Na}) & g_{b,Na} &= 0.000674 \\
 I_{p,Ca} &= I_{p,Ca(max)} \frac{[Ca^{2+}]_i}{0.0005+[Ca^{2+}]_i} & I_{p,Ca(max)} &= 0.275
 \end{aligned}$$

SR: immagazzinamento e rilascio di Ca^{2+} . Le principali correnti implicate nella gestione del Ca^{2+} ad opera del SR sono:

$$\begin{aligned}
 I_{rel} &= k_{rel} u^2 v w ([Ca^{2+}]_{rel} - [Ca^{2+}]_i) & k_{rel} &= 30 \\
 I_{tr} &= \frac{[Ca^{2+}]_{up} - [Ca^{2+}]_{rel}}{\tau_{tr}} & \tau &= 180 \\
 I_{up} &= I_{up,max} \frac{1}{1 + \frac{k_{up}}{[Ca^{2+}]_i}} & I_{up,max} &= 0.005
 \end{aligned}$$

Il segnale di trigger per il rilascio di Ca^{2+} dal SR, come suggerito da Friedman et al.[29], è rappresentato dall'afflusso di tale ione nella cellula, in particolare ad opera dei canali L-type, strettamente accoppiati a quelli del JSR. Il rilascio ha inizio quando il flusso eccede una soglia predefinita, determinando l'apertura del gate di attivazione u . L'inattivazione è invece mediata dai gate v e w rispettivamente flusso e voltaggio dipendenti. Come mostrato in figura 3.4, l'ampiezza ed il decorso temporale del transiente di Ca^{2+} riprodotto dal modello è qualitativamente analogo a quello ottenuto sperimentalmente da Hatem et al.[30].

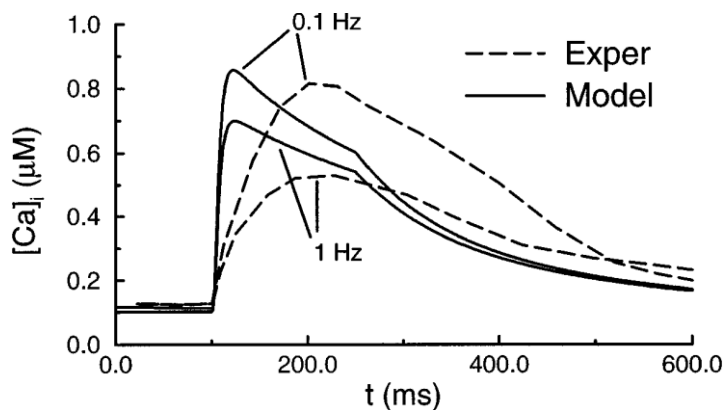


Figura 3.4. Confronto del transiente di Ca^{2+} generato dal modello e registrato sperimentalmente in risposta ad impulsi di voltage-clamp, al valore di 0 mV e della durata di 150 ms, applicati a frequenze di 0.1 e 1 Hz.

Le discrepanza osservabile nella fase iniziale del transiente ha cause potenzialmente complesse. Il transiente sperimentalmente è stato acquisito a temperatura ambiente, il che fornisce

parziale giustificazione della sua lenta crescita. Inoltre la fase di *rising* include una componente rapida ed una lenta; Hatem et al. hanno postulato che la seconda sia imputabile al rilascio di Ca^{2+} da parte di siti non strettamente giustapposti ai canali L-Type di sarcolemma. Poiché il modello non tiene conto della diffusione e di compartimenti mioplasmatici di Ca^{2+} , esso non è in grado di riprodurre tale proprietà del transiente.

3.1.2 Caratteristiche del PA. La figura 3.5 mostra l'andamento temporale del 12° potenziale d'azione generato dal modello durante una stimolazione ad 1Hz, in risposta ad impulsi di ampiezza 2nA e durata 2ms. Sono inoltre riportate le correnti ioniche ad esso sottostanti. I primi 100ms mostrano il bilancio di correnti in fase diastolica, cui concorrono I_{K1} , I_{NaK} , I_{NaCa} , $I_{b,Ca}$, $I_{b,Na}$ e $I_{p,Ca}$. Con i parametri precedentemente indicati il PA manifesta una morfologia *spike-and-dome*, comunemente osservata nelle acquisizioni sperimentali [25,31]. Dopo l'upstroke guidato da I_{Na} , I_{to} produce la ripolarizzazione transiente. Alla sua inattivazione, $I_{Ca,L}$, rimasta dopo l'inattivazione Ca^{2+} -dipendente, è responsabile della leggera depolarizzazione di membrana che porta al dome del PA. A questa corrente inward fa fronte la lenta attivazione di I_K , che conduce ad una lenta ripolarizzazione. Alla fase terminale di questa concorre il bilancio tra la deattivazione di I_K , I_{K1} e la corrente *inward* I_{NaCa} .

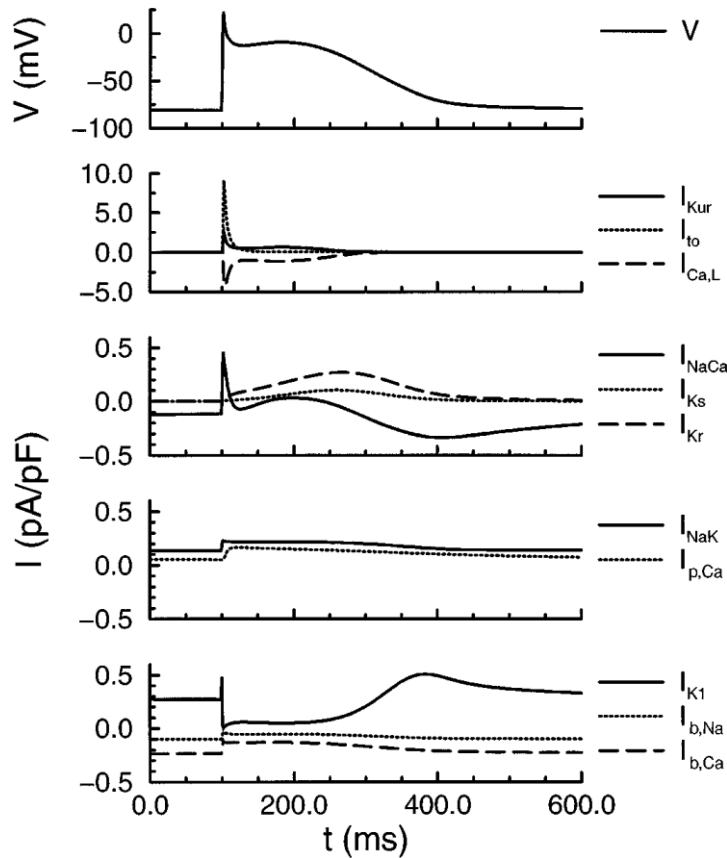


Figura 3.5. Potenziale d'azione e corrispondenti correnti ioniche generate dal modello a seguito di stimolazione ad una frequenza di 1Hz, partendo da condizioni di riposo.

Nel modello la dipendenza della durata del potenziale d'azione (APD) dalla frequenza di stimolazione, fondamentale per la comprensione dell'eccitabilità e dei pattern di propagazione negli atri, riproduce quanto osservato sperimentalmente: benchè le variazioni relative di APD siano più significative su APD_{50} che su APD_{90} [32,33], non si nota un incremento di durata per $BCL > 1s$.

AP Property	Time, ms			
	5,000	1,000	500	300
APD_{90} , ms	302	297	281	238
APD_{50} , ms	183	178	143	113
APA, mV	106	106	104	88
\dot{V}_{max} , V/s	216	216	212	132
APO, mV	25	25	25	12

Tabella 3.1. Caratteristiche del PA e loro dipendenza dalla frequenza.

L'analisi dei meccanismi sottostanti variazioni di APD può essere condotta esaminando l'andamento temporale delle correnti per BCL=0.3,1s. Le tracce rivelano come un incremento della frequenza di stimolazione riduca significativamente $I_{Ca,L}$ e tale osservazione, unitamente alle variazioni delle variabili di gating f ed f_{Ca} , attribuiscono un ruolo determinante a tale corrente nella dipendenza dalla frequenza del PA.

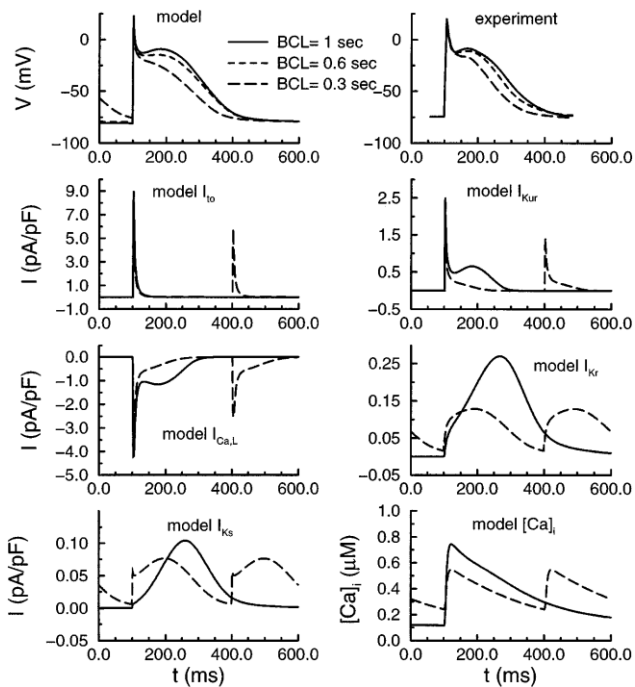


Figura 3.6. Influenza della frequenza di stimolazione su morfologia e durata del PA. I pannelli in alto rivelano come il modello riproduca quanto osservato sperimentalmente: il PA simulato dopo 12 s di stimolazione presenta APD decrescenti al diminuire del BCL. I restanti pannelli riportano l'andamento delle corrispondenti correnti ioniche per BCL=0.3, 1s.

Poiché le variazioni in ampiezza delle correnti devono essere considerate in relazione alle correnti attive nella medesima fase del PA, i CRN hanno riprodotto il potenziale d'azione isolando il contributo ad esso delle variazioni indotte dalla frequenza di stimolazione su $I_{Ca,L}$ e I_K (attraverso le corrispondenti variabili di gating).

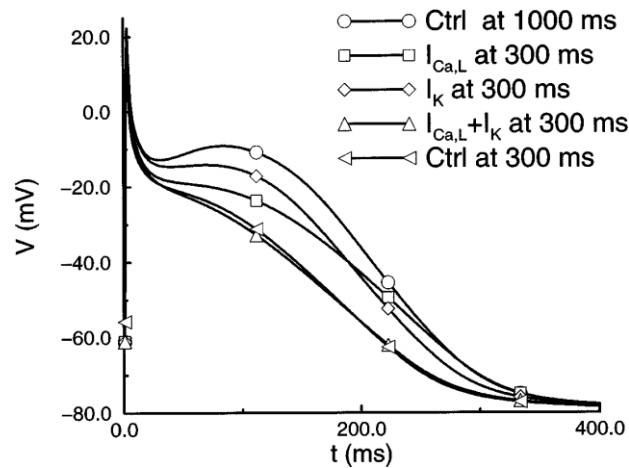


Figura 3.7. Ruolo delle correnti $I_{Ca,L}$ e I_K , singolarmente ed in combinazione, nella riproduzione della minore APD_{90} al decremento del BCL. La modifica indotta da I_K è ripartita equamente tra le due componenti della corrente. L'effetto della $[Ca^{2+}]_i$ per frequenze di stimolazione crescenti, che in combinazione a $I_{Ca,L}$ presenta lo stesso andamento prodotto dalla sola corrente, potrebbe riflettere l'azione opposta di una maggior $[Ca^{2+}]_i$ a riposo ed un transiente di calcio di ampiezza ridotta sull'inattivazione di $I_{Ca,L}$.

Gli autori del modello hanno quindi concluso che:

- L'effetto di decremento frequenza-dipendente della $I_{Ca,L}$ consiste nella riduzione del potenziale di plateau e nell'accelerazione della ripolarizzazione precoce. Il primo causa una minore attivazione di I_K , rallentando la ripolarizzazione terminale. L'esito è l'assenza di variazioni su APD;
- L'effetto dell'incremento frequenza-dipendente nell' I_K disponibile consiste nel minor potenziale di plateau e nel compenso delle conseguenze di questo sull'attivazione di tale corrente, mantenendo inalterata la velocità di ripolarizzazione terminale;
- Le alterazioni indotte dalla combinazione delle due correnti, sufficienti a giustificare la riduzione di APD al decremento del BCL, sono riassumibili in una riduzione del potenziale di plateau ed una più rapida ripolarizzazione terminale rispetto all'effetto della sola $I_{Ca,L}$.

L'adattamento dell'APD a variazioni di frequenza di stimolazione nel modello, coerentemente con gli esiti sperimentali di Li e Nattel [28], è annullata dal blocco dei canali del calcio L-type (riduzione del 90% della conduttanza e uso di nifedipina rispettivamente). La consistente riduzione del potenziale di plateau rende infatti trascurabile l'attivazione di I_K , quindi il suo contributo alla *rate-adaptation*. Sono analogamente riprodotti gli effetti di riduzione dell'APD ed iperpolarizzazione postuma indotti dal blocco della I_{NaCa} .

Seguendo quanto suggerito sperimentalmente, i ricercatori hanno analizzato la possibilità di riprodurre la variabilità morfologica del PA mediante modifica delle densità delle correnti transient outward (I_{to} , I_{Kur} , $I_{Ca,L}$). Come visualizzabile in figura 3.7, all'incremento di $g_{Ca,L}$ corrisponde un maggior APD_{90} , mentre ridotte variazioni in APD_{90} sono riscontrabili per g_{Kur} decrescenti; tali modifiche riproducono la transizione da una morfologia *spike-and-dome* ad una triangolare. Variazioni di I_{to} , nel pannello C di figura 3.8, riescono invece a replicare l'intera gamma morfologica di PA osservata sperimentalmente e classificata da Wang et. al [27]. In questo caso le morfologie spaziano da un PA rettangolare, con un breve plateau, in corrispondenza a g_{to} minori, ad un PA triangolare di minore durata per elevate g_{to} passando attraverso un andamento *spike-and-dome* in corrispondenza ai valori intermedi.

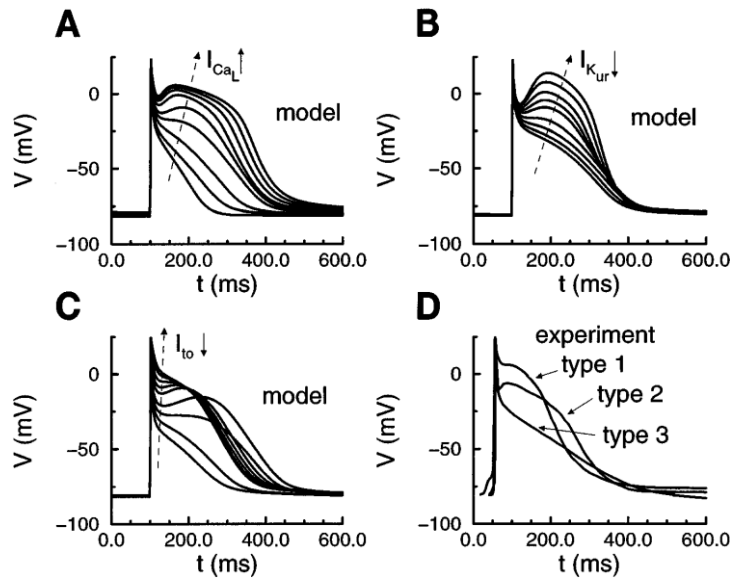


Figura 3.8. Effetto di variazione delle conduttanze delle correnti $I_{Ca,L}$, $I_{K_{ur}}$ e I_{to} , nel range $(0.1 \div 3)g_{contr}$ sulla morfologia del PA durante stimolazione ad 1 Hz. Il pannello D riporta la classificazione descritta da Wang et al.

3.2 Nygren et al.

Il modello, pubblicato sempre nel 1998, è stato sviluppato al fine di ottenere uno strumento con capacità predittive, circa aspetti selezionati delle risposte elettrofisiologiche dell'atrio umano, ed enfatizza il ruolo funzionale delle correnti di potassio nelle ripolarizzazioni, transiente e terminale, del PA. Come nel modello di CRN, Nygren et al. [34] hanno fatto ricorso, in caso di dati umani insufficienti alla caratterizzazione delle correnti ioniche, alle formulazioni di modelli precedentemente pubblicati, in particolare a quello di cellule atriali di coniglio di Lindblad, Murphey, Clark e Giles (LMCG) [35].

Per quanto concerne la struttura, il modello rappresenta il sarcolemma con il circuito equivalente elettrico sviluppato con il formalismo alla Hodgkin-Huxley ed introduce un compartimento fluido che include lo spazio intracellulare e quello extracellulare, bipartito in *cleft* e *bulk*. Si indica con *cleft* una porzione limitata del LEC che, circoscrivendo il miocita, risente di variazioni di concentrazioni ioniche indotte dalle correnti transmembrana.

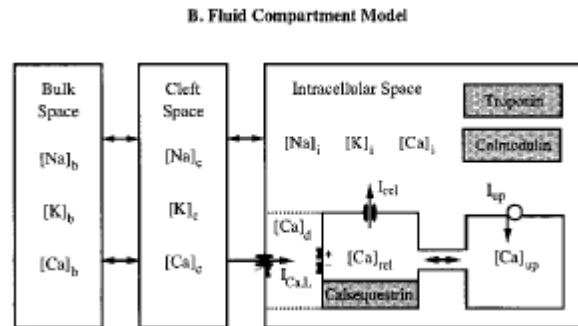


Figura 3.9. Rappresentazione schematica del compartimento fluido previsto dal modello.

3.2.1 Flussi ionici. Nello sviluppo dell'espressione per I_{Na} sono state adottate informazioni indirette fornite da registrazioni di potenziale d'azione, oltre che da dati di *voltage-clamp*: la curva di attivazione in stato stazionario è stata adattata in modo che il potenziale di soglia per la genesi del PA simulato sia coerente con le acquisizioni sperimentali ed il picco di tale corrente è stato scelto per riprodurre la massima velocità di *upstroke*.

I numerosi studi condotti sulla $I_{Ca,L}$ nei cardiomiociti atriali umani rivelano consistenza per quanto concerne soglia di attivazione (~ -40 mV), potenziale di picco (~ -0 mV) e potenziale di inversione ($-(50 \div 60)$ mV) mentre permane eterogeneità circa la densità di corrente, ridotta in condizioni patologiche. In base agli esiti sperimentali di Li e Nattel, l'inattivazione di $I_{Ca,L}$ è stata modellata come un processo coinvolgente due componenti, caratterizzate da distinti costanti di tempo ma da una stessa voltaggio-dipendenza in stato stazionario. L'inclusione di un dominio subsarcolemma interposto tra canali L-type e JSR, in cui la $[Ca^{2+}]_d$ può raggiungere valori più elevati rispetto a quelli dell'intero citoplasma, ha portato a rappresentare l'inattivazione Ca^{2+} -dipendente come funzione istantanea di $[Ca^{2+}]_d$, il cui valore determina la frazione di canali soggetti a rapida inattivazione. L'inattivazione dell'intera $I_{Ca,L}$ segue quindi una dinamica biesponenziale, dove il contributo delle

componenti rapide e lente è determinato dalla $[Ca^{2+}]_d$. Si nota infine che il potenziale di inversione di tale corrente è impostato ad un valore costante, pari a +60mV e corrispondente alle misure di Li e Nattel, anziché al potenziale di Nernst dello ione calcio.

Tra le correnti *outward* responsabili della ripolarizzazione vengono riprodotte la *transient outward* di K^+ (I_t), soggetta a rapida attivazione a potenziali depolarizzati, e la *sustained outward* (I_{sus}), osservabile a seguito dell'inattivazione della prima e costituita principalmente da ioni K^+ . La formulazione di I_t è stata basata sulle acquisizioni condotte, in corrispondenza a basse $[Cd^{2+}]$, su cellule atriali umane di Shibata et al. [36]. Elevate concentrazioni di Cd^{2+} , usato come bloccante dell' $I_{Ca,L}$, sembrano infatti essere responsabili della variabilità del potenziale di metà attivazione ($V_{1/2}$) riscontrata sperimentalmente. La modellazione di I_{sus} , fondata sui dati di Wang et al. [37], include una lenta e parziale inattivazione. Le costanti di tempo del processo di inattivazione sono state determinate mediante *fitting*, con una funzione biesponenziale, del decadimento delle correnti *outward* riportate da Koidl et al. [38]. Questo metodo fornisce una più accurata separazione delle componenti I_t e I_{sus} , la cui combinazione riproduce le tracce ricavate da miociti atriali a seguito dell'applicazione di impulsi di voltage-clamp.

La corrente di potassio *delayed rectifier* è generata da due conduttanze, una rapida ($I_{K,r}$) ed una lenta ($I_{K,s}$), che possono essere isolate sperimentalmente grazie alla sensibilità della prima a farmaci antiaritmici. Nonostante $I_{K,s}$ sembri contribuire in misura minore all'intera *delayed rectifier* in un normale PA, la sua azione diviene significativa ad elevate frequenze di stimolazione; ciò giustifica la sua inclusione nel modello, con la conseguente possibilità di indagare la variazione di APD e refrattarietà ad alte frequenze.

Le correnti tempo-indipendenti ($I_{B,Na}$, $I_{B,Ca}$, I_{NaK} , I_{NaCa} , I_{CaP}), in assenza di dati sperimentali su cellule atriali, sono stati

mutuati dal modello LMCG, a meno di fattori di scala. Fa eccezione la I_{K1} , per la quale sono state apportate modifiche alle caratteristiche di rettificazione per riprodurre dati di PA.

Al fine di garantire la stabilità di lungo periodo delle concentrazioni ioniche, nel modello è stato introdotto un flusso elettroneutrale inward di Na^+ ($\Phi_{\text{Na, en}}$), che può essere considerato accoppiato a meccanismi di trasporto quali lo scambiatore $\text{Na}^+\text{-H}^+$ ed il cotrasportatore $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}$. Tale flusso, la cui ridotta entità rivela la scelta di valori di conduttanza idonei a garantire l'omeostasi ionica, consente di estendere la durata temporale delle simulazioni, garantendo la significatività delle stesse.

Rispetto al modello LMCG, per quanto concerne la gestione del calcio intracellulare ad opera del SR, il termine voltaggio-dipendente della formulazione dell'attivazione del rilascio di Ca^{2+} è stato sostituito con una dipendenza da $[\text{Ca}^{2+}]_d$; il solo meccanismo per il rilascio di tale ione da parte del SR è pertanto il ciclo CICR. Quest'ultimo è reso stabile mediante separazione del trigger di Ca^{2+} dal rilascio ad opera del SR: i canali del SR rilevano la $[\text{Ca}^{2+}]_d$, mentre il rilascio avviene direttamente nel citosol.

3.2.2. Morfologia del PA simulato. La variabilità morfologica del PA registrato su miociti isolati o su preparati multicellulari di atrio umano è imputata all'entità delle correnti ioniche sottostanti. Il PA simulato, come visualizzabile in figura 3.10, riproduce fedelmente la forma d'onda acquisita più frequentemente da Nygren et al.

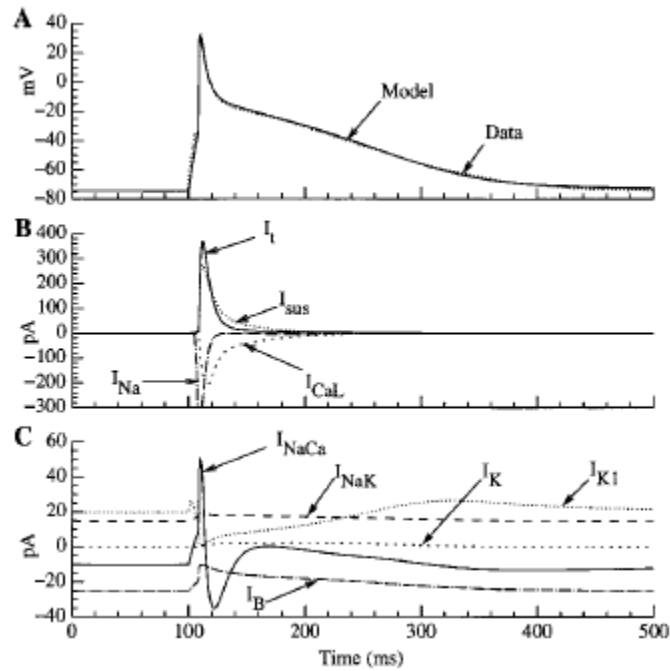


Figura 3.10. (A) Confronto tra il PA generato dal modello e quello acquisito sperimentalmente. (B,C) Andamento delle correnti ioniche durante il PA: I_{Na} è la prima corrente a rispondere ad un impulso di depolarizzazione applicato all'istante $t=100ms$ ed è responsabile della fase 0. La depolarizzazione causa l'attivazione di I_t , I_{sus} e $I_{Ca,L}$, inducendo la ripolarizzazione transiente, dominata da I_t . Data la lenta attivazione di $I_{Ca,L}$, il flusso netto di carica viene gradualmente dominato da $I_{Ca,L}$, con effetto depolarizzante, e I_t , ripolarizzante. Queste correnti concorrono alla formazione del plateau. Infine $I_{Ca,L}$ inattiva lentamente e l'azione di I_{sus} introduce la fase 3, in cui la presenza di I_K ed I_{K1} ripristina il potenziale di riposo (fase 4).

L'andamento del transiente di calcio durante il PA, mostrato in figura 3.11, rivela un incremento quasi istantaneo della $[Ca^{2+}]_i$, che passa dal valore diastolico (~ 65 nmol/L) a quello di picco (~ 1.3 μ mol/L) grazie al rilascio ad opera del SR. Al declino della $[Ca^{2+}]_i$ concorrono:

- L'azione di 'immagazzinamento temporaneo' esercitata dai buffer citoplasmatici (troponina e calmodulina);
- L'*uptake* di tale ione ad opera del SR, che costituisce anche il percorso di rimozione dal citoplasma a seguito della dissociazione dello ione dai buffer;
- La rimozione mediata dallo scambiatore Na^+-Ca^{2+} e dalla pompa di Ca^{2+} . In media tale meccanismo drena la quota di

Ca^{2+} entrato nella cellula attraverso $I_{\text{Ca,L}}$ e $I_{\text{B,Ca}}$, prevenendo l'accumulo dello ione durante stimolazioni ripetute.

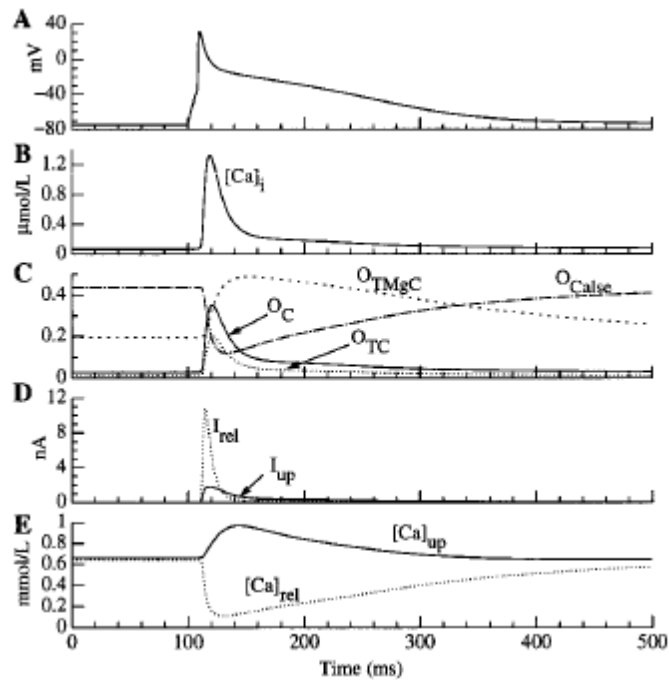


Figura 3.11. (A) Potenziale d'azione simulato. (B) Cocentrazione del calcio intracellulare. (C) Curve di legame con i buffer troponina, calmodulina e calsequestrina. (D) Correnti di rilascio ed uptake nel SR. (E) Concentrazioni di Ca^{2+} nei compartimenti di rilascio ed uptake del SR.

Per individuare le correnti ioniche responsabili della variabilità morfologica del PA, Nygren et al. hanno valutato l'andamento delle curve di sensibilità. Queste sono ottenute mediante derivata parziale del potenziale di membrana rispetto alle singole conduttanze normalizzata al valore nominale delle stesse:

$$\varepsilon_x = g_x \frac{\partial v}{\partial g_x}$$

Molte di tali funzioni, come mostrato in figura 3.12, assumono valore massimo, in modulo, durante la fase 3 del PA. Ciò indica come perturbazioni delle conduttanze abbiano effetto significativo durante la ripolarizzazione terminale. L'evoluzione temporale delle curve di sensibilità indica quali correnti ioniche influenzino maggiormente la forma d'onda del

PA in un dato istante. Si nota, ad esempio, che g_t, g_{sus} e $g_{Ca,L}$ sono parametri più importanti nelle fasi 1 e 2 del PA.

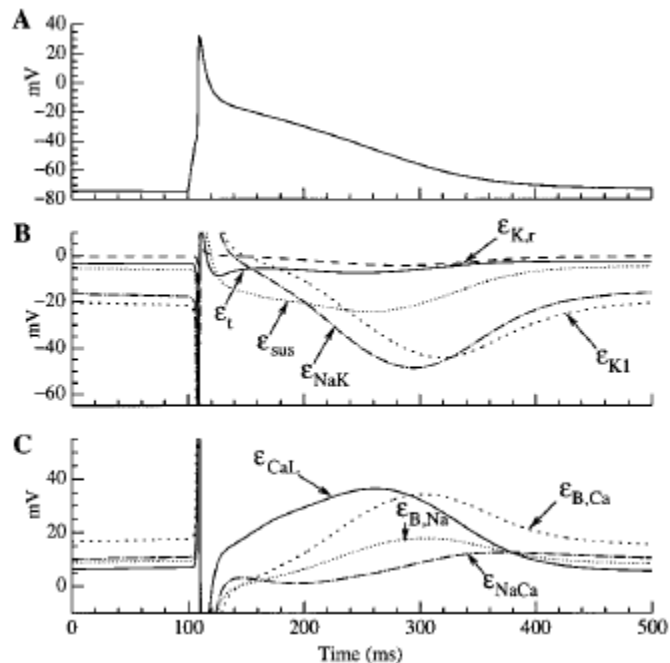


Figura 3.12 (A) Forma d'onda del PA simulato. (B) Funzioni di sensibilità rispetto ai fattori di scala per le correnti outward. (C) Funzioni di sensibilità rispetto ai fattori di scala per le correnti inward.

Nygren et al. hanno inoltre indagato l'influenza delle differenti correnti ioniche sull'APD, data la dimostrazione dell'efficacia di farmaci di classe III (che prolungano l'APD) sul trattamento di aritmie atriali [39]. In particolare, dopo aver effettuato un'analisi di sensitività, hanno esaminato gli effetti derivanti dal blocco delle correnti ripolarizzanti I_t e I_{sus} .

In figura 3.13 pannello A è riportato il PA in corrispondenza a diversi gradi di blocco della I_t , simulati mediante riduzione della corrispondente conduttanza. Coerentemente con gli esiti sperimentali, la riduzione di tale corrente causa un incremento del potenziale di picco e di plateau, intensificando l'azione di I_{sus} sulla ripolarizzazione. Il prolungamento del PA che ne deriva è moderato. Nel pannello B l'inibizione di I_{sus} altera la sola fase 2 del PA, causando un più consistente incremento dell'APD. Data l'azione dei

bloccanti farmacologici su più tipologie di canali ionici, il pannello C riporta un'azione di blocco su entrambe le correnti, che risulta in una combinazione degli effetti precedenti.

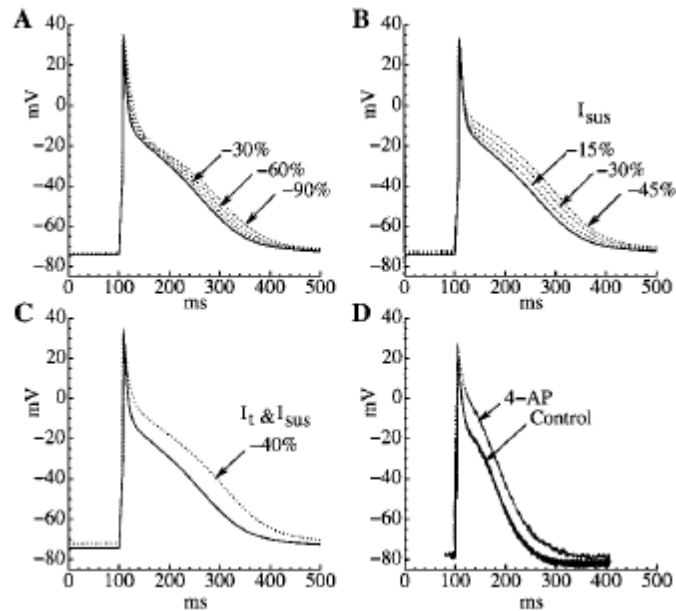


Figura 3.13. (A) Effetto di blocco di I_t . (B) Effetto di blocco di I_{sus} . (C) Il blocco combinato di I_t e I_{sus} allarga il picco e prolunga il PA. (D) Registrazione del PA in condizioni di controllo ed a seguito della somministrazione del bloccante farmacologico 4-AP.

La validità delle considerazioni precedentemente riportate è stata supportata dall'analisi degli effetti delle assunzioni adottate su correnti come $I_{Ca,L}$ e I_{sus} , che mostrano grande variabilità in ampiezza nelle acquisizioni sperimentali, e $I_{K,r}$, la cui ridotta entità, riprodotta nel modello, potrebbe essere imputata alle tecniche di isolamento dei miociti atriali. La figura 3.14 ad esempio mostra che il ruolo di I_{sus} nel determinare l'APD dipende fortemente dall'entità di $I_{K,r}$. Il blocco parziale di I_{sus} origina un plateau più depolarizzato, incrementando l'attivazione di $I_{K,r}$. Quest'effetto, che compensa l'effetto di prolungamento dell'APD ad opera del blocco di I_{sus} , è intensificato al crescere di $I_{K,r}$.

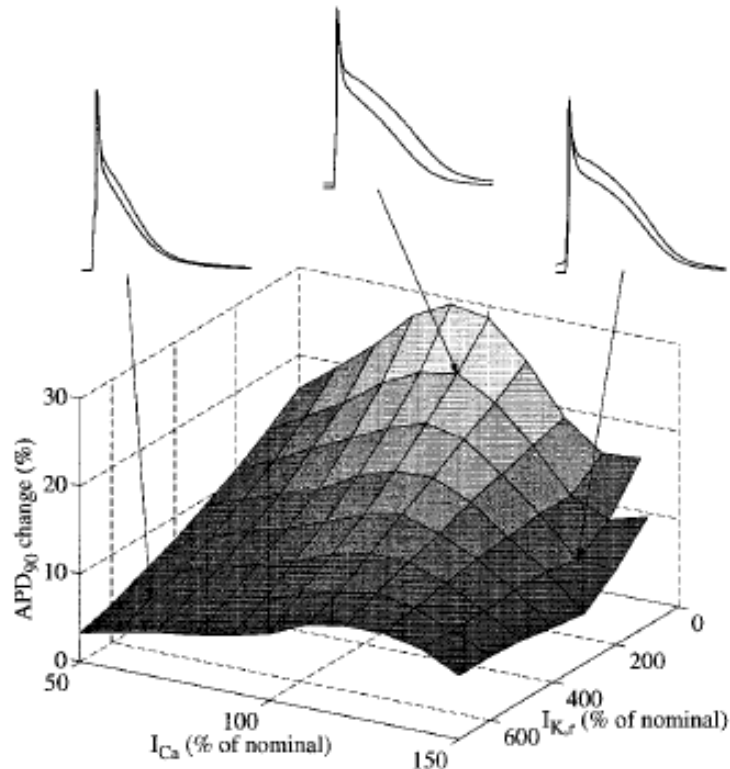


Figura 3.14. Prolungamento dell'APD₉₀ indotto dal dimezzamento di I_{sus} , riportato in funzione di $I_{Ca,L}$ e $I_{K,r}$. Gli inserti, di cui quello centrale corrisponde ai valori nominali, mostrano esempi di PA prima e dopo il blocco della corrente I_{sus} .

3.3 I due modelli a confronto

I due modelli precedentemente descritti sono stati pubblicati lo stesso anno e, essendo basati in larga misura sugli stessi dati sperimentali, dovrebbero fornire essere simili tra loro. Le simulazioni con essi condotti hanno tuttavia portato a conclusioni contraddittorie circa le principali proprietà del PA atriale umano. Ad esempio Nygren et al. hanno attribuito a I_{sus} , corrispondente ad I_{Kur} in CRN, un ruolo decisivo nella determinazione dell'APD, indicando il canale attraverso cui tale corrente fluisce come potenziale target per farmaci di classe III. Il blocco parziale di tale corrente causa un significativo prolungamento del PA nel modello di Nygren et al., mentre in CRN la riduzione di questa conduttanza non ha effetti sull'APD.

Si riportano di seguito le principali differenze tra i due modelli:

- **Struttura analitica:** il modello di Nygren et al. adotta 29 variabili di stato, 12 correnti transmembrana, un SR bipartito in due compartimenti ed un ristretto spazio subsarcolemma per la gestione del Ca^{2+} , concentrazioni ioniche variabili nel cleft ed un sistema di buffering ai fini della descrizione elettrofisiologica del miocita atriale. Il modello CRN ricorre a 21 variabili, utilizza le stesse espressioni per le 12 correnti transmembrana ed un sistema di *calcium-handling* includente un SR a due compartimenti e buffer intracellulari.
- La **morfologia del PA** mostra significative differenze nei due modelli. CRN assume una morfologia *spike-and-dome*, mentre Nygren et al. adotta un potenziale d'azione triangolare. Principale causa di tale differenza è data da significativi scostamenti nei valori attribuiti ai parametri di massima conduttanza. Mediante opportune modifiche (60% di riduzione in I_{sus} , 100% di incremento in I_{t} , 33% di incremento in $I_{\text{Ca,L}}$ e 200% di incremento in I_{Kr} e I_{Ks}) il PA simulato da Nygren et. al riproduce approssimativamente quello di CRN.
- **Differenze nelle proprietà sotto soglia.** Il potenziale di riposo in CRN è di 7 mV più iperpolarizzato di quello di Nygren et al., causando una minor resistenza di membrana (174 Ω rispetto a 600 Ω), poiché la pendenza della relazione non lineare I-V di I_{K1} è maggiore a questo potenziale. Il primo è pertanto caratterizzato da un potenziale di riposo più stabile, in grado di compensare, ad esempio, un incremento di I_{NaCa} a seguito dell'accumulo di Ca^{2+} intracellulare. Le caratteristiche di gating di I_{Na} , traslate di -15 mV in CRN, implicano una minor soglia di attivazione. Le differenze sotto soglia potrebbero avere conseguenze nelle proprietà di conduzione dei modelli.

CAPITOLO 4:

MODELLI RECENTI DI CARDIOMIOCITI ATRIALI UMANI

4.1 Maleckar et al.

Il modello di Maleckar et al., pubblicato nel 2009, incorpora in quello di Nygren et al. [34] nuove formulazioni delle correnti I_t e I_{Kur} (componenti transiente e sostenuta delle correnti di K^+ outward), al fine di dare accurata rappresentazione del processo di ripolarizzazione (fasi 1, 2 e 3 del PA) e valutare il suo contributo all'adattamento in frequenza del potenziale d'azione [40]. In seguito, tale modello verrà indicato con l'acronimo hAMr, identificativo di miocita atriale umano con una nuova ripolarizzazione.

In figura 4.1 è riportata una rappresentazione schematica del modello matematico, in cui si evidenziano le correnti ioniche oggetto di modifica rispetto alla pubblicazione di Nygren et al.

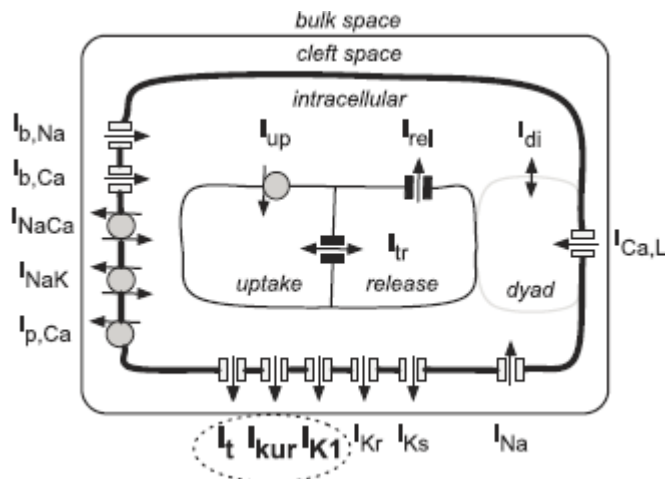


Figura 4.1. Rappresentazione grafica della compartimentalizzazione prevista dal modello hAMr: sono riportate le correnti ioniche mediate da canali, scambiatori e pompe elettrogeniche. Il cardiomiocita è modellato come cellula cilindrica di lunghezza $130\mu\text{m}$ e raggio $11\mu\text{m}$, con una capacità di membrana $C_m=50\text{pF}$.

4.1.1 Formulazione dei flussi ionici. La corrente I_t , che nel modello di Nygren et al. era basata su acquisizioni condotte su cellule atriali di coniglio, è caratterizzata da una rapida attivazione ($\sim 10\text{ms}$), seguita da una più lenta inattivazione ($\sim 20\text{ms}$). Il modello, fondandosi primariamente su dati sperimentali pubblicati da Wang et al. [41,42], prevede un aggiornamento della costante di tempo del recupero dall'inattivazione (10^{-4}s rispetto a 0.3s previsti nel modello di Nygren et al.) ed un incremento del 9% circa del valore di conduttanza massima g_t .

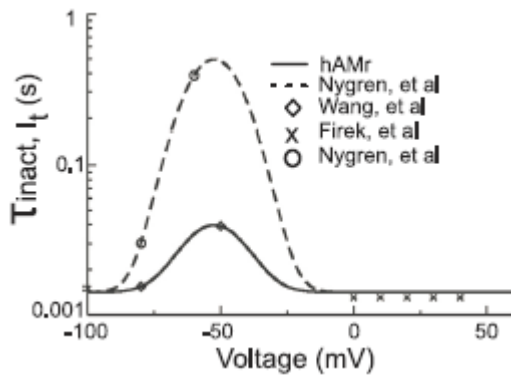


Figura 4.2. La formulazione di I_t deriva dalla combinazione dei dati di inattivazione e recupero dall'inattivazione pubblicati da Firek et al. e Wang et al.

Nel confronto tra le tracce simulate dai due modelli in risposta ad un gradino di voltage clamp a -20 e $+20\text{mV}$, riportate in figura 4.3, si riscontra una riduzione della velocità di decadimento della versione aggiornata rispetto all'originale, nel passaggio da potenziali di valori di potenziali negativi a positivi.

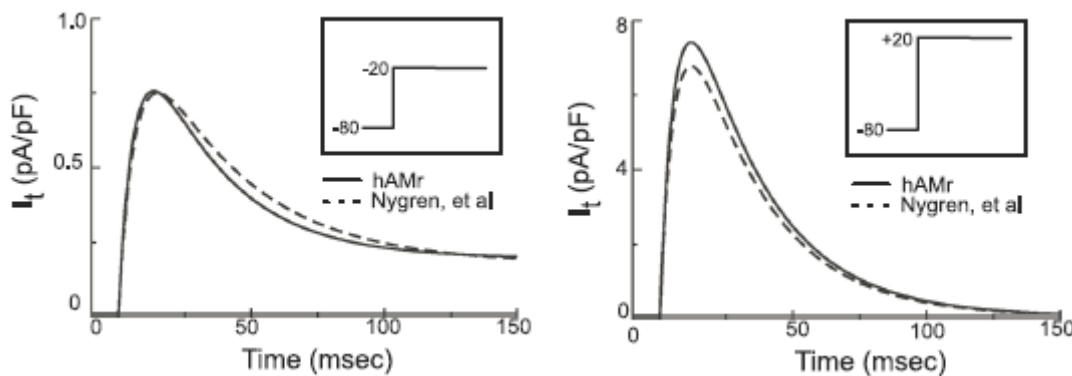


Figura 4.3. Correnti simulate dal modello di Nygren et al. e hAMr in corrispondenza a protocolli di voltage-clamp specificati negli inserti.

L'andamento del picco di I_t in funzione della frequenza di stimolazione, normalizzato rispetto al valore assunto in corrispondenza a 0.1Hz, ricalca i dati sperimentali di Fermini et al. ed evidenzia una minore dipendenza da tale parametro rispetto al modello di Nygren et al.

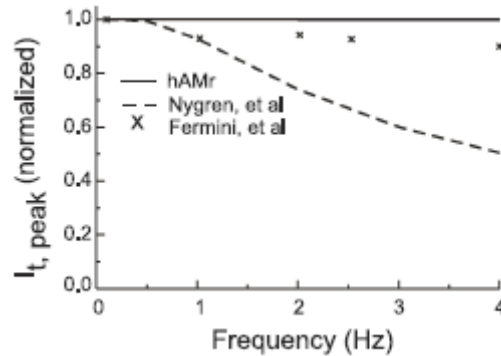


Figura 4.5 Andamento del picco di I_t , in funzione della frequenza di stimolazione, per i due modelli. E' riportato per confronto l'andamento dei dati sperimentali di Fermini et al. (ottenuti applicando, a partire da un potenziale di -60mV, 100 impulsi di 0mV e durata 200ms alle frequenze 0.1, 0.5, 1, 2, 3Hz).

La corrente I_{Kur} , indicata come I_{sus} nel modello di Nygren et al., è modificata in accordo a dati sperimentali [43] che evidenziano una sua rapida attivazione e lenta ma completa inattivazione. In particolare la costante di tempo di inattivazione a potenziali iperpolarizzati è stata decuplicata e la massima conduttanza di canale g_{Kur} è stata ridotta dell'11%.

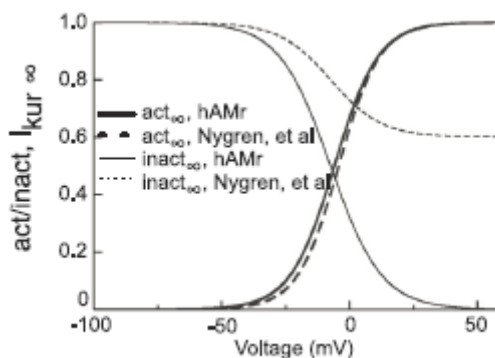


Figura 4.6. Confronto tra le curve di attivazione ed inattivazione in stato stazionario per I_{Kur} nei due modelli.

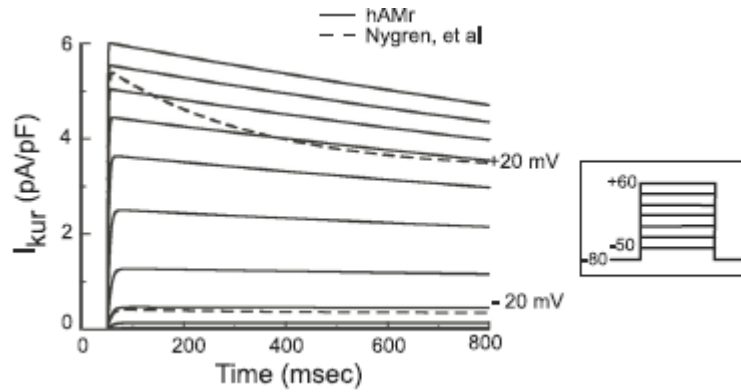


Figura 4.7. Andamento della corrente I_{Kur} simulata dal modello in corrispondenza a protocolli di voltage clamp specificati nell'insero. L'andamento di I_{sus} per potenziali di test pari a 20 e -20mV evidenzia un più rapido decadimento di questa rispetto ad I_{Kur} .

La nuova formulazione di I_{Kur} riduce la frazione di corrente disponibile all'aumentare della frequenza di stimolazione. La figura 4.8 mostra come l'andamento del valore assunto da tale corrente alla fine dell'impulso di voltage-clamp si avvicini ai dati sperimentali di Feng et al [44], rispetto alla formulazione di Nygren et al.

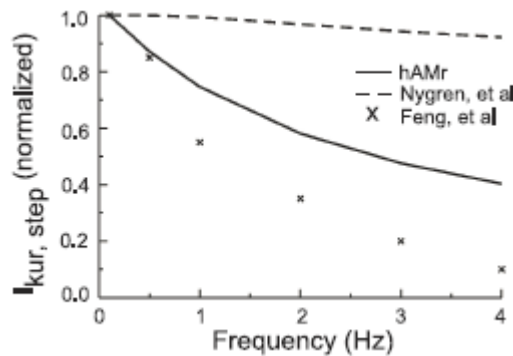


Figure 4.8. Andamento di I_{Kur} al termine dell'impulso al potenziale di test per i due modelli unitamente ai dati sperimentali.

Pur mantenendo la formulazione originaria di I_{K1} , ne è stato modificato il valore di conduttanza massima (g_{K1}), incrementandolo del 3%, al fine di riprodurre il potenziale di riposo registrato sperimentalmente. In figura 4.9 si nota come il potenziale di riposo del cardiomiocita, pari a -74mV circa, sia fortemente influenzato da tale corrente.

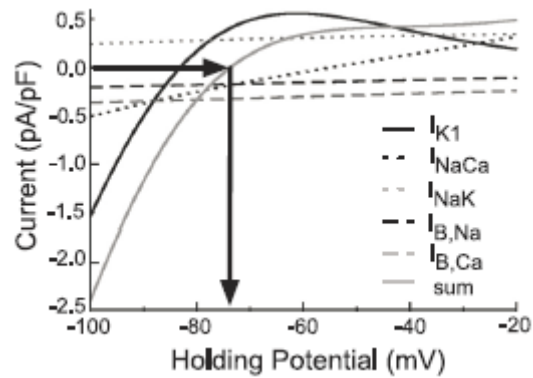


Figura 4.9. Relazioni I-V delle correnti responsabili della stabilità del potenziale di resting. Le frecce indicano un flusso netto di carica nullo in corrispondenza a -74 mV.

Per quanto concerne I_{Na} , il valore di picco è stato aumentato del 12.5% al fine di ottenere una massima velocità di *upstroke* coerente con gli esiti sperimentali.

Il flusso entrante di Na^+ elettroneutrale ($\Phi_{Na,en}$) è stato rimosso attribuendo la corrente di stimolo, iniettata nel mioplasma, ad un flusso di ioni K^+ . Tale modifica garantisce il rispetto del principio di conservazione della carica indipendentemente dal protocollo di stimolazione adottato.

4.1.2 Morfologia e ripolarizzazione del PA. Gli scostamenti morfologici tra il potenziale d'azione simulato in hAMr rispetto a quello di Nygren et al. si manifestano nelle fasi di ripolarizzazione: in figura 4.10 si nota un lieve rallentamento della fase 1 ed una più rapida fase 3.

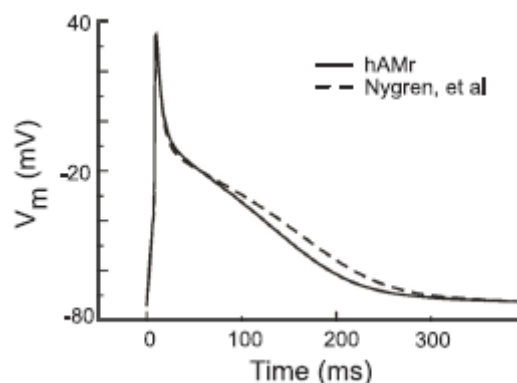


Figura 4.10. PA generati dai modelli hAMr (curva continua) e Nygren et al. (curva tratteggiata).

Occorre notare che, data l'eterogeneità dei PA registrati su cardiomiociti atriali, la genesi del potenziale d'azione nel modello hAMr deriva dalla riproduzione delle cinetiche delle correnti di K^+ e da un adattamento della forma d'onda ottenuta alle proprietà medie osservate sperimentalmente. In questo il modello si discosta dalle scelte effettuate da Nygren et al., che hanno identificato i parametri al fine di ottenere un'esatta corrispondenza del PA simulato con la forma d'onda acquisita più frequentemente nel loro laboratorio.

In figura 4.11 è riportata la simulazione degli andamenti temporali del potenziale di membrana e delle correnti I_t e I_{Kur} nei primi 50ms del PA. Il pannello A evidenzia l'incremento della velocità di upstroke, conseguenza del maggior valore di picco di I_{Na} , e la riduzione della velocità di ripolarizzazione transiente, attribuibile all'alterazione del contributo netto di I_t e I_{Kur} , nel modello hAMr. Nel pannello B si nota l'incremento della velocità di attivazione di I_t , che raggiunge un picco maggiore; per contro, I_{Kur} , che inattiva più lentamente, è denotata da ampiezza minore in corrispondenza al picco. Nonostante la differenza sulle singole componenti, l'azione combinata delle due correnti è comparabile nei due modelli.

L'incremento di velocità della ripolarizzazione terminale nel

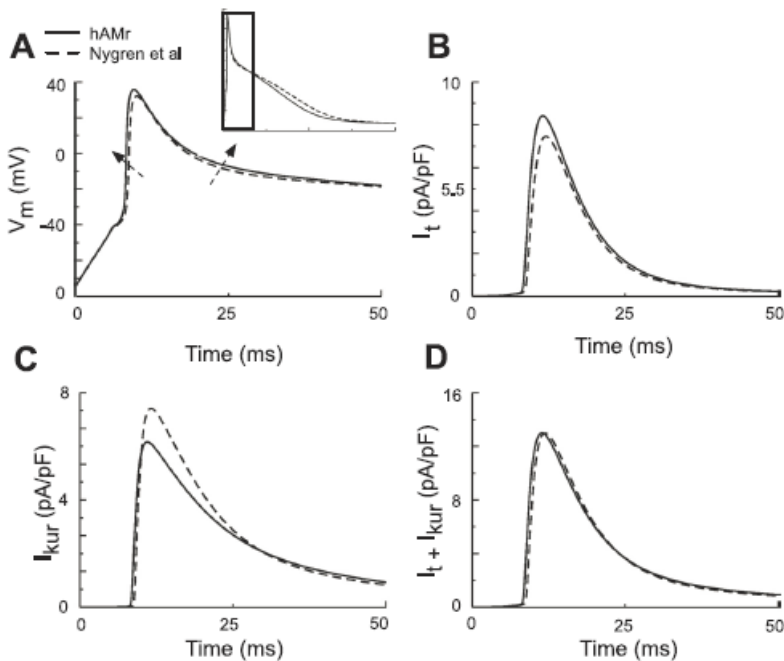


Figura 4.11. (A) Confronto della morfologia del PA durante la ripolarizzazione transiente nei due modelli. (B,C) Tracce di I_t ed I_{Kur} nei primi 50ms del PA. (D) Somma di I_t ed I_{Kur} nei due modelli.

modello hAMr corrisponde invece ad una maggior densità di I_{K1} e ad una minore di I_{Kur} . In figura 4.12 si nota come l'andamento temporale di I_{Kur} durante lo sviluppo del potenziale d'azione sia analogo nei due modelli.

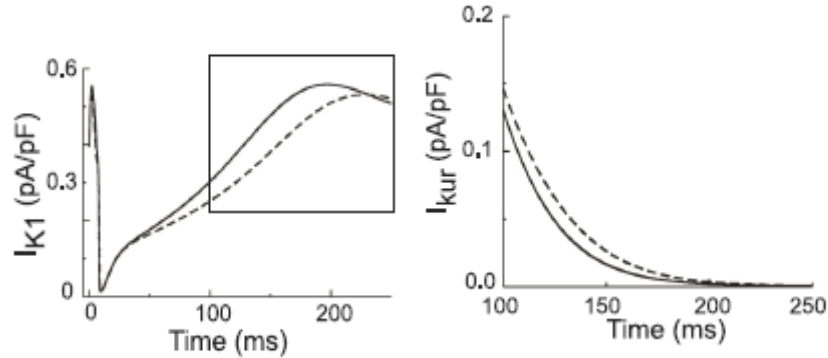


Figura 4.12. Andamento temporale delle densità di corrente I_{K1} e I_{Kur} durante lo sviluppo del PA nel modello hAMr (curva continua) ed in quello di Nygren et al. (curva tratteggiata).

Le curve di APD-restitution per il modello hAMr replicano adeguatamente i dati sperimentali pubblicati da Dawodu et al. [45], nonostante anche il modello originale riproduca un incremento di APD_{30} all'aumentare della frequenza di stimolazione. Per quanto concerne l' APD_{90} il modello hAMr, diversamente da quello di Nygren et al., riproduce la continua decrescita per frequenze di stimolazione che eccedono i 2Hz.

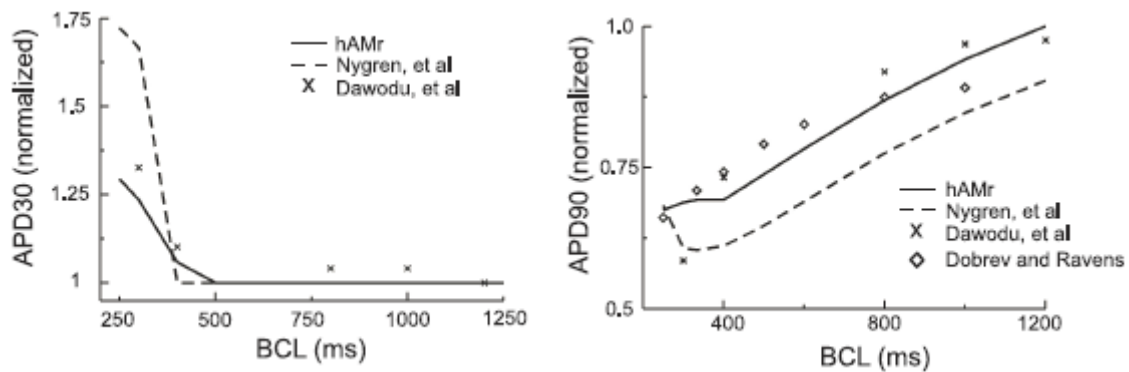


Figura 4.13. Curve di APD-restitution, confrontate con i dati sperimentali, per i due modelli. APD_{30} è normalizzata rispetto al valore assunto a $BCL=1600ms$, mentre APD_{90} rispetto a quello assunto a $BCL=1200ms$.

4.2 Koivumäki et al.. Il modello di miocita atriale umano pubblicato da Koivumäki et al. nel 2011 è caratterizzato da una formulazione spazialmente e fisiologicamente dettagliata del rilascio e recupero di Ca^{2+} dal reticolo sarcoplasmatico. L'obiettivo che ne ha decretato lo sviluppo è stato quello di valutare l'influenza del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sulla forma d'onda del PA, così come il suo effetto sull'eccitabilità cellulare e sull'adattamento in frequenza dei meccanismi elettrofisiologici.

Adottando le formulazioni di correnti ioniche previste dal modello di Nygren et al. [34], a meno di aggiustamenti minori dei parametri, il modello prevede la suddivisione del compartimento intracellulare in:

- *junctional* citosol, regione profonda $0.02\mu\text{m}$ a contatto con il sarcolemma;
- *bulk* citosol, che include il resto del compartimento intracellulare. Bulk citosol e SR sono divisi in 4 sotto-compartimenti con dimensione trasversale di $1.63\mu\text{m}$; i RyR e la pompa SERCA collocati nel compartimento di testa del SR interagiscono con il *junctional* citosol, mentre i restanti con i corrispondenti compartimenti bulk.

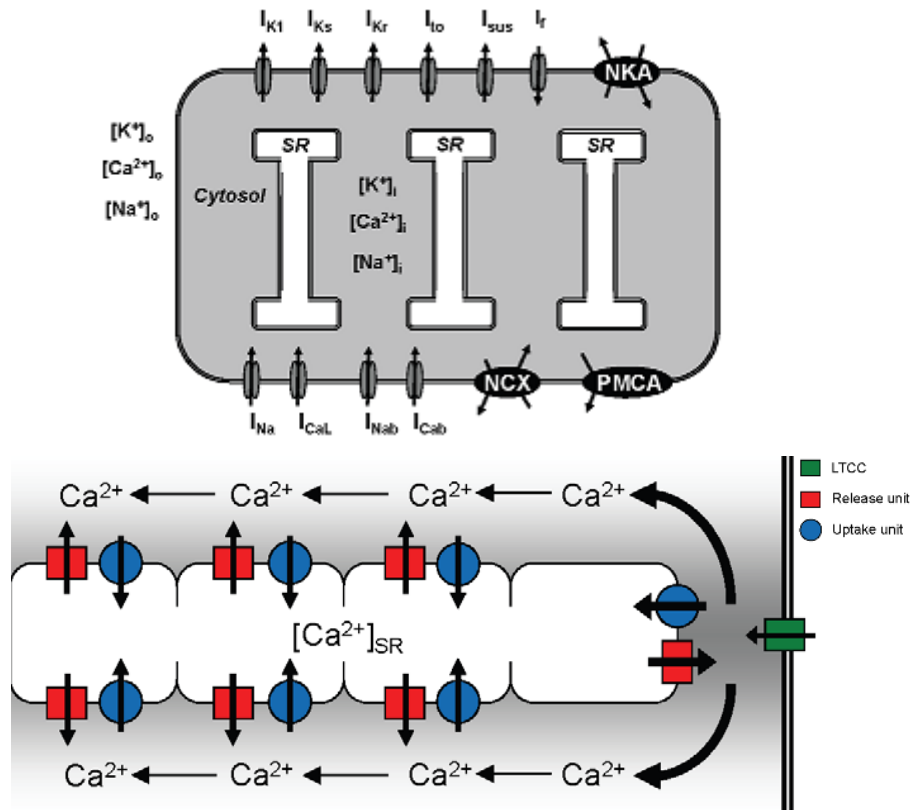


Figura 4.14. Rappresentazione schematica del modello di miocita atriale umano proposto da Koivumäki et al. [ref46]. Nel pannello inferiore è riportata la compartimentalizzazione del citosol descritta in precedenza. Ogni entità rossa include i RyR e correnti di perdita dal SR, mentre la blu rappresenta la pompa SERCA.

La morfologia del PA scaturisce dall'attivazione coordinata di correnti voltaggio-dipendenti depolarizzanti e ripolarizzanti. Tra le prime, I_{Na} e $I_{Ca,L}$ sono determinanti nella fase iniziale, mentre I_{NCX} , corrente di scambiatore Na^+-Ca^{2+} , in quella terminale del potenziale d'azione. I_{to} e I_{sus} sono ampie correnti responsabili della fase 1 e determinano un potenziale di notch di $-30mV$. In seguito la ripolarizzazione è guidata da $IK1$, con ridotto contributo di IKs e IKr . La corrente If , pur essendo significativa nei cardiomiociti atriali, non contribuisce al PA poiché si attiva a potenziali inferiori a $-80mV$. Infine la pompa di calcio di sarcolemma (PMCA) genera una corrente ridotta.

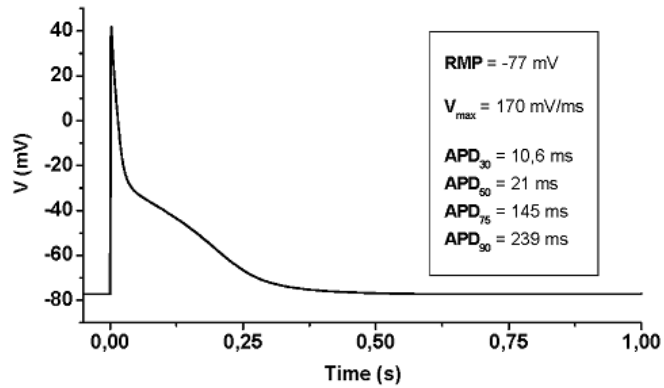


Figura 4.15. Morfologia del PA simulato dal modello. Nell'inserito le principali proprietà del potenziale d'azione, in linea con le osservazioni sperimentali.

4.2.1 Dinamica del calcio intracellulare e APD. Nel modello considerato, il transiente medio di Ca^{2+} citosolico presenta, in corrispondenza ad una frequenza di stimolazione di 1Hz, una concentrazione a riposo di $0.15\mu\text{M}$ ed un'ampiezza di $0.58\mu\text{M}$. Nonostante il rilascio locale tenda ad omogeneizzare il segnale di Ca^{2+} , l'eterogeneità spaziale e temporale riscontrate sperimentalmente vengono adeguatamente riprodotte. Il ritardo tra il rilascio periferico e centrale di Ca^{2+} determina un andamento bifasico dell'upstroke del transiente di tale ione.

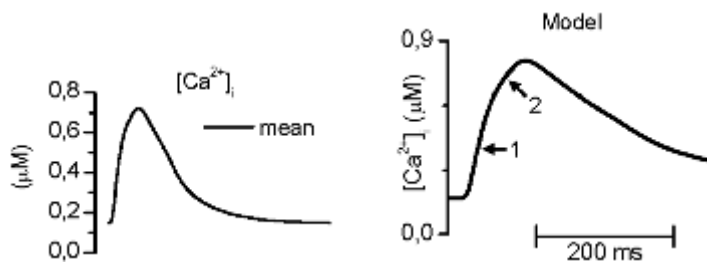


Figura 4.16 Andamento del transiente di Ca^{2+} simulato dal modello (a sinistra) e zoom della sua fase di upstroke per evidenziarne l'incremento bifasico (a destra).

Simulazioni condotte riducendo i valori di conduttanza dei RyR attribuiscono il 77% del transiente di Ca^{2+} al rilascio dal SR, con contributo determinante del suo compartimento junctional. Al termine della fase diastolica meccanismi di diffusione interni al reticolo sarcoplasmatico riequilibrano la $[\text{Ca}^{2+}]$ nelle sue quattro suddivisioni.

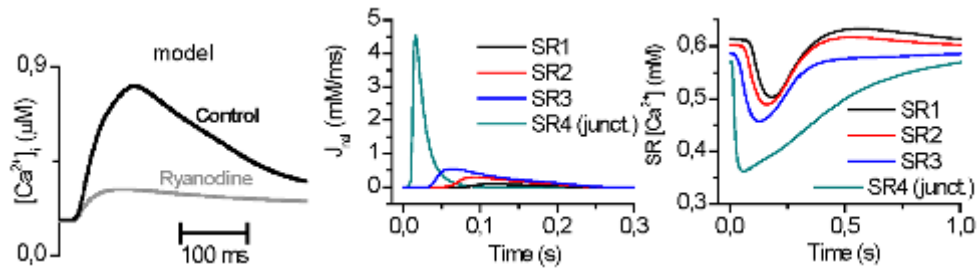


Figura 4.17. Dinamica del Ca^{2+} nel SR prevista dal modello. (Da sinistra a destra). L'inibizione dei RyR riduce significativamente l'ampiezza del transiente di calcio, in accordo a quanto osservato sperimentalmente [47]. Il rilascio di Ca^{2+} avviene primariamente ad opera del SR. Meccanismi diffusionali interni al SR durante la fase diastolica.

Al fine di analizzare il ruolo dei siti di rilascio *junctional* e *non-junctional* del SR sul transiente di Ca^{2+} , gli autori hanno condotto esperimenti *in silico* in cui questi venivano alternativamente bloccati. L'effetto più significativo dell'inibizione dei siti di rilascio nel *bulk citosol*, come si nota in figura 4.18, è dato dall'inomogeneità del segnale di Ca^{2+} , che non raggiunge il centro della cellula; essi fungono quindi da amplificatori più che da sorgenti di segnale. L'inibizione dei siti *junctional* porta ad esiti parzialmente opposti: l'APD si riduce perché, in corrispondenza ad un leggero incremento della $[Ca^{2+}]_i$, l'attivazione di I_{NCX} è significativamente inferiore. In analogia al caso precedente l'inibizione di tali siti di rilascio limita la propagazione del segnale di Ca^{2+} al centro della cellula; la frazione di Ca^{2+} proveniente dai canali L-Type non è sufficiente ad innescare il processo di CICR al primo sito di rilascio del *bulk citosol*.

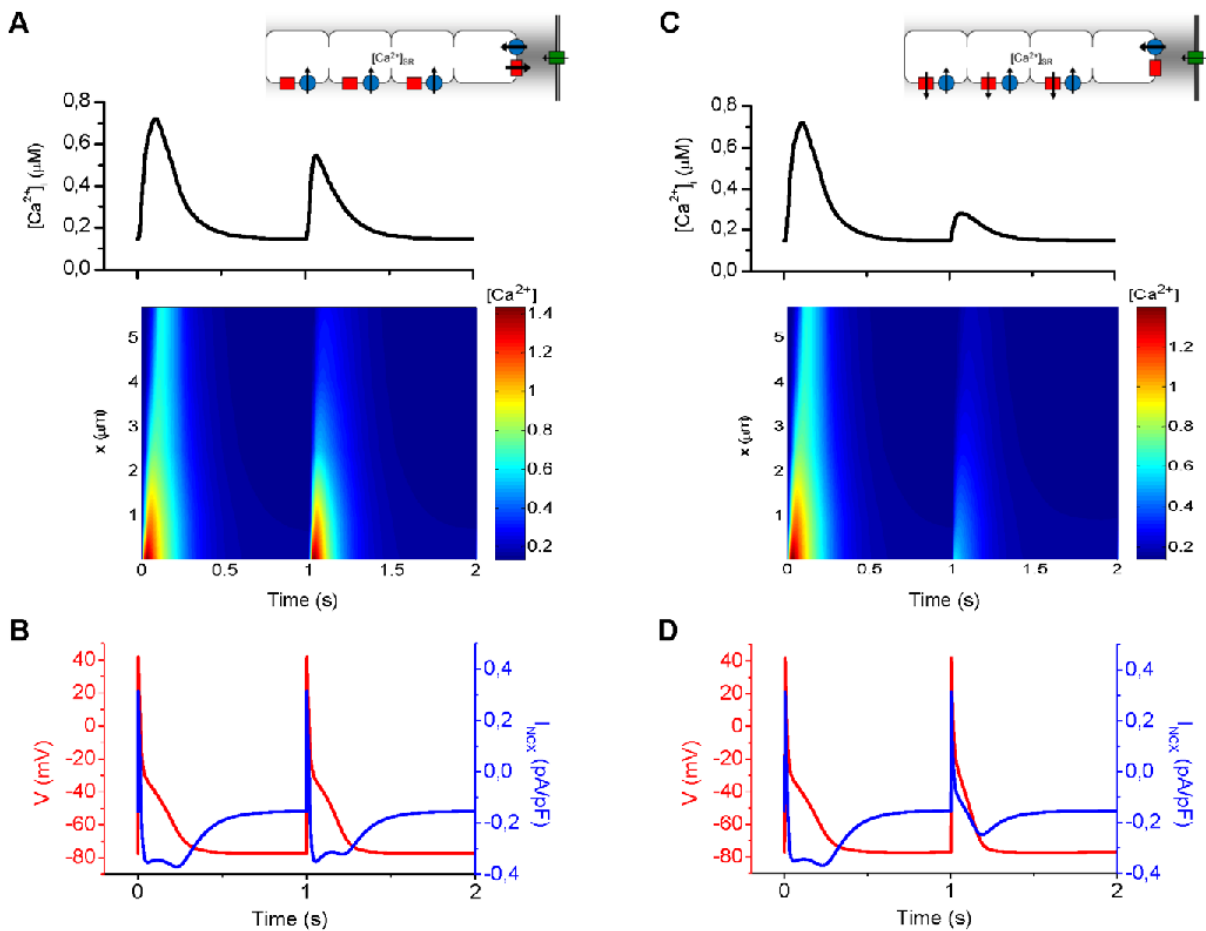


Figura 4.18. Ruolo dei siti di rilascio dei compartimenti *junctional* e *bulk* del SR nell'accoppiamento eccitazione-contrazione. (A) L'inibizione dei siti di rilascio nel bulk citosol (all'istante $t=1s$) riduce il transiente di Ca^{2+} del 31%, tale segnale, relativamente inomogeneo, non viene condotto al centro della cellula. (B) L'alterata dinamica del Ca^{2+} riduce l'APD₉₀ del 10%, poiché la minor presenza dello ione limita l'attività di I_{NCX} . (C) L'inibizione dei siti di rilascio del *junctional* SR riduce l'ampiezza del transiente di Ca^{2+} del 58%, risultando in una mancata propagazione del segnale di calcio. (D) L'APD₉₀ è ridotta del 34% e la corrente I_{NCX} depolarizzante non è attivata al normale livello.

L'impatto della dinamica di Ca^{2+} sulla morfologia del potenziale d'azione è stato studiato annullando e triplicando il rilascio di tale ione. Koivumäki et al. hanno così riscontrato che l'ampiezza del transiente di Ca^{2+} condiziona l'APD: triplicando il rilascio di Ca^{2+} la fase 1 diviene più rapida, mentre la ripolarizzazione terminale rallenta (l'annullamento ha effetti opposti). Questo aumenta il tempo di permanenza in stato di inattivazione dei canali di Na^+ ,

prolungando il periodo refrattario: uno stimolo prematuramente applicato non riesce ad indurre un nuovo PA.

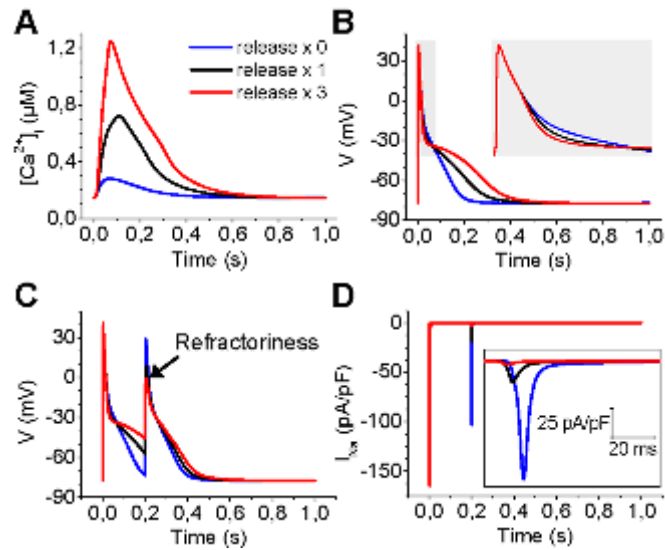


Figura 4.19. Effetto del rilascio di Ca^{2+} ad opera del SR sull'APD e refrattarietà. (A) Andamento del transiente medio di Ca^{2+} citosolico al variare del rilascio di Ca^{2+} . (B) L'incremento del rilascio di Ca^{2+} rallenta la ripolarizzazione transiente e velocizza la terminale, mentre la sua diminuzione ha effetti opposti. (C) La modulazione del rilascio di Ca^{2+} influenza la refrattarietà del cardiomiocita. L'impulso osservato all'istante $t=200\text{ms}$ è dovuto alla corrente di stimolo e non ad un nuovo PA (D) La refrattarietà è imputabile all'inattivazione di I_{Na} .

L'incremento della costante di tempo che governa il decadimento del transiente di Ca^{2+} prolunga il potenziale d'azione, con effetto irrisorio sulla fase di ripolarizzazione transiente: il meccanismo sottostante sembra essere l'alterata I_{NCX} , mentre $I_{\text{Ca,L}}$ non sembra esserne influenzata. Anche la modulazione dell'ampiezza del transiente di calcio condiziona l'APD, alterando tuttavia anche la fase 1 del potenziale d'azione: l'incremento di ampiezza aumenta l'attività dello scambiatore $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ ed accelera l'inattivazione di $I_{\text{Ca,L}}$, risultando in una più rapida ripolarizzazione transiente e lenta ripolarizzazione terminale.

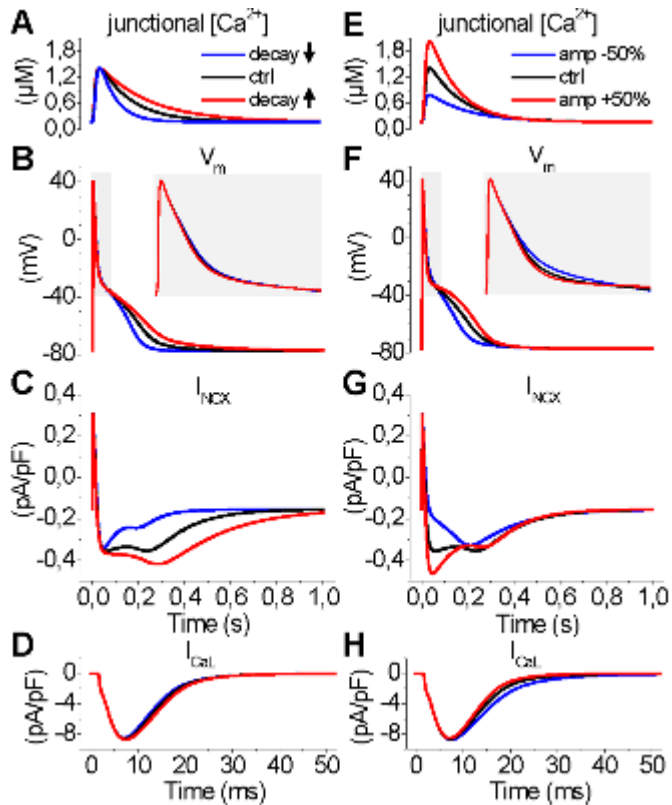


Figura 4.20. Effetto di ampiezza e velocità di decadimento del transiente di Ca^{2+} sull'APD. (A) Tre modalità di decadimento, imposte analiticamente, per il transiente di calcio nel *junctional* citosol. (B) Effetto delle modalità di decadimento sull'APD (nell'inserto i primi 75ms del PA). (C) Mediazione dell'effetto del decadimento ad opera di I_{NCX} : tale corrente cresce/decrece per più rapidi/lenti transienti di Ca^{2+} . (D) La velocità di decadimento non influenza $I_{\text{Ca,L}}$. (E) La modulazione dei RyR è simulata imponendo tre ampiezze del transiente nel *junctional* citosol. (F) Per ampiezze maggiori la ripolarizzazione transiente diviene più rapida, quella tardiva più lenta. (G,H) L'effetto modulatorio dell'ampiezza del transiente di Ca^{2+} è mediato da variazioni della I_{NCX} nella fase iniziale, ma altera anche l'inattivazione di $I_{\text{Ca,L}}$.

4.2.2. Adattamento in frequenza dell'APD. Il decremento dell'APD per frequenze di stimolazione crescenti, osservato sperimentalmente, è stato imputato a variazioni funzionali dei canali del calcio L-type ed al conseguente accumulo di tale ione [48,49]. Tenuto conto che, nei cardiomiociti ventricolari, anche l'accumulo di Na^+ citosolico ad elevate frequenze di stimolazione è stato indicato come un fattore determinante nell'alterazione dell'APD, gli autori hanno

implementato due varianti del modello al fine di identificare il contributo dei singoli meccanismi all'adattamento in frequenza. La prima, indicata con l'acronimo 'vCaNass', tiene conto di un compartimento di Na⁺ subsarcolemma. La seconda è denominata 'vCaNassIk' ed include la formulazione delle correnti di potassio previste nel modello di Maleckar et al. [40]. Nonostante la varianza dei valori assoluti di APD₉₀ in funzione del BCL riportata in letteratura sia ampia, l'andamento delle curve in simulazione riproduce quello sperimentale. Le variazioni relative di APD₉₀ nel range BCL=[1600,400]ms nel modello (-32%) e nelle due varianti vCaNass (-30%) e vCaNassIk (-27%) sono comparabili ai valori in vitro riportati da Boutjdir et al. (-44%) e Dawodu et al. (-38%) [50,51].

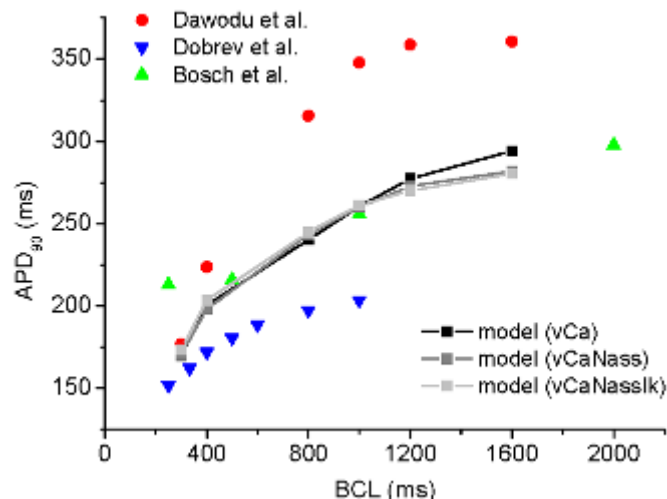


Figura 4.21. Comparazione della dipendenza dell'APD₉₀ dal BCL riportata da Dawodu et al., Dobrev et al. [52], Bosch et al. [53] e riprodotta dal modello.

I protocolli di misura disponibili per lo studio della dipendenza della morfologia del PA dalla frequenza di stimolazione differiscono per l'intervallo temporale a seguito del quale si valuta il potenziale d'azione. Poiché il periodo di stimolazione condiziona l'accumulo di [Na⁺]_i, Koivumäki et al., adottando la variante del modello vCaNassIk per tenere in considerazione tutti i meccanismi di dipendenza dalla frequenza, hanno applicato un protocollo di stimolazione della

durata di 5min a partire dallo stato di riposo per ogni BCL. Il confronto di APD_{90} dopo 30s e 5min evidenzia la minor durata del potenziale d'azione in risposta a frequenze crescenti al protrarsi della stimolazione. Qualora la $[Na^+]_i$ sia fissata al valore di riposo (7.8mM), l'effetto di stimolazione continua ad alta frequenza si riduce, delineando come l'accumulo di sodio sia condizione necessaria per l'adattamento in frequenza dell'APD. In figura 4.22 si nota inoltre come la maggior durata del protocollo di stimolazione implichi una maggior pendenza della curva di restituzione, per BCL appartenenti all'intervallo [1600,400]ms, rispetto alla riduzione di APD_{90} osservabile in figura 4.21.

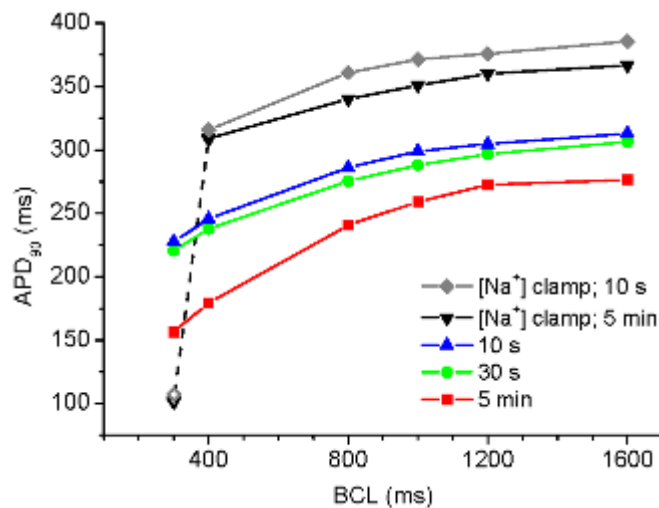


Figura 4.22. Adattamento dell'APD nella condizione di controllo e per $[Na^+]_i$ fissate al valore corrispondente allo stato quiescente della cellula.

Per analizzare l'impatto dell'accumulo di Na^+ sulla dinamica di Ca^{2+} , mediante modulazione dello scambiatore Na^+-Ca^{2+} , gli autori hanno valutato il ruolo di I_{NCX} come segnale di trigger del ciclo CICR. Hanno così riscontrato che al ridursi dell'afflusso di Ca^{2+} attraverso i canali L-Type, per frequenze di stimolazione crescenti, il flusso di I_{NCX} in modalità inversa aumenta considerevolmente. Il blocco di I_{NCX} in modalità inversa ritarda il raggiungimento del picco di $[Ca^{2+}]_i$ proporzionalmente alla frequenza di stimolazione: la modulazione frequenza-dipendente dello scambiatore potrebbe

quindi mediare la riduzione del ritardo tra eccitazione elettrica e picco del transiente di calcio.

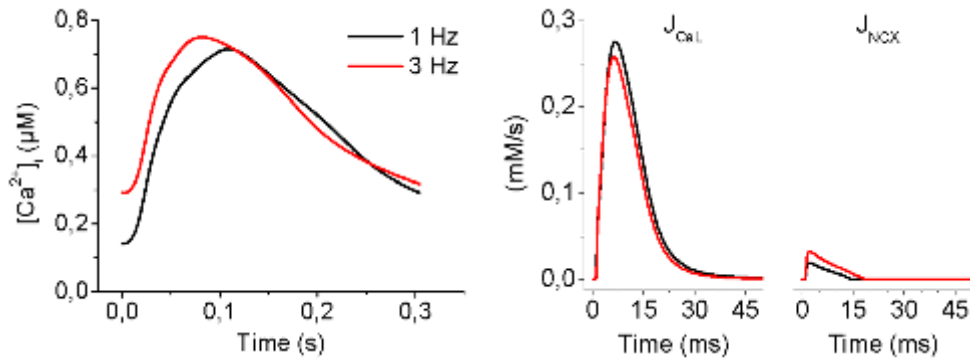


Figura 4.23. Variazione della dinamica del transiente di Ca^{2+} al variare della frequenza (a sinistra). Decremento dell'afflusso di Ca^{2+} ad opera dei canali L-type e suo incremento per azione dello scambiatore Na^+-Ca^{2+} , che opera in modalità inversa, al crescere della frequenza di stimolazione.

4.3 Grandi et al.

Il modello di Grandi et al. [54], pubblicato sempre nel 2011, origina dall'implementazione delle differenze ioniche e strutturali individuate sperimentalmente tra cardiomiociti atriali e ventricolari sul modello di cellula ventricolare umana sviluppato dallo stesso gruppo di ricerca [55]. A seguito della validazione, attuata tramite riproduzione di comportamenti fisiologici osservati empiricamente, il modello è stato impiegato nella comprensione dei meccanismi di adattamento in frequenza dell'APD e del transiente di Ca^{2+} , nei casi di ritmo sinusale e fibrillazione atriale cronica. Poiché il presente elaborato è limitato alla comparazione dei modelli matematici che riproducono il PA atriale umano in condizioni fisiologiche, nel proseguo si farà riferimento alle sole introspezioni inerenti il ritmo sinusale: il modello Grandi et al. risulta uno strumento utile per comprendere come le alterazioni a livello dei canali ionici e della gestione del Ca^{2+} intracellulare influenzino la funzione dei cardiomiociti. Inoltre, il modello atriale Grandi et al. è derivato dal corrispondente modello ventricolare, con il quale condivide

molte formulazioni, e questo è potenzialmente vantaggioso per l'integrazione delle rappresentazioni nel 'virtual heart'.

4.3.1 Modifiche apportate al modello ventricolare per riprodurre il PA atriale. Le variazioni introdotte sulle formulazioni dei flussi ionici del modello ventricolare portano a una morfologia triangolare del PA, che non presenta più una fase di plateau. In particolare ad essa contribuisce l'elevata densità delle correnti di K^+ attive durante la ripolarizzazione transiente. Tra queste I_{Kur} , specifica delle cellule atriali e formulata in analogia al modello di Maleckar et al. [40], e I_{to} , caratterizzata da una più rapida inattivazione e lento recupero dall'inattivazione. L'andamento temporale di I_{to} durante un PA nel miocita atriale riproduce, a meno di una maggiore ampiezza, quello della componente $I_{to,fast}$ del ventricolare. L'incremento di densità delle due correnti origina una riduzione del 'potenziale di plateau'.

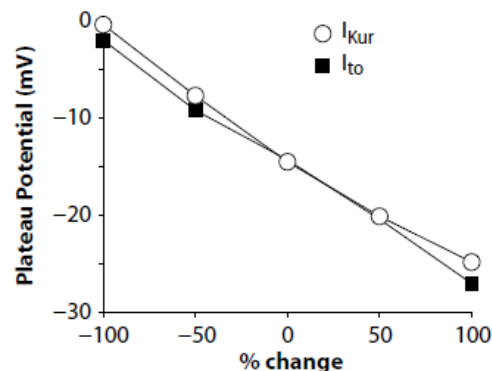


Figura 4.24. Potenziale di plateau, misurato come media dei valori di V_m a 20 ed 80ms dall'upstroke, al variare della densità delle correnti I_{Kur} e I_{to} .

I_{Na} , non oggetto di modifiche nella formulazione, è significativamente ridotta nelle cellule atriali durante il PA dato il lento recupero dall'inattivazione dei canali a potenziali di riposo più depolarizzati. I_{Kr} ed I_{Ks} risultano ridotte dalla morfologia *spiky*, pur essendo inalterate nella formulazione. I_{NCX} , ridotta del 30% nel caso atriale, manifesta una maggior ampiezza a causa della breve fase 1 e del più significativo transiente di Ca^{2+} . $I_{Ca,L}$ è stata adattata per

riprodurre ampiezza e cinetiche osservate su cellule atriali a 37°C. I_{K1} , coerentemente con le osservazioni sperimentali [56], è ridotta dell'85% agendo sul valore di conduttanza massima.

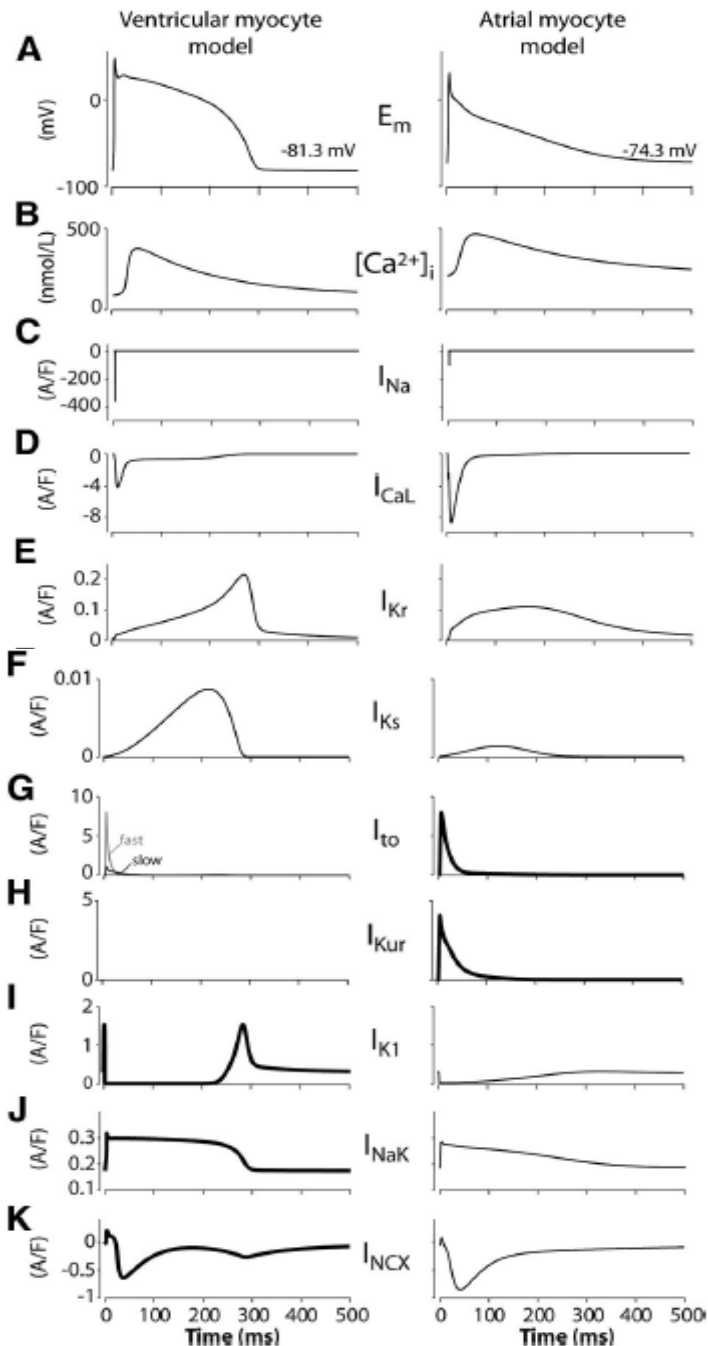


Figura 4.25. Potenziale d'azione simulato dai modelli, ventricolare ed atriale, di Grandi et al. e correnti ioniche sottostanti, in corrispondenza ad una frequenza di stimolazione di 1Hz. In grassetto sono riportate le correnti la cui densità è stata incrementata agendo sul valore di conduttanza massima o sul rateo di pompa.

La gestione del calcio intracellulare prevista dal modello di Grandi et al. adotta l'organizzazione proposta da Shannon et al. [57] per cardiomiociti ventricolari di coniglio. Tali autori furono i primi ad introdurre un citosol *junctional*, in cui ha luogo l'accoppiamento tra i RyR ed i canali di Ca^{2+} L-type, ed un compartimento di calcio subsarcolemma, ove le correnti Ca^{2+} -dipendenti (I_{NCX} e $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) rilevano gli scostamenti delle concentrazioni di tale ione rispetto al *bulk* citosol. Il framework è stato modellato mediante caratterizzazione sperimentale della dinamica della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in miociti atriali.

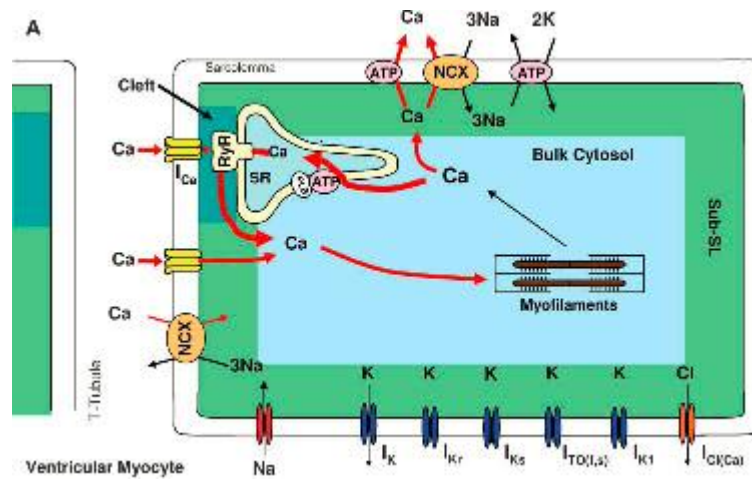


Figura 4.26. Compartimentalizzazione del citoplasma prevista dal modello di Shannon et al. [57].

Il confronto tra l'andamento della $I_{\text{Ca,L}}$ e del transiente di Ca^{2+} acquisite sperimentalmente e riprodotte in simulazione è riportato in figura 4.27.

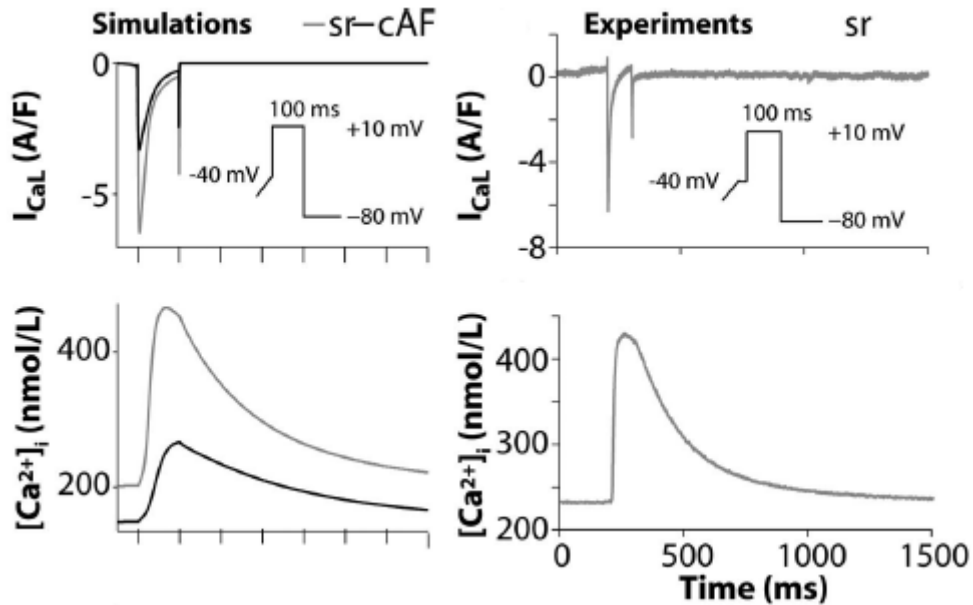


Figura 4.27. Corrente $I_{Ca,L}$ e transiente di Ca^{2+} simulati ed acquisiti con il protocollo di voltage-clamp mostrato nell'inserito in corrispondenza ad una frequenza di stimolazione di 0.5Hz.

Mentre l'upstroke del transiente di Ca^{2+} riprodotto da Koivumäki et al. mostrava un andamento bifasico, coerente con il ritardo del rilascio di tale ione ad opera del SR periferico e centrale (data l'ipotesi di assenza di un sistema di tubuli trasversali nelle cellule atriali), il modello Grandi et al. non presenta la lenta propagazione del segnale di Ca^{2+} , poiché non riscontrabile nelle acquisizioni a $37^{\circ}C$ e anche per la dimostrata esistenza di una rete di tubuli t nei cardiomiociti atriali di mammiferi [58].

4.3.2 Adattamento in frequenza dell'APD. La ridotta APD per BCL decrescenti ed il minor adattamento in frequenza in presenza di bloccanti farmacologici della corrente $I_{Ca,L}$ (simulati mediante riduzione del corrispondente valore di conduttanza massima) sono ben riprodotti nel modello.

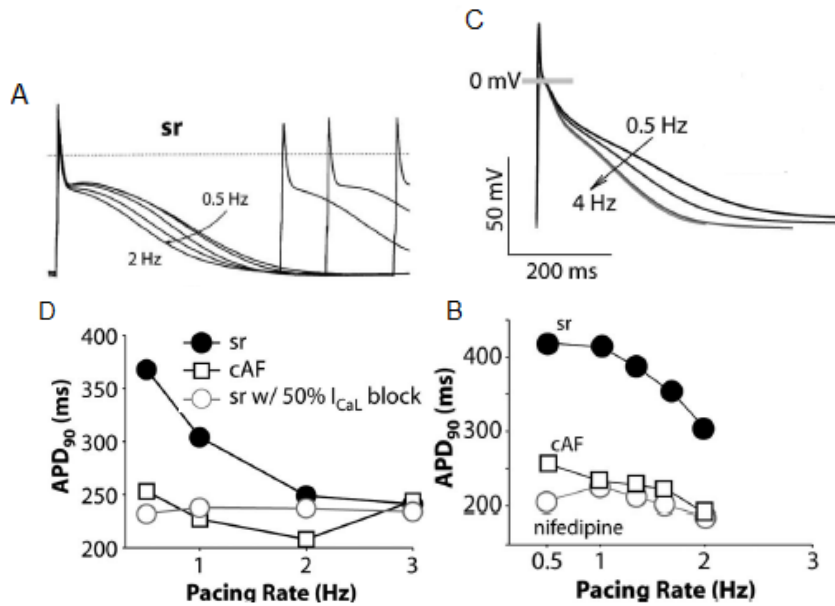


Figura 4.28. Morfologia del potenziale d'azione ed adattamento in frequenza ottenuti sperimentalmente da Van Wagoner et al. (Circ Res 1999) (A,B) e riprodotto dal modello di Grandi et al. (C,D).

La dipendenza positiva dell'ampiezza del transiente di calcio dalla frequenza di stimolazione tende a ridursi a seguito del blocco parziale della corrente $I_{Ca,L}$.

Il modello identifica nella $[Na^+]_i$ un fattore determinante nell'adattamento in frequenza, rivelando come la variabilità delle curve di restituzione acquisite sperimentalmente sia imputabile alla valutazione dell'APD prima che tale ione abbia raggiunto una concentrazione di regime.

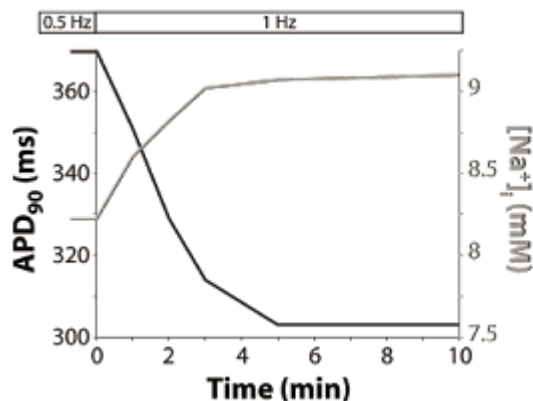


Figura 4.29. Andamento temporale dell'APD₉₀ e della $[Na^+]_i$ a seguito della transizione della frequenza di stimolazione da 0.5 ad 1Hz. L'APD si stabilizza ad un valore di regime in circa 5min.

Qualora la $[Na^+]_i$ venga mantenuta costante durante la simulazione, l'adattamento in frequenza tende ad annullarsi. Simulazioni del blocco parziale della pompa Na^+-K^+ evidenziano un adattamento in frequenza dell'APD di tipo bifasico: inizialmente si osserva un prolungamento del potenziale d'azione, soggetto a riduzione a seguito dell'accumulo del sodio intracellulare, quindi dell'attività della pompa elettrogenica. Tale comportamento, confermato sperimentalmente su cardiomiociti atriali da Grandi et al., è stato precedentemente descritto in cellule ventricolari di guinea pig e fibre atriali umane [59,60] e sottolinea il coinvolgimento dello ione Na^+ nell'adattamento in frequenza.

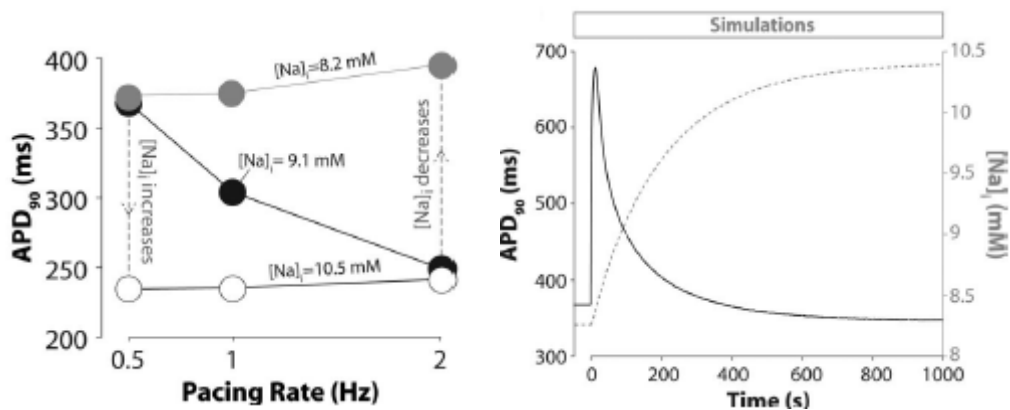


Figura 4.30. A sinistra: decremento dell'APD₉₀ all'aumentare della frequenza di stimolazione (cerchi neri). Se la $[Na^+]_i$ viene fissata a 10.5mM, valore previsto ad elevate frequenze, ed il cardiomiocita è stimolato a 0.5Hz, l'APD si riduce al valore che gli compete a 2Hz nel caso di concentrazione libera di sodio (cerchi bianchi). Analogamente, in caso di stimolazione a 2Hz e $[Na^+]_i=8.2mM$ l'APD raggiunge il valore che gli compete a 0.5Hz (cerchi grigi). A destra: andamento temporale dell'APD₉₀ a seguito del blocco parziale (50%), all'istante $t=0$, di I_{NaK} .

Gli autori hanno inoltre valutato l'impatto del blocco parziale di I_{Kur} sull'APD e sul transiente di calcio (CaT), dato l'interesse clinico nel miglioramento della contrattilità atriale inducibile mediante bloccanti farmacologici del canale $kv1.5$ che, non essendo presente nel tessuto ventricolare, non incrementerebbero il rischio di aritmie ventricolari. Il comportamento in simulazione è stato confrontato con evidenze

sperimentali che delineano un prolungamento del PA ed incremento del potenziale di plateau. Il blocco moderato (25-50%) di I_{Kur} incrementa l'ampiezza del gradiente di Ca^{2+} , mentre ha effetto ridotto sull'APD, mentre variazioni marcate di APD e CaT si riscontrano in corrispondenza ad un blocco di I_{Kur} nell'intervallo 75-100%.

Per tenere in considerazione variazioni morfologiche del PA entro e tra gli atri imputabili a differenti livelli di espressione dei canali ionici, Grandi et al. hanno valutato l'impatto derivante da modifiche delle densità di correnti di K^+ e Ca^{2+} . Nel contesto dei limitati dati disponibili circa l'eterogeneità inter-atriale delle correnti ripolarizzanti, Caballero et al. [61] hanno infatti identificato la presenza di un gradiente di I_{Kur} pari al 20% tra atrio destro e sinistro. La riduzione di I_{Kur} (50%) e l'incremento di $I_{Ca,L}$ e I_{Kr} (50% e 400% rispettivamente) hanno portato ad un PA di tipo 1, simile a quello ottenuto da Nygren et al. [34], denotato da un incremento di I_K e del rapporto I_K/I_{to} , oltre ad un più depolarizzato potenziale di plateau ed una rapida fase 3. Gli autori hanno inoltre notato che il blocco di I_{Kur} causa il prolungamento del PA di tipo 3, mentre non altera l'APD del tipo 1.

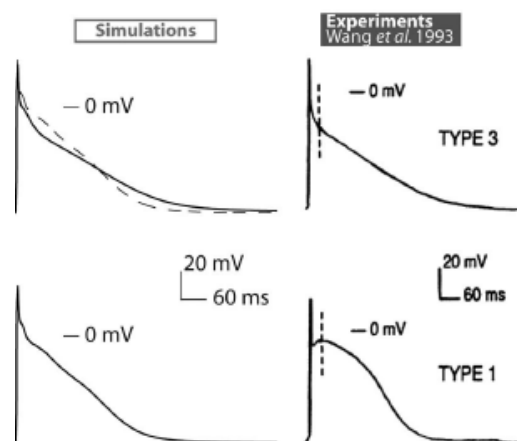


Figura 5.3.2.4 Il PA di tipo 1 (curva continua nel pannello inferiore e tratteggiata nel superiore), ottenuto, a partire da quello di tipo 3, tramite modifica delle correnti di potassio e calcio in simulazione (a sinistra) e nelle prove sperimentali (a destra).

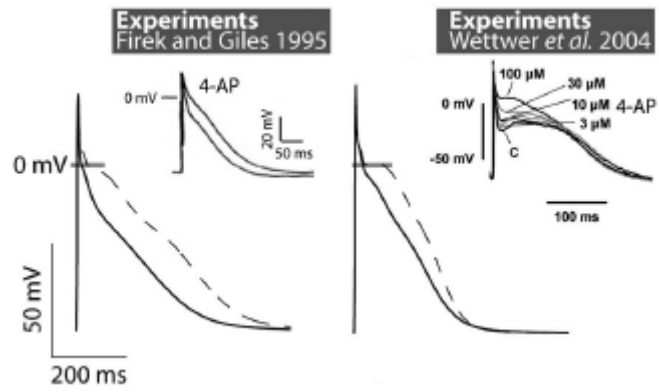


Figura 5.3.2.5 Il blocco di I_{Kur} prolunga il potenziale d'azione di tipo 3 (a sinistra) ma ha effetto irrisorio su quello di tipo 1 (a destra).

CONFRONTI E CONCLUSIONI

Nel presente elaborato sono stati analizzati i principali modelli matematici di potenziale d'azione atriale umano, esposti secondo l'evoluzione storica.

I modelli di Courtemanche et al. e Nygren et al., pubblicati nel 1998, si basano sostanzialmente sugli stessi dati sperimentali. Data la limitatezza di acquisizioni su cardiomiociti atriali umani al momento del loro sviluppo, le formulazioni di alcune correnti sono derivate da modelli precedenti, relativi a cellule atriali o ventricolari di altri mammiferi o fondate su acquisizioni sperimentali su diverse specie. Nonostante i due modelli si siano sviluppati da una base comune, la morfologia del potenziale d'azione da essi riprodotto manifesta significative differenze. Il modello di Courtemanche et al. presenta una morfologia *spike and dome*, frequentemente osservata nelle acquisizioni su tessuto atriale, mentre quello di Nygren et al. riproduce un potenziale d'azione più triangolare, caratteristico delle registrazioni di tale forma d'onda su singola cellula [62]. Un'altra differenza si riscontra nelle curve di restituzione, che rappresentano le variazioni di durata del potenziale d'azione in base al periodo di stimolazione: in corrispondenza di un $BCL=1000ms$, ad esempio, la durata del potenziale d'azione del modello di Courtemanche et al. eccede quella di Nygren et al. di circa 70ms ed all'aumentare della frequenza di stimolazione è soggetta ad una significativa e monotona riduzione. L' APD_{90} prevista da Nygren et al., soggetta a minori

variazioni nel range [1000-300]ms, decresce invece fino a BCL di circa 470ms, per poi aumentare nuovamente.

A partire dal modello di Nygren et al., con miglorie relative soprattutto all'adattamento in frequenza e alle correnti ripolarizzanti, si è sviluppato successivamente il modello di Maleckar et al. (2008). Morfologia e durata del PA di questo modello sono comparabili a quelli del modello padre, anche se l'APD₉₀ risulta significativamente inferiore e soggetta a minor variabilità per BCL decrescenti.

Se i modelli fino ad ora citati prevedono una struttura del reticolo sarcoplasmatico di tipo 'common pool', una descrizione dettagliata della gestione del calcio intracellulare, che tiene in considerazione effetti spaziotemporali sull'uptake e rilascio di Ca²⁺ è stata introdotta nel modello di Koivumäki et al. (2011), basato a sua volta sul modello di Maleckar et al. Gli scostamenti morfologici del PA da questo riprodotto rispetto a quello di Nygren et al. sono pertanto rilevanti soprattutto nella fase di plateau. In figura 1 si nota come tale modello sia caratterizzato da un minor potenziale di notch. La curva di restituzione dell'APD è qualitativamente analoga a quella di Courtemanche et al., sebbene l'APD₉₀ permanga a valori inferiori.

Infine è stato considerato il modello di Grandi et al. (2011), che ha un'evoluzione diversa dai modelli precedentemente citati, in quanto è derivato dal modello di cardiomiocita ventricolare pubblicato dal medesimo gruppo di ricerca nel 2010. Per questo motivo, tale modello risulta un valido strumento per identificare le principali differenze tra cardiomiociti atriali e ventricolari, in termini di correnti ioniche e conseguente PA. Il modello Grandi et al. è morfologicamente simile ai modelli derivati da Nygren et al. e presenta valori di APD comparabili a quelli di Courtemanche et al. In figura 1 si nota tuttavia un marcato incremento dell'APD in corrispondenza a BCL nel range [600-450]ms, che poi conduce al medesimo valore previsto da Courtemanche et al

all'estremo inferiore dell'asse BCL. La pendenza della curva di restituzione di Grandi et al. per $BCL < 500\text{ms}$ è rappresentazione fedele di quanto osservato sperimentalmente [63,64].

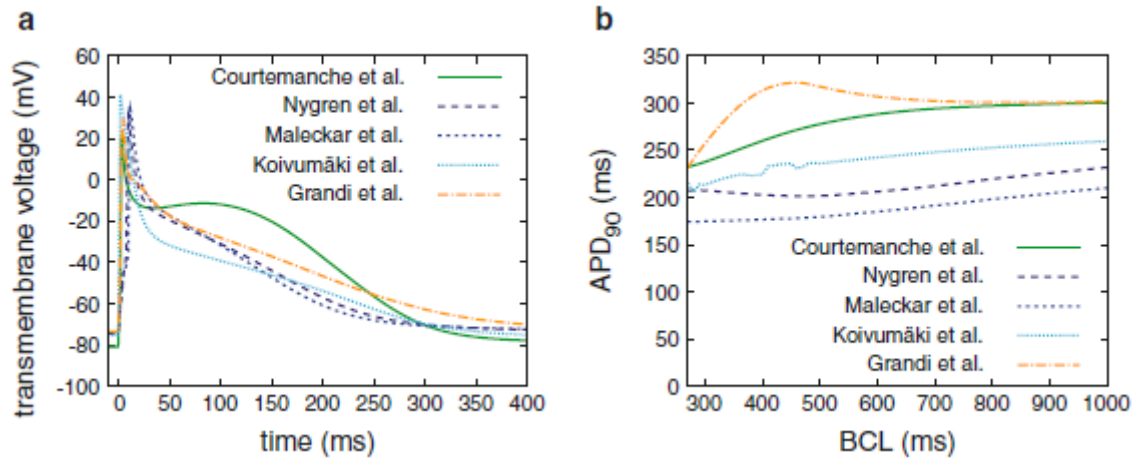


Figura 1. Andamento temporale del potenziale d'azione (a) e curve di APD restitution nei modelli di potenziale d'azione atriale umano considerati.

Il confronto tra la morfologia del PA riprodotto in simulazione e tracce sperimentali riportate in letteratura da Colman (2012) evidenzia compatibilità nel range di osservazione. Il PA del modello di Courtemanche et al. sembra più compatibile con l'andamento sperimentale più frequentemente osservato.

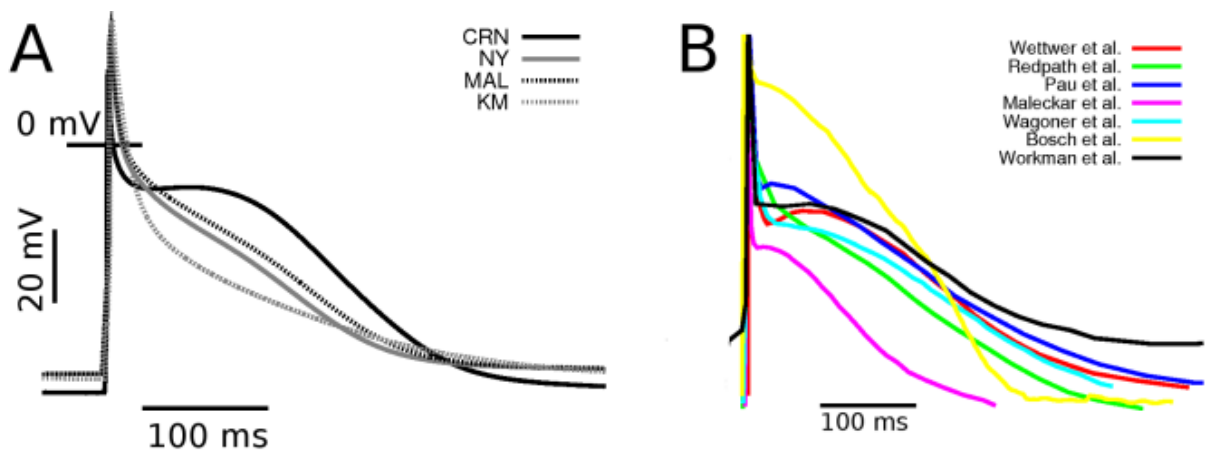


Figura 2. Confronto delle morfologie del PA riprodotte dai modelli con le acquisizioni sperimentali da campioni dell'appendice auricolare destra o, in generale, dell'atrio destro (Wettwer et al [63], Redpath et al. [64], Pau et al. [65], Maleckar et al. [66], Wagoner et al. [67], Bosch et al. [68] e Workman et al. [69]).

Con riferimento alle differenze regionali di estrazione dei campioni su cui sono condotte le acquisizioni sperimentali, in figura 3 si nota come il PA del modello CNR sia analogo a quello del muscolo pettinato (PM), mentre il modello di Nygren et al. e quelli da esso derivati riproducono una forma d'onda comparabile a quella dell'anello atrio-ventricolare (AVR). Incorporando le differenze elettrofisiologiche [69] tra distinte regioni nei modelli si nota come il CRN sia compatibile con le tracce inerenti cresta terminalis (CT) e AVR. Il PA riprodotto da Nygren et al. e Maleckar et al. è più fedele all'andamento sperimentale, ma la differenza di durata del potenziale d'azione tra PM e AVR è ridotta rispetto all'implementazione in Courtemanche-Ramirez-Nattel. L'incremento della corrente $I_{Ca,L}$, principale responsabile delle variazioni morfologiche, non introduce significative modifiche nel PA di Koivumaki et al, che quindi non è idoneo a rappresentare CT e PM. Si noti tuttavia che le tracce sperimentali si riferiscono allo studio di Feng et al. [70] inerente cardiomiociti di cane e che la sola morfologia del potenziale d'azione non rappresenta univocamente l'elettrofisiologia di una regione cardiaca, quindi scostamenti di questa non possono essere determinanti nella scelta tra i modelli.

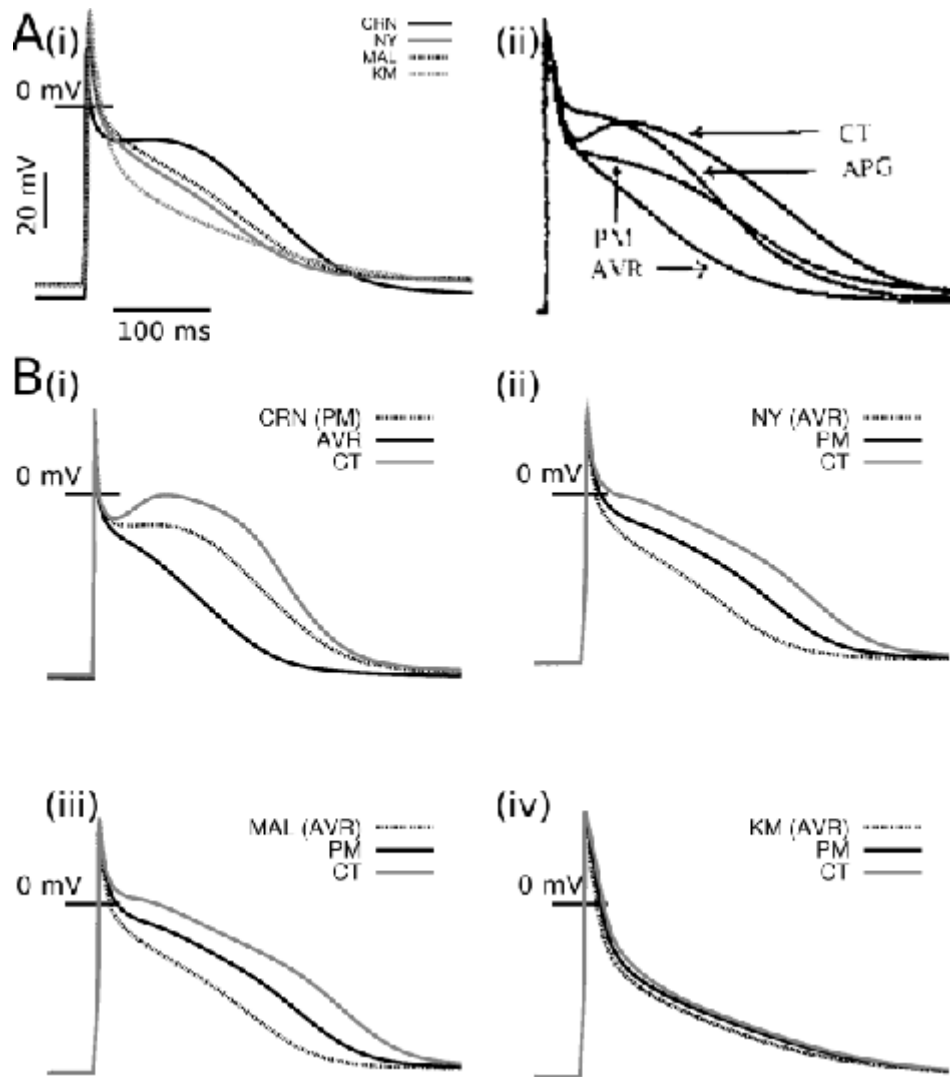


Figura 3. Adattamento dei modelli alle differenze regionali individuabili negli atri. (A) Confronto dei PA dei modelli con le tracce sperimentali di Feng et al (1998). (B) Modelli regionali di singola cellula: (i) CRN, (ii) Nygren et al., (iii) Maleckar et al., (iv) Koivumaki et al..

Per quanto concerne il transiente di calcio, il modello di Courtemanche et al. mostra una concentrazione diastolica di Ca^{2+} inferiore ed una sistolica superiore a quelle riprodotte da Koivumäki et al., nonché comune a quelli di Nygren et al. e Maleckar et al. da cui deriva. Nel primo caso l'upstroke è più rapido ed il picco raggiunto appuntito. Nel modello di Koivumäki et al., come osservato in precedenza, il delay temporale tra il rilascio di Ca^{2+} periferico e centrale origina una crescita bifasica e lenta della $[\text{Ca}^{2+}]_i$, che si conclude in

un picco arrotondato. Il modello di Grandi et al. prevede invece un upstroke monofasico.

È opportuno sottolineare che tutti i modelli considerati sono soggetti a deriva delle concentrazioni ioniche e dell'APD su simulazioni di lunga durata, intendendo con essa l'allontanamento del valore di tali parametri rispetto allo stato quiescente. Come accennato nelle singole presentazioni tuttavia, i modelli di Nygren et al. e Maleckar et al. sono più inclini ad instabilità: variazioni significative di potenziale di riposo, ampiezza del PA e del transiente di Ca^{2+} e APD_{90} sono riscontrabili su simulazioni di breve durata. Il tentativo di stabilizzazione del potenziale di riposo giustificava l'inclusione del flusso di sodio elettroneutrale nel modello di Maleckar et al.. Il modello di Courtemanche et al., meno dettagliato fisiologicamente, risulta più stabile e manifesta derive solo su simulazioni di lunga durata.

Per quanto concerne l'efficienza computazionale occorre notare che tutti i modelli adottano l'approccio di Hodgkin-Huxley ai fini della rappresentazione delle cinetiche di canale. Tale scelta riduce la complessità di trattazione ed implementazione dei fenomeni descritti, ma pone limiti inerenti la fine rappresentazione di dinamiche complesse, tra cui quella del transiente di Ca^{2+} , per la quale il paradigma markoviano sarebbe più consono. La risoluzione delle equazioni differenziali in cui i modelli si strutturano, secondo quanto riportato negli articoli, fa di norma ricorso a solutori per problemi *stiff*. A tal proposito si ricorda che un sistema di equazioni differenziali ordinarie è detto *stiff* se, approssimato con un metodo numerico caratterizzato da una regione di assoluta stabilità di estensione finita, obbliga quest'ultimo, per ogni condizione iniziale per cui il problema ammette soluzione, a fare ricorso ad un passo di discretizzazione eccessivamente piccolo rispetto a quello necessario a dare descrizione ragionevole dell'andamento temporale della soluzione esatta. Il solutore adottato nel

modello di Koivumäki et al. e Grandi et al. è 'ode15s', metodo implicito multistep di ordine variabile presente in Matlab, Matworks. Il costo computazionale additivo dato dall'adozione di un metodo implicito, unitamente alla più stretta rispondenza alla realtà elettrofisiologica degli ultimi due modelli pubblicati, potrebbe inficiare l'inclusione in simulazioni su larga scala o in modelli atriali 3D. Occorre tuttavia considerare che la struttura del modello di Grandi et al., analoga a quella del modello ventricolare da cui è derivato, potrebbe semplificarne l'integrazione nel 'virtual heart'.

I modelli analizzati, le cui proprietà sono riportate sinteticamente in tabella 1, esibiscono quindi differenti morfologie e proprietà di restituzione del potenziale d'azione e si comportano diversamente a seguito della modulazione delle correnti ioniche. E' probabile che le distinte morfologie siano imputabili a dati rilevati da cellule estratte da differenti regioni atriali, nonostante si riscontrino differenze anche su cellule isolate dallo stesso campione.

Infine è degno di nota che i modelli analizzati sono stati presentati nel contesto delle applicazioni di ricerca, che coadiuvano un ampliamento della comprensione dei fenomeni di elettrofisiologia, su cui ci si è soffermati, e patologia atriale. Un altro campo di applicazione potenziale consiste nell'utilizzo dei modelli atriali per l'identificazione di terapie in ricerca clinica. In futuro un obiettivo potrebbe essere l'impiego dei modelli computazionali nella pratica clinica, come parte della procedura di pianificazione terapeutica.

Proprietà dei modelli elettrofisiologici atriali umani					
Autori	Correnti transmembrana	Compartimenti di Ca^{2+}	Analisi condotte	Potenziale di riposo	Morfologia del PA
Courtemanche et al.	a	Intracellulare, extracellulare	Adattamento in frequenza del PA, blocco di $I_{Ca,L}$ e I_{NaCa}	-80mV	Spike and dome
Nygren et al.	a	Intracellulare, cleft diadico, spazio di cleft, extracellulare	Differenze tra elettrofisiologia atriale di coniglio ed umana per le correnti ripolarizzanti	-72mV	Triangolare
Maleckar et al.	a + I_{KAch}	Intracellulare, cleft diadico, spazio di cleft, extracellulare	Adattamento in frequenza della fase di ripolarizzazione	-72mV	Triangolare
Koivumäki et al.	a + correnti di K^+ inward attivate dall'iperpolarizzazione + I_f	Quattro spazi intracellulari, subsarcolemma, extracellulare	Descrizione dettagliata della dinamica del Ca^{2+} e suo impatto sulla morfologia del PA.	-75mV	Triangolare
Grandi et al.	a + I_{KAch} + correnti di Cl^- (I_{bCl} e $I_{Cl(Ca)}$)	Intracellulare, cleft diadico, subsarcolemma, extracellulare	Differenze tra l'elettrofisiologia atriale e ventricolare con focus sul calcium handling	-74mV	Triangolare

Tabella 1. Proprietà dei modelli analizzati nella presente Tesi. Si è indicato con 'a' l'insieme delle correnti comuni: I_{Na} , $I_{Ca,L}$, I_{to} , I_{Kur} , I_{Ks} , I_{Kr} , I_{K1} , $I_{b,Na}$, $I_{b,Ca}$, I_{NaCa} , I_{NaK} , $I_{p,Ca}$.

BIBLIOGRAFIA

1. Modulation of late sodium current by Ca²⁺, calmodulin, and CaMKII in normal and failing dog cardiomyocytes: similarities and differences Victor A. Maltsev, Vitaliy Reznikov, Nidas A. Undrovinas, Hani N. Sabbah, and Albertas Undrovinas Department of Internal Medicine, Henry Ford Hospital, Detroit, Michigan
2. Maltsev VA, Sabbah HN, Higgins RSD, et al. Novel, ultraslow inactivating sodium current in human ventricular myocytes. *Circulation* 1998;98:2545-52. L
3. The inward rectifier current (IK1) controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis Amit S. Dhamoon, BA, José Jalife, MD From the Department of Pharmacology and Institute for Cardiovascular Research, SUNY Upstate Medical University,
4. Cardiac Ultrarapid Delayed Rectifiers A Novel Potassium Current Family of Functional Similarity and Molecular Diversity Stanley Nattel, Lixia Yue, Zhiguo Wang Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada
5. Clarithromycin reduces Isus and Ito currents in human atrial myocytes with minor repercussions on action potential duration Pascale Gluaisa*, Miche`le Bastidea,b, Daniel Grandmougingc, Georges Fayadc, Monique Adamantidisa
6. *Nature* 415, 198-205 (10 January 2002) | doi:10.1038/415198° review article Cardiac excitation-contraction coupling Donald M. Bers.
7. Syracuse, New York. Courtemanche M, Ramirez RJ, Nattel S. Ionic mechanisms underlying human atrial action potential properties: insights from a mathematical model. *Am. J. Physiol.* 1998 Jul;275(1 Pt 2):H301-321.
8. Pogwizd, S. M., Schlotthauer, K., Li, L., Yuan, W. & Bers, D.M. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current and residual -adrenergic responsiveness. *Circ. Res.* 88, 1159-1167 (2001). | PubMed | ISI |L

9. Nature 415, 198-205 (10 January 2002) | doi:10.1038/415198° review article Cardiac excitation-contraction coupling Donald M. Bers.
10. Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A (2011) Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol Rev* 91:265-325
11. The heartbeat considered as a relaxation oscillation and an electrical model of the heart, B. van der Pol and J. van der Mark, 1928, The London, Edinburgh and Dublin Physiological Magazine and Journal of Science, 6, 763-775.
12. Hodgkin AL, Huxley AF (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117:500-544L
13. Noble D., Rudy Y. (2001). Models of cardiac ventricular action potentials: iterative interaction between experiment and simulation. *Philos Trans R Soc A* 359:1127-1142
14. Noble D. (2007). From the Hodgkin-Huxley axon the virtual heart. *J Physiol*. 580:15-22.
15. Axon Instruments
16. Le Grand, R., Mondloch, C. J., Maurer, D. & Brent, H. P. 2001 Neuroperception. Early visual experience and face processing. *Nature* 410, 890.
17. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 1995; 92:1954-1968.
18. Van Wagoner DR, Nerbonne JM. Molecular basis of electrical remodeling in atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32:1101-1117.
19. Van Wagoner D., Pond A., Mc Carthy P. et al. (1997). Outward K⁺ current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic atrial fibrillation and atrial flutter.
20. Courtemanche, M. Ramirez, R.J., Nattel, S., 1998. Ionic mechanism underlying human atrial action potential properties: insights from a mathematical model. *American Journal of Physiology* 275, H301-H321.
21. Luo, C., and Y. Rudy. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. *Circ. Res.* 74: 1071-1096, 1994.
22. Koumi, S., C. E. Arentzen, C. L. Backer, and J. A. Wasserstrom. Alterations in muscarinic K₁ channel response to Ach and to G protein-mediated activation in atrial myocytes isolate from failing human hearts. *Circulation* 90: 2213-2224, 1994.
23. Koumi, S., C. L. Backer, and C. E. Arentzen. Characterization of inwardly rectifying K₁ channel in human cardiac myocytes. *Circulation* 92: 164-174, 1995.

24. Varro, A., P. P. Nanasi, and D. A. Lathrop. Potassium currents in isolated human atrial and ventricular cardiocytes. *Acta Physiol. Scand.* 149: 133-142, 1993.
25. Wang, Z., B. Fermini, and S. Nattel. Sustained depolarization induced outward current in human atrial myocytes: evidence for a novel delayed rectifier potassium current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ. Res.* 73: 1061-1076, 1993.
26. Zeng, J., K. R. Laurita, D. S. Rosenbaum, and Y. Rudy. Two components of the delayed rectifier K1 current in ventricular myocytes of the guinea pig type. *Circ. Res.* 77: 140-152, 1995.
27. Wang, Z., B. Fermini, and S. Nattel. Delayed rectifier outward current and repolarization in human atrial myocytes. *Circ. Res.* 73: 276-285, 1993.
28. Li, G. R., and S. Nattel. Properties of human atrial I_{Ca} at physiological temperatures and relevance to action potential. *Am. J. Physiol.* 272 (Heart Circ. Physiol. 41): H227-H235, 1997.
29. Friedman, N.E. Etude d'un nouveau mode`le du myocyte cardiaque incorporant une re`gulation du calcium intracellulaire (Master's thesis). Montreal: E`cole Polytechnique de Montre´al, Universite´ de Montre´al, 1996.
30. Hatem, S. N., A. Be´nardeau, C. Rucker-Martin, I. Marty, P. de Chamisso, M. Villaz, and J. J. Mercadier. Different compartments of sarcoplasmic reticulum participate in the excitation-contraction coupling process in human atrial myocytes. *Circ. Res.* 80: 343-353, 1997.
31. Benardeau, A., S. N. Hatem, C. Rucker-Martin, B. Le Grand, L. Mace, P. Dervanian, J. J. Mercadier, and E. Coraboeuf. Contribution of Na⁺/Ca²⁺ exchange to action potential of human atrial myocytes. *Am. J. Physiol.* 271 (Heart Circ. Physiol. 40): H1151-H1161, 1996.
32. Fermini, B., Z. Wang, D. Duan, and S. Nattel. Differences in the rate dependence of the transient outward current in rabbit and human atrium. *Am. J. Physiol.* 263 (Heart Circ. Physiol. 32): H1747-H1754, 1992.
33. Le Grand, B., S. Hatem, E. Deroubaix, J. P. Couetil, and E. Coraboeuf. Depressed transient outward and calcium currents in dilated human atria. *Cardiovasc. Res.* 28: 548-556, 1994.
34. Nygren, A., Fiset, C., Firek, L., Clark, J.W., Lindblad, D.S., Clark, R.B., Giles, W.R., 1998. Mathematical model of an adult human atrial cell: the role of K⁺ currents in repolarization. *Circulation Research* 82, 63-81.
35. Lindblad DS, Murphey CR, Clark JW, Giles WR. A model of the action potential and underlying membrane currents in a rabbit atrial cell. *Am J Physiol.* 1996;271:H1666-H1691.

36. Shibata EF, Drury T, Refsum H, Aldrete V, Giles W. Contributions of a transient outward current to repolarization in human atrium. *Am J Physiol*. 1989;257:H1773-H1781.
37. Wang Z, Fermini B, Nattel S. Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes: evidence for a novel delayed rectifier K1 current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res*. 1993;73: 1061-1076.
38. Koidl B, Flaschberger P, Schaffer P, Pelzmann B, Bernhart E, Ma"chler H, Rigler B. Effects of the class III antiarrhythmic drug ambasilide on outward currents in human atrial myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1996;353:226 -232.
39. Kottkamp H, Haverkamp W, Borggreffe M, Breithardt G. The role of class III antiarrhythmic drugs in atrial fibrillation. In: Olsson SB, Allesie MA, Campbell RWF, eds. *Atrial Fibrillation: Mechanisms and Therapeutic Strategies*. Armonk, NY: Futura Publishing Co Inc; 1994:287-306.
40. Maleckar MM, Greenstein JL, Giles WR, Trayanova NA. K+ current changes account for the rate dependence of the action potential in the human atrial myocyte. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297: H1398-H1410.
41. Wang Y, Xu H, Kumar R, Tipparaju SM, Wagner MB, Joyner RW. Differences in transient outward current properties between neonatal and adult human atrial myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 35: 1083-1092, 2003.
42. Wang Z, Feng J, Shi H, Pond A, Nerbonne JM, Nattel S. Potential molecular basis of different physiological properties of the transient outward K current in rabbit and human atrial myocytes. *Circ Res* 84:551-561, 1999.
43. Amos GJ, Wettwer E, Metzger F, Li Q, Himmel HM, Ravens U. Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes. *J Physiol* 491: 31-50, 1996.
44. Feng J, Xu D, Wang Z, Nattel S. Ultrarapid delayed rectifier current inactivation in human atrial myocytes: properties and consequences. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 275: H1717-H1725, 1998.
45. Dawodu AA, Monti F, Iwashiro K, Schiariti M, Chiavarelli R, Puddu PE. The shape of human atrial action potential accounts for different frequency-related changes in vitro. *Int J Cardiol* 54: 237-249, 1996.
46. Koivumäki JT, Korhonen T, Tavi P (2011) Impact of Sarcoplasmic Reticulum Calcium Release on Calcium Dynamics and Action Potential Morphology in Human Atrial Myocytes: A Computational Study. *PLoS Comput Biol* 7(1): e1001067. doi:10.1371/journal.pcbi.1001067

47. Hatem SN, Benardeau A, RuckerMartin C, Marty I, deChamisso P, et al. (1997) Different compartments of sarcoplasmic reticulum participate in the excitation-contraction coupling process in human atrial myocytes. *Circ Res* 80:345-353.
48. Courtemanche M, Ramirez RJ, Nattel S (1998) Ionic mechanisms underlying human atrial action potential properties: insights from a mathematical model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 44: H301-H321.
49. Ramirez RJ, Nattel S, Courtemanche M (2000) Mathematical analysis of canine atrial action potentials: rate, regional factors, and electrical remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H1767-1785.
50. Boutjdir M, Leheuzey JY, Lavergne T, Chauvaud S, Guize L, et al. (1986) Inhomogeneity of Cellular Refractoriness in Human Atrium - Factor of Arrhythmia? *Pacing Clin Electrophysiol* 9: 1095-1100.
51. Dawodu AA, Monti F, Iwashiro K, Schiariti M, Chiavarelli R, et al. (1996) The shape of human atrial action potential accounts for different frequency-related changes in vitro. *Int J Cardiol* 54: 237-249.
52. Dobrev D, Ravens U (2003) Remodeling of cardiomyocyte ion channels in human atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 98: 137-148.
53. Bosch RF, Zeng XR, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, et al. (1999) Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 44: 121-131.
54. Grandi E, Pandit SV, Voigt N, Workman AJ, Dobrev D, Jalife J, Bers DM (2011) Human atrial action potential and Ca²⁺ model: sinus rhythm and chronic atrial fibrillation. *Circulation Research* 109:1055-1066.
55. Grandi E, Pasqualini FS, Bers DM. A novel computational model of the human ventricular action potential and Ca transient. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48:112-121.56.
56. Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res.* 2002;90:939 -950.
57. Shannon TR, Wang F, Puglisi J, Weber C, Bers DM. A Mathematical treatment of integrated ca dynamics within the ventricular myocyte. *Biophys J.* 2004;87:3351-3371.
58. Lenaerts I, Bito V, Heinzl FR, Driesen RB, Holemans P, D'Hooge J, Heidbuchel H, Sipido KR, Willems R. Ultrastructural and functional remodeling of the coupling between Ca²⁺ influx and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in right atrial myocytes from experimental persistent atrial fibrillation. *Circ Res.* 2009;105:876-885.
59. Rocchetti M, Besana A, Mostacciuolo G, Ferrari P, Micheletti R, Zaza A. Diverse toxicity associated with cardiac Na⁺/K⁺ pump inhibition:

- evaluation of electrophysiological mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 305:765-771.
60. Hordof AJ, Spotnitz A, Mary-Rabine L, Edie RN, Rosen MR. The cellular electrophysiologic effects of digitalis on human atrial fibers. *Circulation.* 1978;57:223-229.
61. Caballero R, de la Fuente MG, Gómez R, Barana A, Amorós I, Dolz-Gaitoín P, Osuna L, Almendral J, Atienza F, Fernández-Avilés F, Pita A, Rodríguez-Roda J, Pinto A, Tamargo J, Delpon E. In humans, chronic atrial fibrillation decreases the transient outward current and ultrarapid component of the delayed rectifier current differentially on each atria and increases the slow component of the delayed rectifier current in both. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:2346 - 2354.
62. Koivumaki J, Christ T, Seemann G, Maleckar M. Divergent action potential morphology in human atrial cells vs tissue: underlying ionic mechanisms. *Computing in cardiology, conference proceedings.* 2012.
63. Wettwer E, Hála O, Christ T, Heubach JF, Dobrev D, Knaut M, et al. Role of IKur in Controlling Action Potential Shape and Contractility in the Human Atrium Influence of Chronic Atrial Fibrillation. *Circulation.* 2004 Oct 19;110(16):2299-306.
64. Redpath CJ, Rankin AC, Kane KA, Workman AJ. Anti-adrenergic effects of endothelin on human atrial action potentials are potentially anti-arrhythmic. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2006 May;40(5):717-24.
65. Pau D, Workman AJ, Kane KA, Rankin AC. Electrophysiological and arrhythmogenic effects of 5-hydroxytryptamine on human atrial cells are reduced in atrial fibrillation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2007 Jan;42(1):54-62.
66. Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-type Ca²⁺ currents and human atrial fibrillation. *Circ. Res.* 1999 Sep 3;85(5):428-36.
67. Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kühlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* 1999 Oct;44(1):121-31.
68. Workman AJ, Pau D, Redpath CJ, Marshall GE, Russell JA, Norrie J, et al. Atrial cellular electrophysiological changes in patients with ventricular dysfunction may predispose to AF. *Heart Rhythm.* 2009 Apr;6(4):445-51.
69. Seemann G, Höper C, Sachse FB, Dössel O, Holden AV, Zhang H. Heterogeneous three-dimensional anatomical and electrophysiological model of human atria. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci.* 2006 Jun 15;364(1843):1465-81.

RINGRAZIAMENTI
