

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
SEDE DI CESENA
SECONDA FACOLTÀ DI INGEGNERIA CON SEDE A CESENA
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

TITOLO DELLA TESI

IL PACEMAKING CARDIACO: SVILUPPO DI UNA PIATTAFORMA HW/SW
PER LO STUDIO SPERIMENTALE MEDIANTE DYNAMIC CLAMP
E ANALISI MODELLISTICA

Tesi in

Bioingegneria molecolare e cellulare LM

Relatore
Prof. Ing. Stefano Severi

Presentata da
Enrico Ravagli

Correlatore
Dott.ssa Chiara Bartolucci

Sessione III

Anno Accademico 2011-2012

INDICE

Introduzione	1
Capitolo 1 – Cenni di elettrofisiologia e pacemaking cardiaco	3
1.1 L'elettrofisiologia del cuore	3
1.2 Canali ionici e potenziale d'azione nel muscolo cardiaco	7
1.3 La dinamica del calcio all'interno della cellula cardiaca	19
1.4 Pacemaking cardiaco: il nodo senoatriale	20
1.5 Membrane clock e calcium clock: teorie di pacemaking	26
1.6 Valutazioni sull'importanza relativa dei meccanismi di clock	28
Capitolo 2 – Strumenti di indagine elettrofisiologica e dynamic clamp	35
2.1 Storia degli esperimenti di elettrofisiologia	35
2.2 Tecniche di clamp: voltage clamp, current clamp, AP clamp	37
2.3 La modellistica cardiaca	44
2.4 La tecnica del dynamic clamp	58
Capitolo 3 – Implementazione di una piattaforma per esperimenti di pacemaking cardiaco in dynamic clamp	66
3.1 La piattaforma RTX1	66
3.2 Setup Hardware	72
3.3 Codice software	81
3.4 Svolgimento degli esperimenti in laboratorio biologico	86
3.5 Analisi dei risultati sperimentali	93

Capitolo 4 – Analisi modellistica della dinamica del calcio intracellulare	99
4.1 Riproduzione degli effetti della rianodina	99
4.2 Analisi preliminari	103
4.3 Buffering del calcio e possibile esistenza dello spazio diadico	109
4.4 Modifiche alla corrente di calcio L-Type e alla corrente di rilascio reticolare	112
Conclusioni	121
Appendice A – Codice moduli software RTXI	124
Bibliografia	140
Ringraziamenti	152

INTRODUZIONE

La volontà di indagare le caratteristiche dell'attività elettrica presente nelle cellule del sistema nervoso e del tessuto cardiaco ha portato negli anni allo sviluppo di diverse tecniche di indagine sperimentale elettrofisiologica e di diverse rappresentazioni modellistiche. Con il passare del tempo si è sempre più diffuso un approccio costituito dallo svolgimento di prove standard (*Voltage clamp* e *Current clamp*) e dall'integrazione dei dati ottenuti in un modello del sistema sotto indagine. Nonostante tali tecniche abbiano consentito grandi progressi nel campo dell'elettrofisiologia, la loro capacità di indagine scientifica viene limitata dalla loro stessa natura, la quale impone alla cellula analizzata un regime di funzionamento ben definito e lontano dalle condizioni fisiologiche. La tecnica del dynamic clamp si pone come scopo quello di superare tale limite attraverso un'interazione dinamica fra lo strumento di indagine e il sistema sotto esame. Sebbene l'idea alla base di questa tecnica sia stata sviluppata già da alcune decine di anni, solo i recenti progressi tecnologici ne rendono l'implementazione una procedura rapida e relativamente semplice. L'obiettivo di questo lavoro è lo studio del pacemaking cardiaco senoatriale tramite un'indagine sulle caratteristiche dei due meccanismi cellulari maggiormente coinvolti in questo fenomeno, ovvero la corrente funny (I_f) e le oscillazioni del calcio intracellulare. È infatti in corso un dibattito in letteratura riguardo a quale di questi due meccanismi sia di importanza predominante per la generazione spontanea dei potenziali d'azione. Tale studio è stato portato avanti in parallelo tramite dynamic clamp per la parte relativa ai meccanismi di membrana e tramite analisi modellistica per la dinamica del calcio intracellulare, impossibile da indagare tramite tecniche di clamp. Nel primo capitolo vengono forniti elementi di base di elettrofisiologia cardiaca necessari alla comprensione del lavoro svolto e informazioni più specifiche

riguardanti le caratteristiche del nodo senoatriale e delle teorie di pacemaking (*Membrane clock* e *Calcium clock*). Nel secondo capitolo vengono descritte le principali tecniche sperimentali di indagine elettrofisiologica, vengono forniti cenni di rappresentazione modellistica e viene descritta la tecnica del dynamic clamp nella sua forma più generale. Nel terzo capitolo sono riportate le specifiche della piattaforma di dynamic clamp implementata, assieme alle problematiche affrontate durante il suo allestimento. Sono inoltre descritti gli esperimenti svolti con tale sistema in laboratorio elettrofisiologico e i risultati ottenuti. Nel quarto capitolo si procede ad uno studio modellistico della gestione del calcio all'interno della cellula senoatriale, analizzandone le caratteristiche attraverso la rappresentazione che ne viene fornita da due dei più recenti modelli in letteratura. Vengono infine tratte conclusioni sulla piattaforma sviluppata, sui risultati relativi al suo impiego specifico nello studio del pacemaking, e sulla relazione con i risultati ottenuti dall'analisi modellistica.

CAPITOLO 1

CENNI DI ELETTROFISIOLOGIA E PACEMAKING CARDIACO

Introduzione

Il capitolo comincia con la descrizione dell'organo cardiaco e delle sue caratteristiche sia generali che di tipo elettrico. Vengono analizzati i principali eventi cellulari che portano alla formazione del potenziale d'azione della cellula cardiaca, per poi focalizzarsi sulle caratteristiche del potenziale d'azione del nodo senoatriale del cuore, in quanto significativamente differenti da quelle del potenziale atrio-ventricolare. Vengono descritte le due principali teorie presenti in letteratura riguardanti l'origine del fenomeno del pacemaking senoatriale, con una breve rassegna dei punti a favore e a sfavore delle teorie che vedono l'uno o l'altro dei due meccanismi (*Membrane Clock* e *Calcium Clock*) come predominanti. In questo capitolo vengono quindi proposti cenni basilari di argomenti necessari alla comprensione del lavoro descritto nei capitoli successivi.

1.1 – L'elettrofisiologia del cuore

Il cuore è l'organo del sistema cardiovascolare il cui scopo è creare le condizioni necessarie (in termini di gradienti di pressione) per il trasporto continuo del sangue verso le diverse zone del corpo e per il suo conseguente ritorno. Anatomicamente è suddiviso da una parete centrale, il setto, in una parte destra ed una sinistra. Ognuna di tali parti è a sua volta suddivisa in una camera superiore, l'atrio (che riceve il sangue di ritorno al cuore) ed una camera inferiore, il ventricolo (da cui il sangue fluisce nei vasi). Il sangue proveniente

dalla circolazione sistemica entra nell'atrio destro tramite le vene cave, per poi essere inviato tramite il ventricolo e le arterie polmonari ai polmoni per essere ossigenato. Da qui il sangue ossigenato torna al cuore attraversando le vene polmonari per giungere nell'atrio sinistro, essere trasportato al ventricolo sinistro, e tornare nella circolazione sistemica attraverso l'arteria aorta. Il reflusso del sangue dal ventricolo all'atrio viene impedito da valvole a cuspide, denominate tricuspide per la parte destra del cuore e bicuspide (o mitrale) per quella sinistra. Sono anche presenti valvole all'uscita dei ventricoli, denominate valvola polmonare per il ventricolo destro e valvola aortica per il ventricolo sinistro (Figura 1.1).

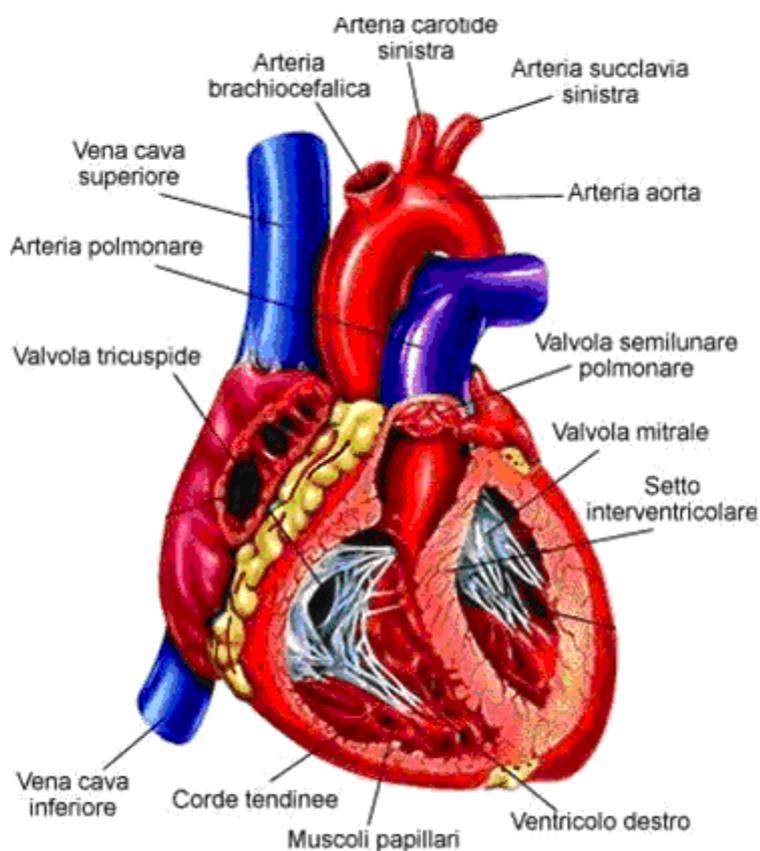


Figura 1.1: Rappresentazione del cuore umano (Anzivino S., Tesi Unibo)

Il cuore è in grado di contrarsi rapidamente generando un forte gradiente di pressione nei ventricoli, necessario a trasportare il sangue fino alle zone più distanti del sistema circolatorio. Questo gradiente, generabile fisicamente in quanto la maggior parte del cuore è costituita da tessuto muscolare, porta la pressione nei vasi ad assumere valori fisiologici nell'intervallo di 120-80 mmHg per la circolazione arteriosa (a livello aortico), 5-10 mmHg per la pressione venosa a livello della vena cava, e 10-20 mmHg per quella polmonare. La maggior parte del tessuto cardiaco è quindi di natura muscolare, ma le fibre striate che lo compongono sono di tipo diverso da quelle del normale muscolo scheletrico: si tratta di fibre più corte, possono essere ramificate e sono caratterizzate da un singolo nucleo (a differenza delle fibre muscolari scheletriche che sono multinucleate). Per una trattazione più ampia sulle caratteristiche dell'organo cardiaco e in generale del sistema cardiocircolatorio si rimanda ai testi di fisiologia di base (nel caso specifico, Silverthorn2007).

La contrazione generata nel tessuto muscolare cardiaco ha origine per via di uno stimolo di tipo elettrico (o per meglio dire, elettro-ionico) fornito dal cuore stesso alle fibre: tale stimolo si propaga nell'organo lungo un percorso ben definito, attraverso un sistema di conduzione. Sono quindi presenti altri due tipi di tessuto all'interno del cuore, il tessuto nodale (per la generazione dello stimolo) e quello di conduzione. Le cellule del tessuto nodale sono quindi le reali responsabili del battito cardiaco (vengono infatti definite cellule autoritmiche o cellule pacemaker). Tali cellule generano lo stimolo elettrico necessario per la contrazione e sono diffuse in più parti del cuore: il gruppo principale si trova nel nodo senoatriale, una striscia di tessuto lunga circa 2 cm e spessa 2-3 mm, situata nella giunzione fra l'atrio destro e la vena cava superiore. Il segnale generato nel nodo senoatriale si diffonde in modo veloce e diretto negli atri (0.1-1 m/s,

Bers2001) generando la loro contrazione, per poi arrivare attraverso le fibre di conduzione fino al nodo atrio-ventricolare. Questo secondo agglomerato di cellule nodali si limita (in condizioni fisiologiche) a trasmettere il segnale ricevuto inducendo un piccolo ritardo, necessario per assicurare che la contrazione ventricolare sia successiva a quella atriale e garantire un corretto flusso del sangue. Il nodo atrio-ventricolare si trova vicino alla valvola tricuspide sul suo lato settale, e in assenza di segnale senoatriale può svolgere a sua volta funzioni di pacemaking a frequenza ridotta. La propagazione prosegue quindi attraverso il fascio di His, le cui due branche attraversano i due ventricoli, per arrivare alle fibre del Purkinje, una rete che avvolge la parete ventricolare per permettere una migliore diffusione dello stimolo elettrico. Data la natura estremamente conduttiva di questi due ultimi elementi (His e Purkinje) la velocità di propagazione attraverso tali tessuti raggiunge i 2-4 m/s. Nei seguenti paragrafi verranno analizzate le caratteristiche del segnale elettrico propagato nel tessuto cardiaco e la sua generazione relativa ad una concatenazione di eventi a livello cellulare.

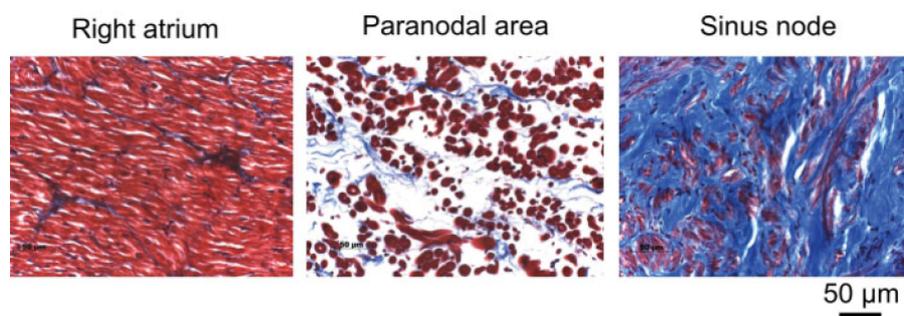


Figura 1.2: Tessuto cardiaco di tipo atriale destro (a sinistra), paranodale (centro) e di nodo del seno (a destra) (Anderson2009)

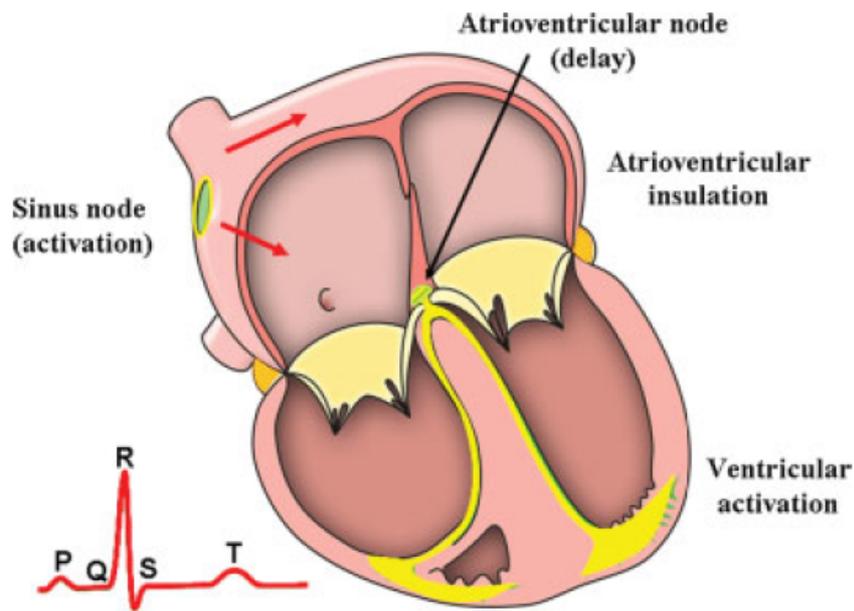


Figura 1.3: La propagazione del segnale elettrico di stimolo attraverso l'organo cardiaco (Anderson2009)

1.2 – Canali ionici e potenziale d'azione nel muscolo cardiaco

Ogni singola cellula cardiaca è in grado di interagire con l'ambiente esterno (cellule vicine e liquido extracellulare) tramite una vasta famiglia di strutture proteiche che ne attraversano la membrana fosfolipidica. Di particolare interesse per questo lavoro sono i cosiddetti canali ionici, ovvero strutture in grado di consentire lo spostamento di ioni (principalmente Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^-) attraverso la membrana cellulare. I canali ionici sono sensibili a diversi fattori fisici e chimici che ne regolano lo stato di apertura (e di conseguenza il flusso di ioni), come ad esempio un determinato valore di potenziale elettrico transmembrana o il raggiungimento su uno dei due lati del canale di determinate concentrazioni ioniche.

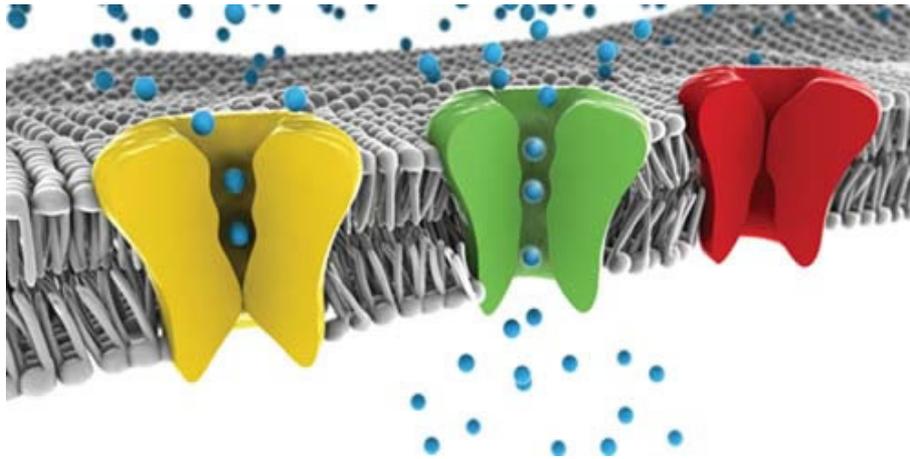


Figura 1.4: Rappresentazione grafica di canali ionici. In giallo un canale chiuso, in verde un canale aperto, in rosso un canale la cui apertura è impedita da una mutazione (Illustrazione di J.P. Cartailleur, Copyright 2007, Symmation LLC)

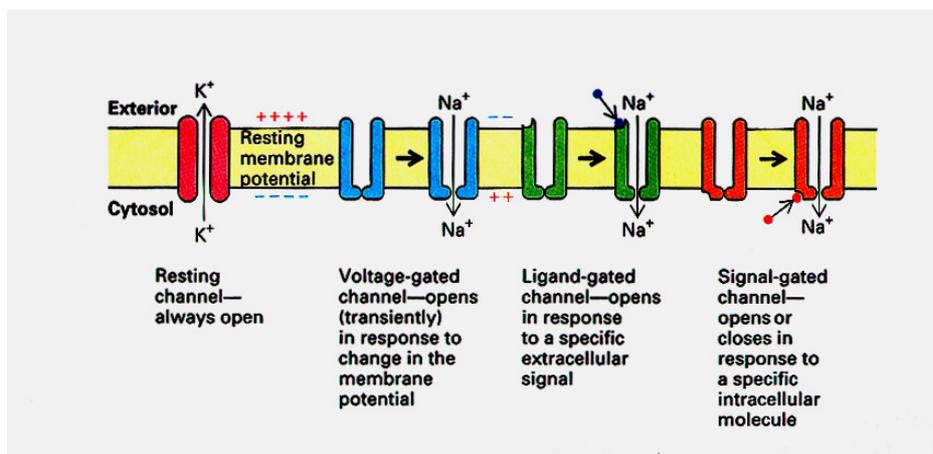


Figura 1.5: Il segnale che regola l'apertura di un canale ionico può essere di varia natura (<http://www.anesthesia.ucsf.edu/yostlab/beginner.html>)

Il conseguente flusso di particelle cariche genera a sua volta una corrente elettro-ionica in grado (potenzialmente) di alterare le condizioni che hanno portato all'apertura del canale. Ogni famiglia di canali è inoltre altamente selettiva ad un solo ione (a parte alcuni casi particolari), il che determina l'attribuzione del nome di canali del calcio, canali del potassio, e via dicendo. Tale selettività è naturalmente collegata alla loro funzione fisiologica. L'esistenza dei canali ionici è stata per la prima volta ipotizzata da Hodgkin e Huxley

(in una serie di pubblicazioni, vedi Hodgkin1952 in bibliografia per il primo articolo della serie) che per i loro esperimenti su assone di calamaro hanno ottenuto il premio Nobel ma la conferma sperimentale della loro esistenza è stata ottenuta solamente negli anni '70, scoperta che ha portato allo sviluppo di tecniche di indagine specifica (tecniche di *clamp*) di cui si parlerà nei capitoli successivi. Si rende a questo punto necessario introdurre il concetto di potenziale di equilibrio (o potenziale di Nernst): lo stato di apertura di un canale può infatti regolare il flusso di ioni, ma non ne rappresenta la forza motrice di base. Secondo l'equazione di Nernst la differenza di concentrazione di ogni specie ionica fra ambiente interno ed esterno genera un potenziale elettrico (e di conseguenza un campo) che porta al movimento degli ioni (in quanto particelle cariche). Si prenda ad esempio il caso specifico del potassio:

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

$R = 8.314472 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ costante universale dei gas

$T =$ Temperatura in gradi Kelvin

$Z =$ Valenza dell'elemento

$F = 96485.3399 \text{ C} / \text{mol}$ costante di Faraday

$[K^+]_i =$ concentrazione intracellulare di potassio

$[K^+]_o =$ concentrazione extracellulare di potassio

L'apertura di un canale ionico lascia fluire liberamente gli ioni a cui il canale è permeabile (in base alla sua selettività): se questo processo fosse in grado di evolversi indisturbato senza l'intervento di altri meccanismi cellulari il risultato sarebbe quello di annullare la differenza di concentrazione fra i due compartimenti e di conseguenza

di azzerare la forza elettromotrice che causa il flusso. Il potenziale di equilibrio viene anche definito potenziale di inversione, in quanto un potenziale di membrana ad esso superiore porta ad una corrente ionica uscente, mentre per un potenziale di membrana ad esso inferiore porta ad una corrente entrante. Per convenzione la corrente uscente è considerata positiva e quella entrante negativa. Alcuni valori approssimativi:

$$\begin{array}{lll} [K^+]_i = 140 \text{ mM} & [K^+]_o = 5.4 \text{ mM} & E_K = -90 \text{ mV} \\ [Na^+]_i = 8 \text{ mM} & [Na^+]_o = 140 \text{ mM} & E_{Na} = +70 \text{ mV} \end{array}$$

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

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

P = Permeabilità dello ione

$[C]_{in}$ = Concentrazione intracellulare

$[C]_{out}$ = Concentrazione extracellulare

Le concentrazioni intracellulari alterate dai flussi ionici vengono ripristinate secondo modalità e tempi specifici dettati da appositi meccanismi cellulari, come la pompa Na^+-K^+ e lo scambiatore Na^+-Ca^{2+} . Di seguito vengono descritti in modo generale i canali coinvolti nella generazione del potenziale d'azione, ovvero la forma d'onda assunta dal potenziale elettrico transmembrana di una singola cellula cardiaca in seguito ad un lieve stimolo elettrico.

Canali del sodio

La famiglia dei canali ionici Na^+ -permeabili è caratterizzata dalla possibilità di rispondere ad una depolarizzazione anche molto leggera della membrana cellulare tramite una breve e intensa corrente entrante di ioni Na^+ (per convenzione negativa e denominata I_{Na} o *fast inward current*). Questi canali hanno anche la proprietà di inattivarsi a valori sufficientemente positivi del potenziale di membrana, proprietà in parte responsabile della mancata possibilità di tetanizzazione del muscolo cardiaco. Nelle cellule senoatriali i canali del sodio sono presenti in misura estremamente ridotta, in tal caso I_{Na} risulta quindi trascurabile.

Canali del calcio

I canali del calcio si suddividono in due famiglie principali per via delle loro caratteristiche: canali L-Type e canali T-Type. I canali T-Type vengono denominati in questo modo in quanto “*Tiny*” e “*Transient*”, ovvero di dimensioni ridotte e rapida inattivazione. I canali L-Type sono invece chiamati in questo modo in quanto “*Large*” e “*Long-Lasting*”, ovvero di dimensioni maggiori e dall’inattivazione più lenta. Questi ultimi saranno quindi il tipo di canali del calcio che più contribuisce al potenziale d’azione e in generale alle dinamiche della cellula. Le correnti generate da entrambi i tipi di canali (rispettivamente I_{CaL} e I_{CaT}) mostrano proprietà di rapida attivazione (anche se non paragonabile alla rapidità di attivazione della corrente I_{Na}), dipendenza dal potenziale di membrana e dipendenza inversa dalla concentrazione di calcio intracellulare (nella misura in cui ad un $[\text{Ca}^{2+}]_i$ maggiore corrisponde inattivazione più rapida). L’inattivazione lenta di I_{CaL} è determinante per una specifica fase del potenziale d’azione.

Canali del potassio

I canali del potassio costituiscono il gruppo di canali più eterogeneo, sia in termini di variabilità fra tipologie specifiche che in termini di presenza nelle varie zone del cuore, però in condizioni fisiologiche la corrente generata dal flusso di K^+ è sempre di tipo uscente (positivo). Due importanti correnti di potassio sono denominate I_{Kr} (*rapid delayed rectifier current*) e I_{Ks} (*slow delayed rectifier current*). Tali correnti sono principalmente attive durante il potenziale d'azione, anche se con costanti di tempo diverse (come indicato dal nome I_{Kr} è rapida e I_{Ks} più lenta). Un'altra componente molto importante è la corrente I_{to} (*transient outward current*) attiva in una specifica fase del potenziale d'azione e dalle dinamiche di attivazione e inattivazione molto veloci. Esiste inoltre una corrente denominata I_{K1} o *inward rectifier current* per via della sua proprietà di mostrare conduttanze diverse a diversi valori di potenziale di membrana: tale corrente è maggiormente attiva a potenziali estremamente negativi. Il suo ruolo è quello di stabilizzazione del potenziale di riposo della cellula (ovvero il valore di potenziale transmembrana assunto prima e dopo un potenziale d'azione) (Dhamoon2005). L'insieme delle correnti finora introdotte (I_{Kr} , I_{Ks} , I_{to} , I_{K1}) rappresenta il gruppo di correnti di potassio più significativo e sperimentalmente riconosciuto. Esistono però in letteratura altre correnti la cui natura non è ancora del tutto chiara: si può citare ad esempio la componente ultra-rapida $I_{K,Ur}$ o la componente sostenuta I_{Sus} (Nerbonne2000, Wang1993). Nonostante sia importante far luce sulle caratteristiche di questi canali ionici, le relative correnti risultano trascurabili nel contributo alla forma d'onda del potenziale d'azione.

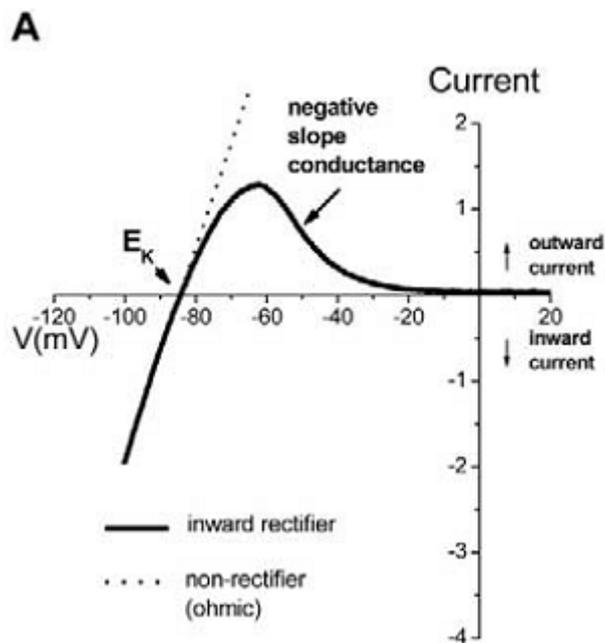


Figura 1.6: Rapporti corrente/tensione diversi per canali non-rettificanti (linea tratteggiata) e rettificanti (linea continua) come i canali relativi a I_{K1} (Dhamoon2005)

Canali del cloro

Per quanto riguarda il contributo al potenziale d'azione l'unica corrente di ioni Cl^- rilevante è la corrente definita I_{to2} . Tale corrente viene definita *transient outward*, come la corrente I_{to} del potassio, in quanto un flusso in entrata nella cellula di ioni carichi negativamente ha lo stesso effetto di una corrente uscente di ioni carichi positivamente. Viene chiamata in questo modo perché approssimativamente si attiva con gli stessi tempi di I_{to} , ed è sensibile alla concentrazione intracellulare di Ca^{2+} (Bers2001).

Sono finora state descritte le caratteristiche generali di diversi tipi di canali ionici: la presenza contemporanea di queste famiglie di canali sulla membrana cellulare crea, in presenza di uno stimolo elettrico esterno, una concatenazione di eventi intra ed extra-cellulari che fa assumere al potenziale elettrico transmembranale una forma specifica.

Si definisce quindi “potenziale d’azione” (abbreviato AP, da *action potential*) la forma d’onda assunta da questo segnale, e si tratta di un modo di rappresentare lo stato di eccitazione elettrica della cellula in relazione ad un fenomeno più ampio, detto accoppiamento eccitazione-contrazione. Come il nome stesso suggerisce, in base a tale fenomeno l’eccitazione elettrica della cellula mette in moto una serie di meccanismi che permettono lo scorrimento di miofilamenti e l’accorciamento (contrazione) della cellula. L’eccitazione-contrazione di cardiomiociti in modo coordinato lungo il tessuto cardiaco porta alla contrazione di tutto l’organo.

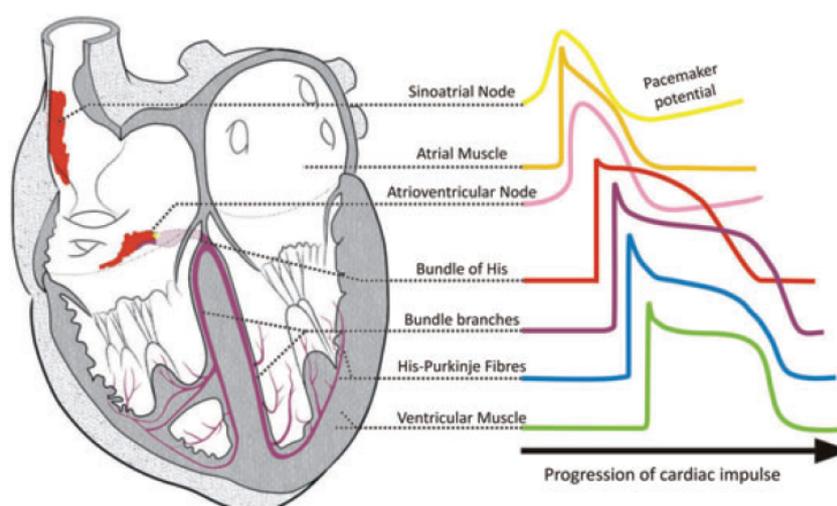


Figura 1.7: Forma del potenziale d’azione in regioni diverse del miocardio (Monfredi2010)

Si descriverà ora la forma d’onda del potenziale d’azione tipico delle cellule atriali e ventricolari (per via delle loro similitudini).

Sono presenti cinque fasi distinte:

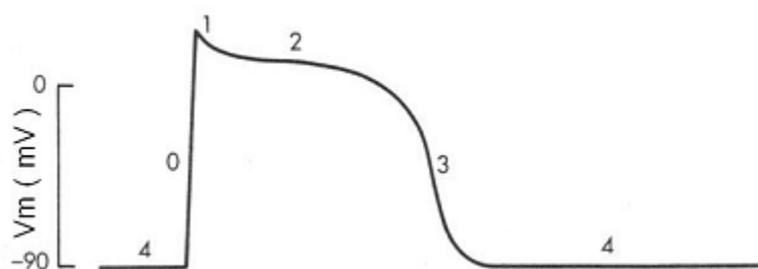


Figura 1.8: Fasi del potenziale d'azione (Bianchini D., tesi Unibo)

Fase 0 – Depolarizzazione rapida

In questa fase iniziale la cellula riceve uno stimolo elettrico esterno sotto forma di leggera depolarizzazione: si tratta di un aumento del valore del potenziale elettrico di membrana (misurato con riferimento di massa all'esterno della cellula) dai -80 mV circa di valore allo stato di riposo fino a circa -70 mV. Questo leggero innalzamento del potenziale è sufficiente per l'apertura dei canali del sodio: il flusso di ioni positivi verso l'interno della cellula porta ad una depolarizzazione ancora più brusca (*upstroke*). Il potenziale raggiunge il suo picco a +30/+40 mV, per via di un equilibrio estremamente temporaneo fra correnti entranti ed uscenti.

Fase 1 – Ripolarizzazione transiente

Raggiunto il picco del potenziale, i valori estremamente positivi in gioco hanno sia l'effetto di inattivare i canali del sodio azzerando la corrente I_{Na} , che quello di attivare le correnti del potassio che contribuiscono a ripolarizzare la cellula. Tale ripolarizzazione è però di breve durata per via del veloce sopraggiungere della fase successiva. La corrente più attiva in questa fase è quindi I_{to} , ma è presente anche I_{to2} .

Fase 2 – Plateau

Questa fase è caratterizzata da un intervallo di tempo in cui il potenziale assume valore quasi costante: è tipica delle cellule cardiache (non si osserva ad esempio nei potenziali d'azione neuronali) e dura circa 100 ms, ma durata e forma esatta variano in base alla zona del miocardio presa in esame (Figura 1.7). Il potenziale assume valore pressochè costante per via di un equilibrio fra correnti entranti (principalmente I_{CaL}) ed uscenti (correnti di K^+). All'inattivazione dei canali L-Type la ripolarizzazione riprende e si passa alla fase successiva. La presenza e lunga durata del plateau nelle cellule cardiache è data dalla necessità di evitare la tetanizzazione, ovvero il mantenimento dello stato di contrazione del muscolo: tale fenomeno bloccherebbe il ciclo cardiaco impedendo il trasporto di sangue nel sistema circolatorio. La tetanizzazione viene evitata in quanto il mantenimento di un alto potenziale di membrana tiene inattivati i canali di Na^+ , di conseguenza le miofibrille hanno a disposizione un tempo sufficiente al rilassamento prima della contrazione successiva.

Fase 3 – Ripolarizzazione

In seguito all'esaurirsi del contributo dei canali del calcio, le correnti di potassio possono portare rapidamente alla ripolarizzazione della cellula, fino a tornare al valore di riposo (come già detto, attorno ai -80 mV circa). La ripolarizzazione tende inoltre ad accelerare, grazie alle proprietà rettificanti dei canali in questione.

Fase 4 – Ritorno al potenziale di riposo

Piuttosto che di una vera e propria fase si tratta dello stato stabile a cui ritorna la cellula in seguito ad un potenziale d'azione: i canali di membrana si riportano in condizioni tali da poter rispondere al successivo stimolo elettrico. Le cellule cardiache dedite alla

contrazione (atriali, ventricolari) rimangono quindi in attesa di tale stimolo, mentre le cellule con proprietà autoritmiche sfruttano questa fase per scatenare autonomamente una nuova depolarizzazione.

Il fenomeno del potenziale d'azione si basa quindi su correnti generate da flussi di ioni, ma tali flussi tendono naturalmente ad alterare le concentrazioni ioniche intracellulari ed extracellulari e quindi a modificare il valore istantaneo dei potenziali di Nernst. L'ambiente extracellulare risente in modo relativamente basso delle variazioni (per via della sua natura più estesa) e le relative concentrazioni possono essere approssimate come costanti, ma l'ambiente intracellulare subisce variazioni significative. Il motivo per cui tali variazioni di concentrazione non si accumulano con il susseguirsi di potenziali d'azione fino ad avere effetti significativi è la presenza di meccanismi adibiti al riequilibrio della presenza di ioni sulla membrana cellulare (e nei compartimenti interni della cellula). I due meccanismi più importanti a livello di membrana sono la pompa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ e lo scambiatore $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$.

Lo scambiatore $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ ha la funzione di spostare ioni Ca^{2+} dall'interno della cellula verso l'esterno: essendo la concentrazione di Ca^{2+} più alta all'esterno della cellula si tratta di uno spostamento contro gradiente. L'energia necessaria per tale operazione viene fornita dallo spostamento di Na^+ verso l'interno della cellula (secondo gradiente, quindi con una diminuzione dell'energia potenziale del sistema). L'intensità e il segno della corrente generata variano a seconda delle concentrazioni di Na^+ e Ca^{2+} ma generalmente si ha lo spostamento di tre ioni Na^+ verso l'interno della cellula e di uno ione Ca^{2+} verso l'esterno: questo si traduce in una corrente netta entrante e per convenzione negativa. La corrente diventa positiva (uscende) solo per un breve intervallo di tempo durante la sistole.

La pompa $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasi}$ è in grado invece di trasportare 3 ioni Na^+ all'esterno della cellula e 2 ioni K^+ verso l'interno, dando origine ad una corrente uscente (ovvero positiva). L'energia per questi due trasporti contro gradiente è fornita dalle molecole di ATP.

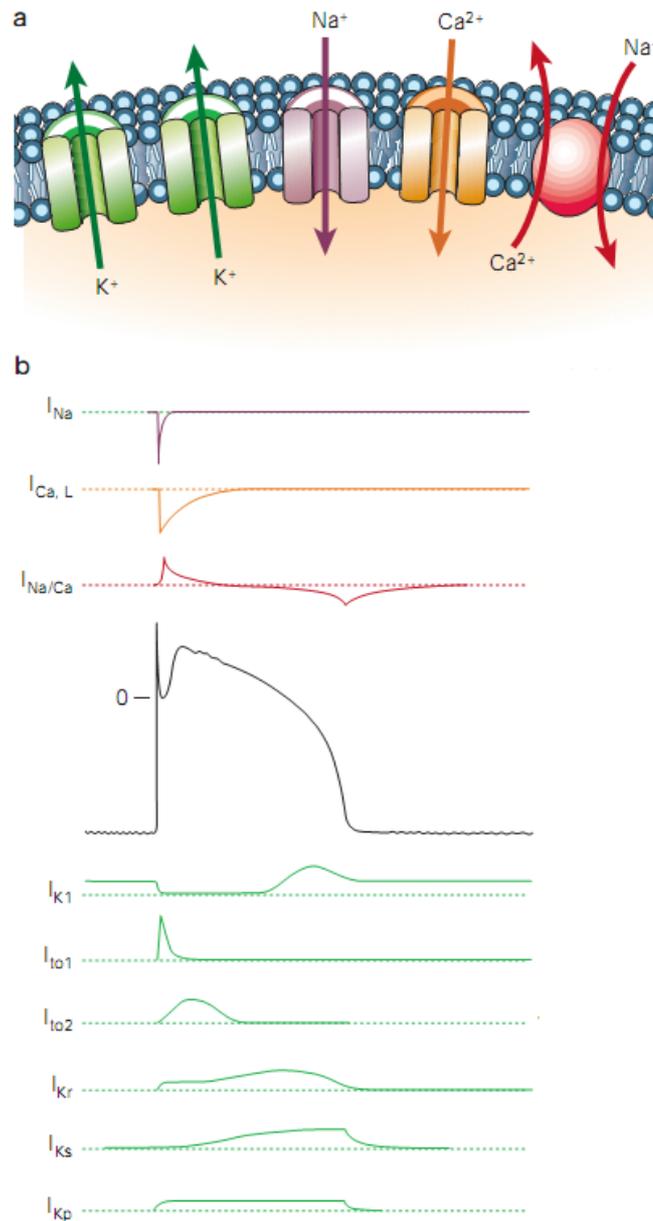


Figura 1.9: (a) Rappresentazione di canali ionici di K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , e scambiatore $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ (b) Andamento delle principali correnti ioniche durante il potenziale d'azione (Marban 2002)

1.3 – La dinamica del calcio all'interno della cellula cardiaca

L'attivazione dei canali L-type durante la fase 2 del potenziale d'azione assicura l'ingresso nella cellula di una determinata quantità di ione Ca^{2+} . Oltre al mantenimento del plateau il calcio ha anche la funzione di molecola di segnalazione per diversi processi intracellulari, tra cui uno di specifico interesse definito "rilascio di calcio calcio-indotto" (o CICR, *Calcium-Induced Calcium Release*). Questo fenomeno si basa sulla presenza di una struttura intracellulare definita reticolo sarcoplasmatico, che agisce come serbatoio di calcio: la superficie del reticolo è strettamente accoppiata con la zona in cui i canali di calcio L-Type rilasciano calcio all'interno della cellula, ed è costellata da un particolare tipo di recettori definiti recettori della Ryanodina (o RyR, *ryanodine receptors*). Un aumento anche lieve della concentrazione di calcio intracellulare nella zona dei recettori RyR determina la loro apertura con un conseguente svuotamento del reticolo sarcoplasmatico e l'innalzamento del livello di calcio intracellulare: si verifica quindi un'amplificazione rapida della concentrazione. Il calcio rilasciato si lega poi alla subunità di una proteina detta troponina, la quale in condizioni di riposo della cellula blocca lo scorrimento delle fibre muscolari. Il legame con il calcio rimuove l'inibizione e permette alle fibre di iniziare a scorrere. Mentre nelle cellule muscolari scheletriche solo il calcio reticolare è significativo per scatenare la contrazione, nelle cellule muscolari cardiache sia il calcio reticolare che quello permeato dalla membrana attraverso i canali contribuiscono in modo importante. La grande quantità di calcio liberata all'interno della cellula deve essere poi riassorbita per poter garantire il rilassamento delle fibre: questo avviene attraverso la membrana cellulare (principalmente con lo scambiatore $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$, ma anche tramite una pompa di Ca^{2+} alimentata da ATP) e attraverso il reticolo, che in questo modo ripristina le sue

scorte. Il reticolo utilizza una pompa Ca^{2+} -ATPasi detta SERCA, ovvero *SarcoEndoplasmatic Reticulum Ca^{2+} -ATP*.

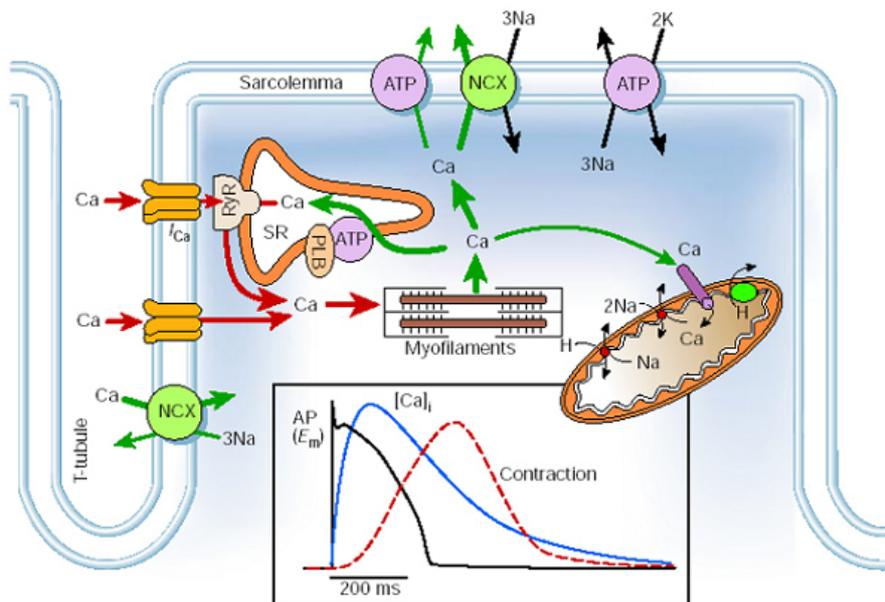


Figura 1.10: Nella figura è rappresentato il ciclo del calcio intracellulare, nel riquadro si ha una rappresentazione temporale di potenziale d'azione, concentrazione intracellulare di calcio e intensità della contrazione (Grandi, PhD Thesis, 2007)

1.4 – Pacemaking cardiaco: il nodo senoatriale

È stata finora descritta la generazione del potenziale d'azione atrio-ventricolare in seguito ad uno stimolo elettrochimico esterno alla cellula, stimolo trasportato nell'intero organo cardiaco dal sistema di conduzione. In condizioni fisiologiche le cellule pacemaker del nodo senoatriale sono direttamente responsabili di questo segnale elettrico: in base alle loro caratteristiche sono in grado di generare periodicamente un potenziale d'azione senza necessità di stimoli esterni (è comunque presente modulazione di frequenza di tipo beta-adrenergico e colinergico). Essendo i dati sperimentali relativi a cellule senoatriali umane estremamente scarsi, la maggior parte dei dati presenti in letteratura è relativa a diverse specie animali (fra tutte

il coniglio). Un'ulteriore difficoltà nello studio di questo tipo di cellule è data dalla loro eterogeneità, sia in termini di variazione specie-specie che di differenze fra regioni diverse del nodo. Verrà ora fornita una descrizione generale delle correnti ioniche di maggiore interesse per le cellule senoatriali in relazioni alla generazione spontanea di potenziale d'azione.

Correnti di sodio

Nelle cellule senoatriali le correnti relative ai canali del sodio hanno un effetto trascurabile sul potenziale d'azione: ne deriva un *upstroke* (rapida salita del potenziale in fase 0) molto meno ripido di quello delle cellule atriali o ventricolari. La corrente I_{Na} risulta assente nelle cellule senoatriali di dimensioni più ridotte, e di piccola entità nelle cellule di dimensioni maggiori (Irisawa1993, Honjo1996).

Correnti di potassio

Le correnti di potassio assumono nel nodo senoatriale lo stesso ruolo di ripolarizzazione che hanno nelle cellule cardiache atriali e ventricolari. Sono quindi presenti I_{Kr} , I_{Ks} , I_{to} , ma è da notare l'assenza della corrente di stabilizzazione I_{K1} (Honjo1996).

Correnti di calcio

Nel nodo senoatriale sono presenti le correnti di calcio relative ai canali L-Type e T-Type (Irisawa1993). Data l'assenza delle correnti di sodio, ricade su queste correnti il compito di scatenare la depolarizzazione della cellula: in base alle loro caratteristiche di attivazione e inattivazione avviene tutto in modo più lento.

Corrente "funny"

La corrente "funny" (I_f), o *hyperpolarization-activated current*, è presente principalmente nel tessuto nodale e conduttivo: se ne rilevano

deboli tracce anche nel miocardio contrattile, ma la maggior parte rimane nel nodo senoatriale e in misura minore nel nodo atrio-ventricolare e nelle fibre del Purkinje (da notare che in caso di blocco del pacemaking senoatriale, questi ultimi tipi di tessuto possono assumerne debolmente le funzioni). I canali relativi a tale corrente sono stati battezzati “funny” in base a due caratteristiche particolari: una è la permeabilità significativa a due ioni diversi (Na^+ e K^+) e l'altra è l'attivazione indotta da potenziali di membrana estremamente negativi invece che positivi. Il range di valori per un potenziale di membrana sufficientemente negativo per l'attivazione della corrente è molto variabile a seconda dello studio sperimentale preso in considerazione, ragione per cui è presente in letteratura un dibattito relativo al ruolo di I_f come componente fondamentale per il pacemaking o semplice meccanismo di sicurezza. Tale dibattito sarà meglio descritto nei paragrafi successivi. La corrente I_f risulta inoltre importante per la modulazione della frequenza cardiaca, in quanto risponde a stimolazione adrenergica e inibizione muscarinica (DiFrancesco2006, Barbuti2008).

Pompa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ e scambiatore $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$

Anche nelle cellule senoatriali sono presenti questi due meccanismi, in misura più che significativa. La pompa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ mantiene le caratteristiche descritte in precedenza ed il suo ruolo, generando una corrente netta uscente. Lo scambiatore $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ genera invece, come già detto, una corrente netta entrante, e per questo motivo gioca un ruolo importante in una delle due teorie di pacemaking che verranno descritte in seguito (teoria del *calcium clock*).

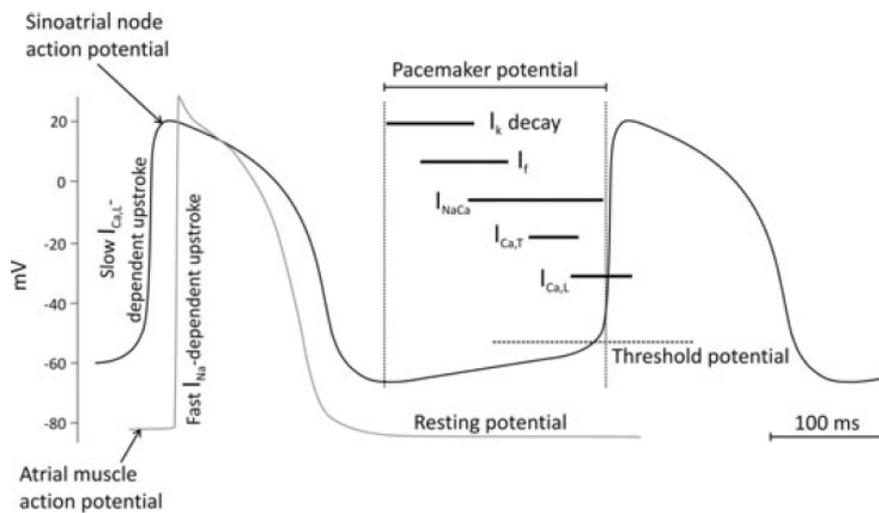


Figura 1.11: Potenziali d'azione sinoatriale (nero) ed atriale (grigio chiaro) a confronto. Le linee nere indicano i tempi dei contributi delle correnti ioniche alla depolarizzazione diastolica (Monfredi2010)

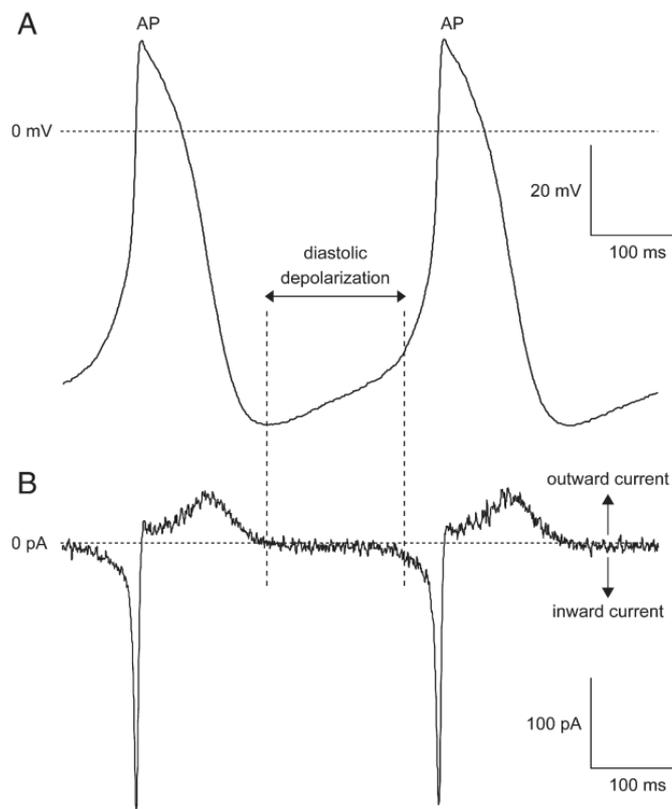


Figura 1.12: Potenziale d'azione relativo a cellule senoatriali di coniglio e corrispondente corrente netta totale che attraversa la membrana (Verkerk 2009)

È possibile osservare in figura 1.12 una traccia di potenziale d'azione senoatriale proveniente da cellule di coniglio (motivo per cui la frequenza basale è circa 3Hz, più alta di quella umana). La forma del potenziale è comunque di interesse: si può osservare una fase denominata "depolarizzazione diastolica" (DD) in cui a partire dal valore più negativo di potenziale ("massimo potenziale diastolico", o MDP) di circa -65/-60 mV si ha una lenta depolarizzazione fino a raggiungere i -30/-40 mV, valore per cui si attivano il CICR e i canali di calcio L-T. Il punto in cui si passa da DD ad upstroke vero e proprio è valutato in base al valore di derivata del potenziale, ovvero valutando la pendenza istantanea del tracciato. L'upstroke (meno ripido rispetto alle cellule atrio-ventricolari) porta molto velocemente il potenziale fino a circa +20 mV, ma in questo range di valori l'attivazione delle correnti di potassio scatena la ripolarizzazione, fino a tornare al valore iniziale di circa -60 mV. Qui un'azione combinata della corrente funny e dello scambiatore $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ produce una nuova depolarizzazione diastolica. Queste due correnti forniscono il loro contributo in fasi diverse della diastole, con la corrente I_f più attiva nella prima fase (EDD, *Early diastolic depolarization*) e lo scambiatore più attivo nella fase finale (LDD, *Late Diastolic Depolarization*). Va sottolineato che le cellule senoatriali sono in grado di scatenare il fenomeno del rilascio di calcio calcio-indotto in quanto possiedono un reticolo sarcoplasmatico, pur non avendo la contrazione come funzione primaria. L'attività del reticolo va quindi ad influenzare indirettamente quella dello scambiatore attraverso la modulazione della concentrazione di calcio intracellulare.

Le caratteristiche del potenziale d'azione senoatriale sono finora state descritte in modo generale in quanto è stata osservata in più di un caso una significativa eterogeneità nelle caratteristiche del tessuto in esame.

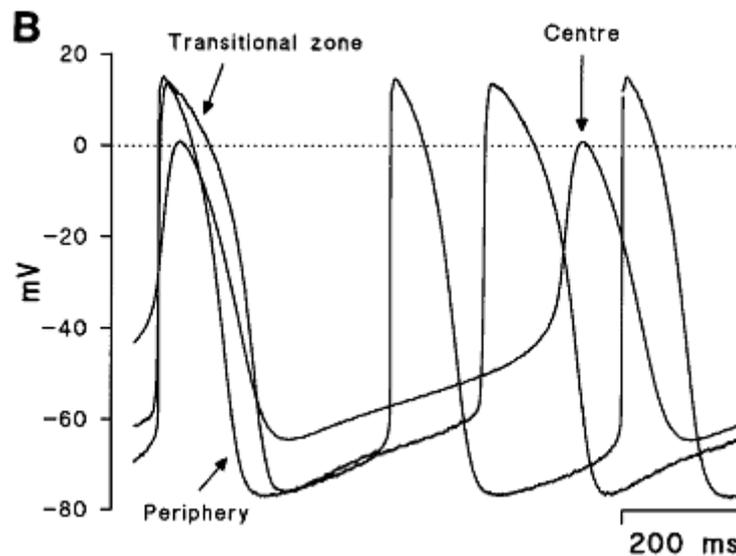


Figura 1.13: Potenziali d'azione di forma e durata diversa a seconda delle zone del nodo prese in esame (Boyett1999)

Una possibile causa della variazione dell'attività elettrica fra cellule del nodo senoatriale è la diversa densità di alcune delle principali correnti ioniche (I_{Na} , I_{to} , I_{Kr} , I_f): è presente un gradiente per cui muovendosi verso il centro del nodo l'intensità delle correnti diminuisce, con un conseguente rallentamento dell'upstroke (Boyett1999). Un'ulteriore fattore di eterogeneità è dato dal fatto che muovendosi verso l'esterno del nodo le cellule assumono caratteristiche sempre più simili a quelle del tessuto atriale circostante: un'ipotesi è quella per cui tale trasformazione è necessaria perché le cellule del nodo possano imporre la loro attività elettrica sulle cellule circostanti. Le caratteristiche in esame includono MDP sempre più negativo, correnti sempre più intense e valore crescente di capacità elettrica (Honjo1996). La capacità delle cellule è infatti solitamente correlata alle loro dimensioni, per cui un valore di 20-22 pF è tipico di cellule piccole e centrali, mentre 60-65 pF sono relativi a grandi cellule periferiche. Esistono quindi diversi fattori di eterogeneità per cui l'equilibrio locale dei meccanismi cellulari può spostarsi, senza

per questo modificare il comportamento globale del tessuto. L'eterogeneità del nodo senoatriale, ancora oggetto di indagini sperimentali, può allora fornire uno spunto interessante per ricollegare le teorie dei due oscillatori elettrici del SAN (*SinoAtrialNode*, nodo senoatriale) in un contesto più ampio di tessuto e non di singola cellula.

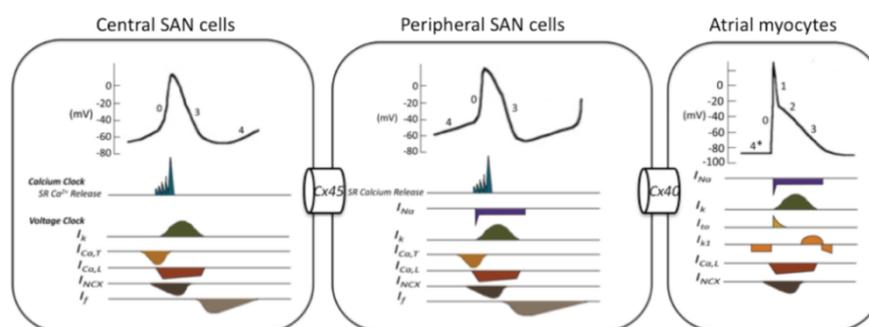


Figura 1.14: Le cellule senoatriali periferiche agiscono da intermediari fra le cellule del nodo del seno vere e proprie e le cellule atriali (Park2011)

1.5 – Membrane clock e calcium clock: teorie di pacemaking

La corrente I_f è stata oggetto di indagine in relazione al pacemaking sin dalla sua scoperta, sia in base alle sue caratteristiche particolari che alla sua presenza quasi esclusiva nei tessuti capaci di oscillazioni autoritmiche. Il tessuto senoatriale tende infatti ad esprimere in grande quantità i canali della famiglia HCN (*Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated*), in particolare l'isoforma HCN4 (DiFrancesco2010).

Il ruolo di I_f come principale causa della depolarizzazione diastolica è alla base della teoria definita come *Membrane clock*: secondo tale teoria l'oscillazione ritmica del potenziale di membrana è guidata in modo esclusivo dalle correnti generate dai canali sulla membrana stessa, senza contributi significativi da meccanismi di tipo

intracellulare (escludendo ovviamente l'alterazione temporanea delle concentrazioni ioniche). La modulazione di frequenza del SAN viene spiegata attraverso l'azione diretta dell'AMP ciclico sull'intensità di I_f , che quindi modifica la pendenza della depolarizzazione diastolica e porta ad un raggiungimento più o meno veloce del potenziale di soglia per l'upstroke.

Si è recentemente diffusa in letteratura scientifica l'idea che a guidare l'oscillazione elettrica del SAN possano essere non solo fenomeni di membrana ma anche meccanismi collegati alla gestione del calcio intracellulare (Lakatta2003, Maltsev2009). La teoria del *Calcium clock* sostiene che il reticolo sarcoplasmatico rilasci ritmicamente piccole quantità di calcio dai recettori RyR, in particolare durante la LDD. Dato che lo scambiatore $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ intensifica la sua attività quando la quantità di ione Ca^{2+} da rimuovere è maggiore e che la corrente associata I_{NCX} (o I_{NaCa}) è una corrente entrante (cioè negativa), questo corrisponde ad un effetto depolarizzante sul potenziale di membrana. Questo porterebbe al raggiungimento del potenziale di soglia per l'attivazione di I_{CaL} e I_{CaT} e all'inattivazione dei recettori RyR per via della quantità ancora maggiore di calcio intracellulare raggiunta (impedendo quindi un ulteriore rilascio spontaneo per un determinato intervallo di tempo, fino alla diastole successiva). Secondo questa teoria la modulazione di frequenza avviene attraverso un complesso meccanismo di mediatori citoplasmatici (figura 1.16).

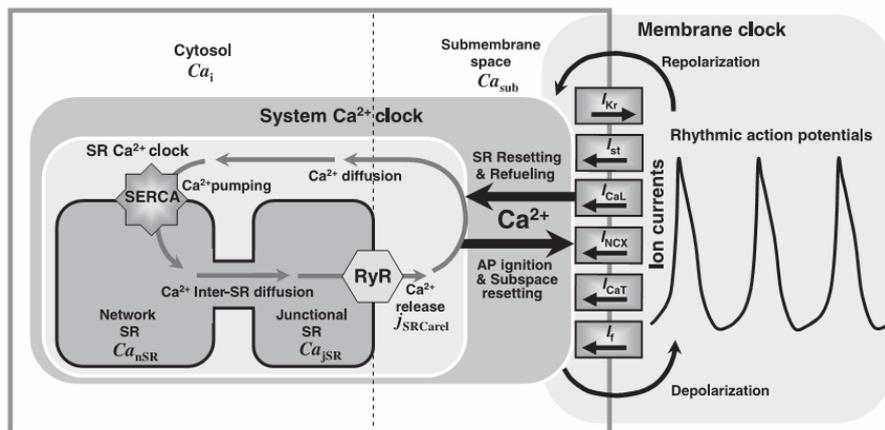


Figura 1.15: Membrane Clock, Calcium Clock e ciclo del calcio nelle cellule senoatriali (Maltsev2009)

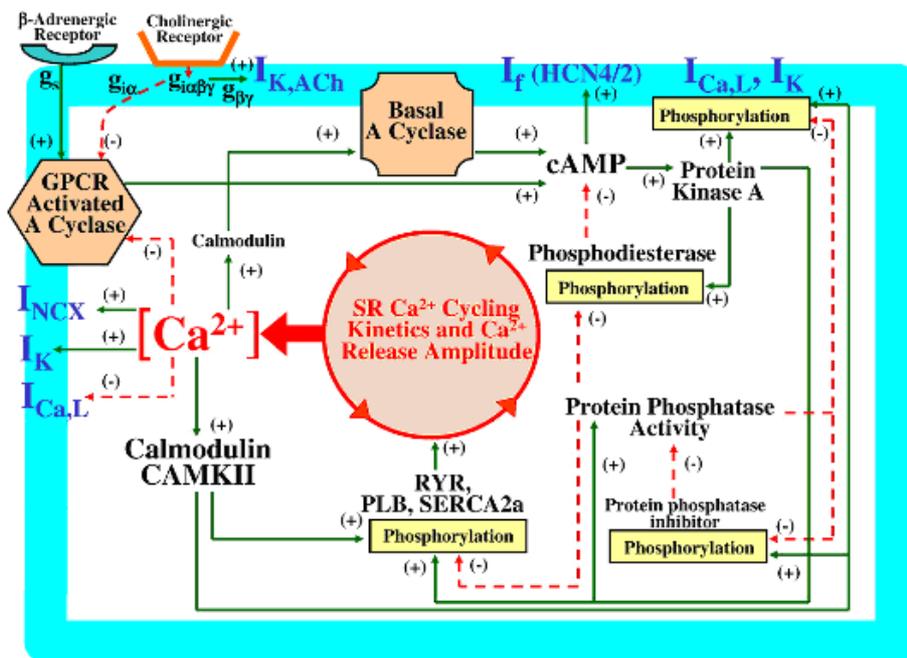


Figura 1.16: Meccanismi intracellulari di gestione del calcio nel SAN (Point/Counterpoint Lakatta-DiFrancesco2009)

1.6 – Valutazioni sull'importanza relativa dei meccanismi di clock

Il fenomeno della depolarizzazione diastolica era attribuito in origine alla progressiva riduzione in diastole di una corrente di potassio denominata I_{K2} : l'andamento di tale corrente a concentrazioni ioniche

non fisiologiche e altri indizi riguardanti il potenziale di inversione hanno portato all'abbandono di questa teoria e alla scoperta della corrente I_f . La sua presenza nei nodi senoatriale e atrio-ventricolare ha portato di conseguenza all'attribuzione del suo ruolo odierno nel pacemaking. Vengono di seguito elencati i principali punti a favore della teoria di *Membrane Clock* che attribuisce a I_f il ruolo più importante per la fase di DD:

- Le caratteristiche di I_f , in termini di ioni trasportati, potenziali di attivazione e comportamento dinamico sono estremamente adatte al ruolo di pacemaker primario e non possono essere presenti senza motivo nel tessuto senoatriale (DiFrancesco2011 P&CP)
- Le strutture molecolari HCN (in particolare l'isoforma HCN4, fortemente espressa nel SAN) sono necessarie nella costruzione dei canali funny e una loro ridotta attività, per via di bassa espressione o mutazioni, porta ad un rallentamento del pacemaking e alla bradicardia (Verkerk2009, Lakatta-DiFrancesco2010 P&CP)
- Il bloccante Ivabradina determina un rallentamento della frequenza dell'AP, ed esso agisce esattamente sui canali funny
- La molecola AMP-Ciclico può legarsi ai canali funny senza fosforilazione, ovvero in modo diretto e veloce. Dato che la concentrazione di AMP-C viene influenzata dall'attività dei recettori adrenergici e colinergici, I_f è soggetta a modulazione ortosimpatica e parasimpatica
- In figura 1.17 si può notare come in diastole la corrente netta totale entrante nella cellula sia di forma ed intensità paragonabile a I_f

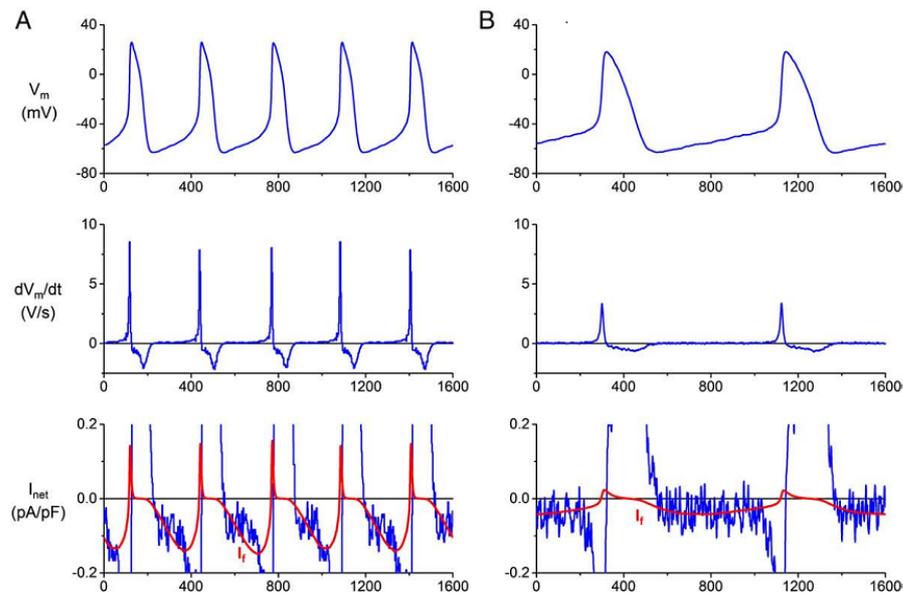


Figura 1.17: (A) Coniglio (B) Umano

- Top: potenziale d'azione
- Middle: derivata del potenziale d'azione
- Bottom: paragone fra I_f (rossa) e corrente netta totale (blu) in funzione del potenziale (Verkerk2010)

Le principali critiche rispetto a queste argomentazioni possono essere riassunte in questi termini:

- L'intensità di I_f è più ridotta nell'uomo rispetto al coniglio, specie utilizzata per la maggior parte delle prove sperimentali (Lakatta2010-Letter). Va però sottolineato che anche la frequenza basale è più bassa (1 Hz dell'uomo contro 3 Hz del coniglio) quindi è possibile che sia necessaria una corrente di entità minore durante la diastole (Verkerk2010, DiFrancesco2010-Letter)
- L'azione dell'AMP-Ciclico si fa sentire non solo sui canali funny, ma anche nel ciclo del calcio intracellulare, agendo quindi da possibile agente regolatore anche nella teoria del Calcium Clock
- Il blocco con Ivabradina agisce su I_f , ma rallenta la frequenza di pacemaking senza bloccare interamente le oscillazioni. Questo può essere spiegato con l'osservazione che il blocco dei canali funny

da parte dell'Ivabradina è parziale e dipende dal valore di potenziale di membrana (vedi figura 1.18) (Bucchi2002)

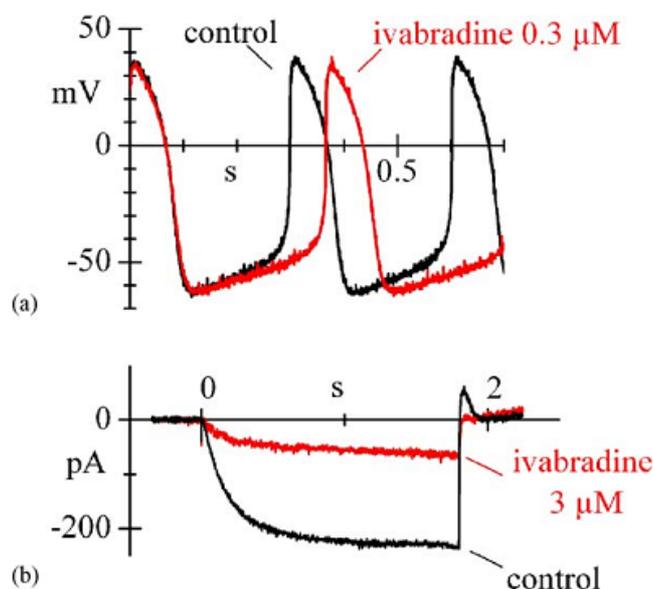


Figura 1.18: Effetti dell'ivabradina sul potenziale d'azione (a) e valore di I_f durante una prova di voltage-clamp (b) (DiFrancesco2006)

- Il range di potenziali a cui I_f si attiva in modo significativo è troppo negativo per essere raggiunto in condizioni fisiologiche nel SAN. Al riguardo esistono dati variabili in letteratura e diversi modelli matematici formulati con parametri differenti

Si possono riassumere tutte le critiche alla teoria del “puro” *Membrane Clock* con l'affermazione che il contributo della corrente funny al pacemaking non è indispensabile ma al più significativo, in quanto vari tipi di inibizione della corrente non portano ad alterazioni drastiche del comportamento della cellula. Il ciclo del calcio intracellulare alla base della teoria del *Calcium Clock* è importante per molti processi cellulari, ma la sua importanza per il fenomeno del pacemaking è un argomento dibattuto:

- La presenza di un reticolo sarcoplasmatico in cellule che non presentano come attività primaria la contrazione può essere indicativa di altri scopi, come ad esempio l'oscillazione autoritmica
- Secondo misure sperimentali il reticolo sarcoplasmatico rilascia spontaneamente piccole quantità di Ca^{2+} che aumentano l'attività dello scambiatore $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$
- Questa regolazione dell'attività di scambiatore può essere influenzata dai recettori beta-adrenergici e rispondere quindi a controllo ortosimpatico (tramite uno spostamento degli *spark* di calcio verso la fase iniziale della diastole)
- È stata rilevata oscillazione del livello di calcio intracellulare anche in assenza di depolarizzazione di membrana (Vinogradova2006)
- Il blocco dell'attività di scambiatore porta allo spegnimento del pacemaking (Bogdanov2001)

Anche riguardo a tale teoria sono state formulate una serie di obiezioni:

- Nonostante si possa definire una via per la modulazione ortosimpatica della frequenza del potenziale d'azione tramite il ciclo del calcio intracellulare, non si può fare lo stesso per la modulazione parasimpatica: un rilascio ritardato di calcio non spiega la variazione della pendenza del potenziale già presente nella fase iniziale della DD
- Data l'importanza dello scambiatore $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ per il funzionamento generale della cellula, l'interruzione del pacemaking derivante da un suo bloccaggio si può interpretare in vari modi (non necessariamente legati al *Calcium clock*)

- È stato recentemente dimostrato come un blocco dei transienti intracellulari di calcio, tramite BAPTA, lascia intatta la capacità di una cellula SAN di generare spontaneamente potenziali d'azione, senza gravi alterazioni dei parametri fondamentali come forma dell'AP e frequenza di lavoro (Himeno2011)

Concluso questo sintetico elenco di punti a favore e sfavore delle due teorie di pacemaking, si può affermare che indipendentemente dall'attribuzione di un ruolo predominante ad uno dei due clock, si tratta di due fenomeni strettamente accoppiati: i due oscillatori, interno ed esterno, agiscono alla stessa frequenza. Questo avviene sia per via della stretta influenza reciproca sia perché in caso contrario nei cardiomiociti atriali e ventricolari (che ereditano lo stesso reticolo sarcoplasmatico del SAN) non sarebbe possibile il fenomeno dell'accoppiamento eccitazione-contrazione.

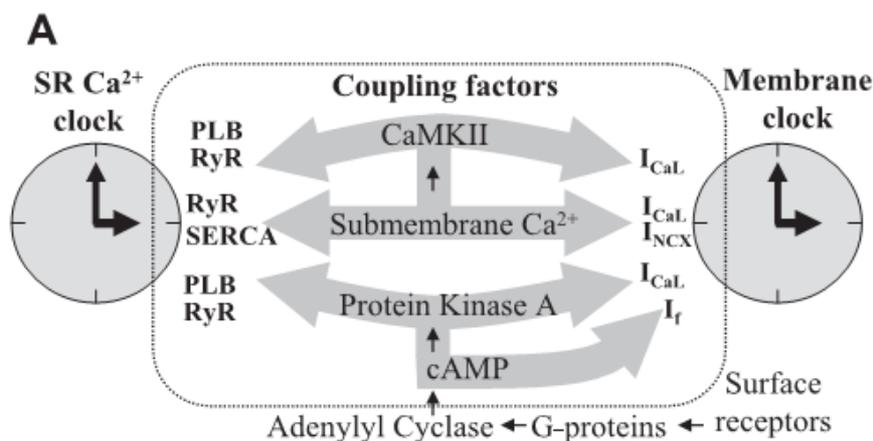


Figura 1.19: Le principali vie di interazione molecolare fra i due oscillatori cellulari proposti (Maltsev2009)

Va inoltre ricordato (come descritto nei paragrafi precedenti) che l'equilibrio locale fra l'intensità della corrente di scambiatore e l'intensità della corrente funny può spostarsi, raggiungendo punti di stabilità di natura diversa cellula per cellula. In figura 1.19 è possibile

osservare come diversi fattori molecolari permettano l'interazione e la sincronizzazione fra *Membrane Clock* e *Calcium Clock*: si può giungere allora ad ipotizzare che fasi diverse della depolarizzazione diastolica vengano scatenate e sostenute da meccanismi cellulari diversi.

CAPITOLO 2

STRUMENTI DI INDAGINE ELETTROFISIOLOGICA E DYNAMIC CLAMP

Introduzione

Nella prima parte del capitolo vengono descritti brevemente la nascita dell'elettrofisiologia e i primi esperimenti svolti, per poi passare alle tecniche di indagine elettrofisiologica oggi più comunemente in uso. Si introducono di seguito gli elementi più importanti della modellistica cardiaca moderna, la storia dei modelli senoatriali e i principali strumenti informatici di supporto alla modellistica. Si conclude il capitolo descrivendo il principio generale della tecnica di dynamic clamp, che si basa per il proprio funzionamento sulla creazione di una connessione elettrica fra la cellula in esame e un modello al calcolatore.

2.1 – Storia degli esperimenti di elettrofisiologia

L'elettrofisiologia è la disciplina scientifica che si occupa dello studio delle proprietà elettriche di cellule e tessuti biologici. Si può far risalire la sua nascita al 1660, quando lo scienziato olandese Jan Swammerdam per primo si accorge che la stimolazione nervosa di un preparato neuromuscolare di rana (ovvero una striscia muscolare con relativo nervo ancora collegato) è in grado di provocare la contrazione del muscolo. Nonostante la scoperta di Swammerdam, fu necessario aspettare fino al 1791 perché Isaac Newton affermasse con più forza l'idea di una propagazione di tipo elettrico del segnale nervoso. Nello stesso periodo Luigi Galvani pubblicò il suo lavoro, frutto di anni di

esperimenti da lui svolti su animali con l'aiuto della moglie e del nipote.

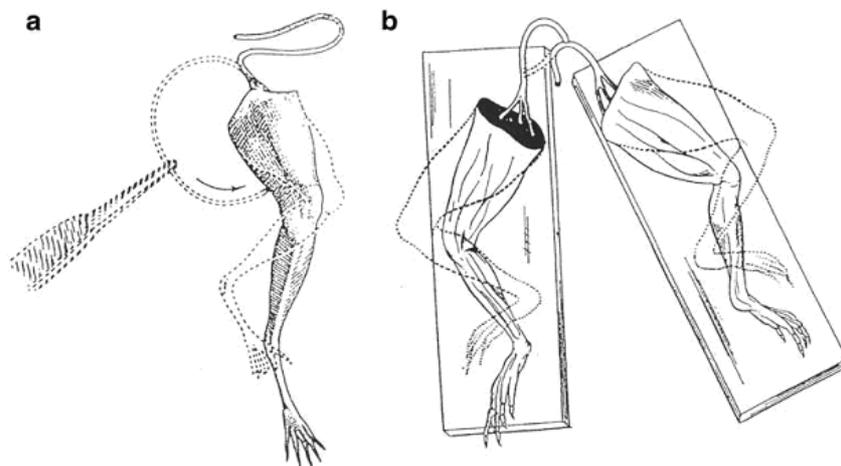


Figura 2.1: Preparati neuromuscolari di zampe di rana utilizzati da Galvani nei suoi esperimenti (Verkhatsky et al., 2006)

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

attività elettrica: si può quindi far risalire a loro la nascita della disciplina della modellistica elettrofisiologica. Le informazioni contenute in questo paragrafo sono basate sull'articolo di Verkhratsky et al. (2006), a cui si rimanda per ulteriori approfondimenti.

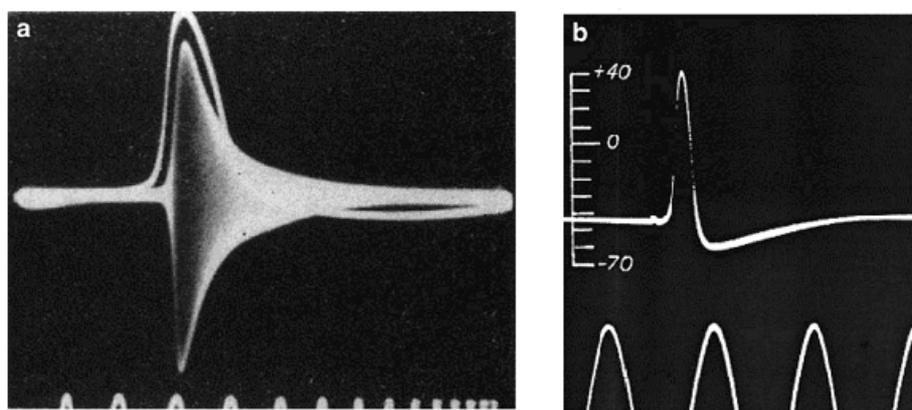


Figura 2.2: Misure d'impedenza (a) e potenziale d'azione (b) in assone di calamaro gigante (Verkhratsky et al., 2006)

2.2 – Tecniche di clamp: voltage clamp, current clamp, AP clamp

In seguito alla scoperta delle proprietà elettriche delle cellule, è stato necessario sviluppare strumentazione e protocolli adatti per lo studio delle correnti che attraversano le membrane biologiche tramite i canali ionici. Attualmente, le tecniche più diffuse sono quelle denominate *Voltage Clamp* e *Current Clamp*, con la recente introduzione della tecnica di *AP Clamp* e di quella di *Dynamic Clamp* (quest'ultima oggetto del presente lavoro). Il principio alla base di tutte le tecniche elencate è quello di sottoporre la cellula in esame ad una specifica evoluzione temporale del potenziale di membrana o della corrente iniettata nella cellula. La prima operazione da svolgere è quella di stabilire un collegamento elettrico fra la strumentazione e il materiale biologico: viene utilizzata per questo scopo una micropipetta di vetro al cui interno sono posti un elettrodo e una soluzione ionica con

concentrazioni simili a quelle dei liquidi intra o extracellulare a seconda dell'esperimento da svolgere. Come si può osservare in figura 2.3, a questo punto la pipetta viene posta sulla membrana cellulare (tramite un sistema di micromanipolazione) e si applica una leggera suzione per farne aderire i bordi. Si forma in questo modo il cosiddetto *Giga-Seal*, ovvero se l'operazione viene svolta correttamente l'aderenza della pipetta alla membrana è sufficientemente alta da poterla schematizzare a livello elettrico con una resistenza di valore molto elevato, nell'ordine dei GigaOhm.

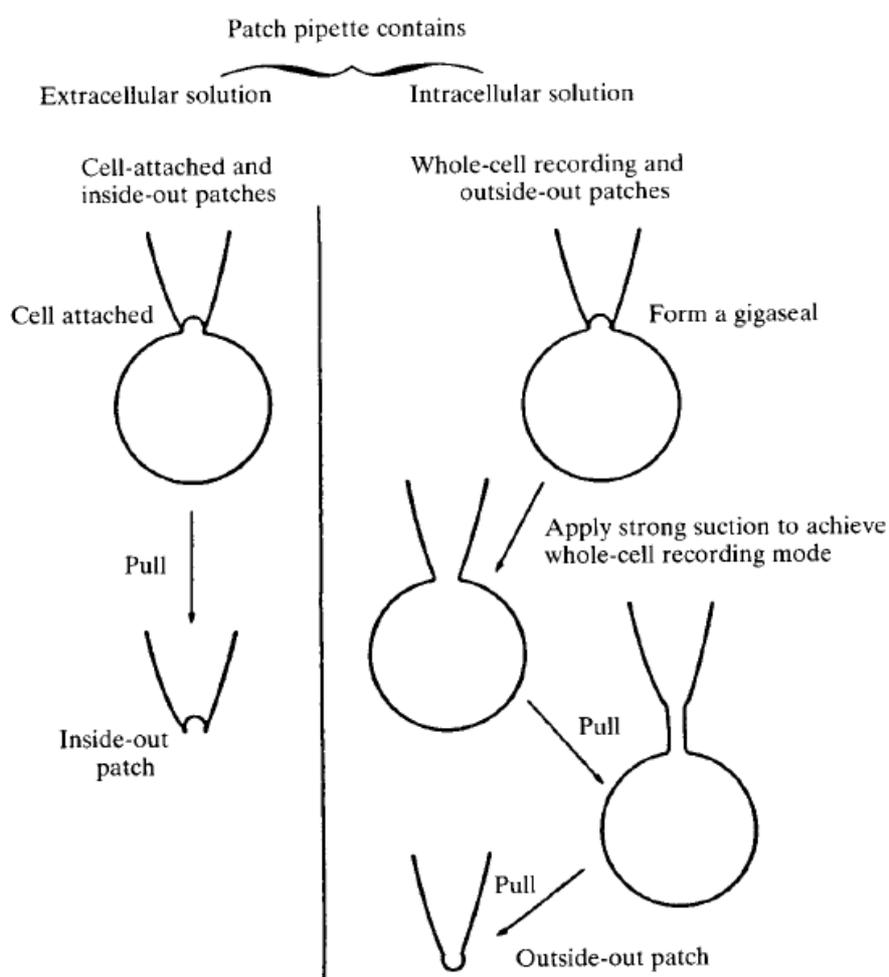


Figura 2.3: Diverse configurazioni per il patch-clamp (Ogden)

A questo punto è possibile procedere in modi diversi nella manipolazione a seconda della necessità di studiare il comportamento dell'intera cellula (*Whole Cell* sempre in figura 2.3) o di una piccola parte di membrana (*Inside-Out Patch* o *Outside-Out Patch*). Raggiunta una configurazione stabile, si può procedere con il protocollo scelto. Verranno ora brevemente descritti i protocolli classici. Nel caso del Voltage Clamp si impone al potenziale di membrana un andamento specifico, ad esempio un gradino di potenziale ripetuto più volte a partire dallo stesso valore iniziale (*Holding Potential*) per raggiungere valori di regime diversi (*Test Potential*), e poi tornare al valore originale. Durante questo tipo di esperimento viene tenuta traccia del potenziale comandato e della corrente che scorre attraverso la membrana in seguito alla sua applicazione.

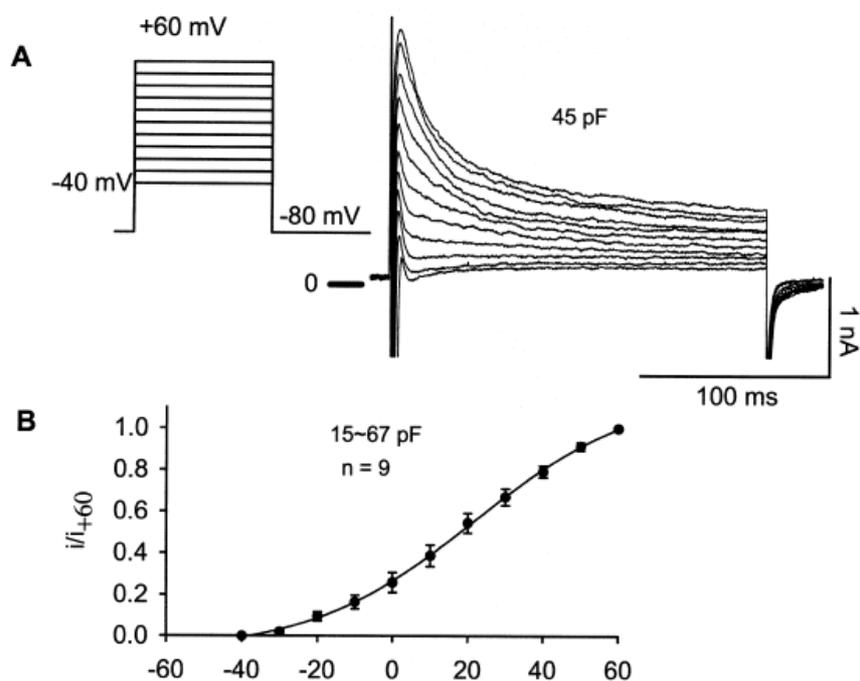


Figura 2.4: (A) Applicazione di gradini di potenziale tramite voltage clamp e relativi tracciati di corrente registrata (B) Rapporto corrente/tensione normalizzato rispetto al massimo valore di corrente raggiunto (Lei2000)

Si costruisce poi un grafico come quello in figura 2.4b, in cui ogni valore di potenziale viene messo in relazione con il relativo valore di regime raggiunto dalla corrente. Questo protocollo può essere ripetuto prima e dopo la somministrazione di bloccanti chimici per studiare l'effetto di tali sostanze tramite le differenze nei tracciati di corrente. In figura 2.5 è mostrato un possibile circuito di voltage clamp, assieme ad una schematizzazione della micropipetta e al circuito equivalente della cellula. Il gradino di potenziale viene applicato tramite V_{comm} , mentre V_{out} fornisce in uscita un potenziale proporzionale alla corrente che viene fatta scorrere. In tale circuito l'amplificatore con la resistenza di feedback, R_f , agisce da convertitore corrente-tensione per alterare il potenziale di membrana in base a quanto richiesto dal segnale d'ingresso.

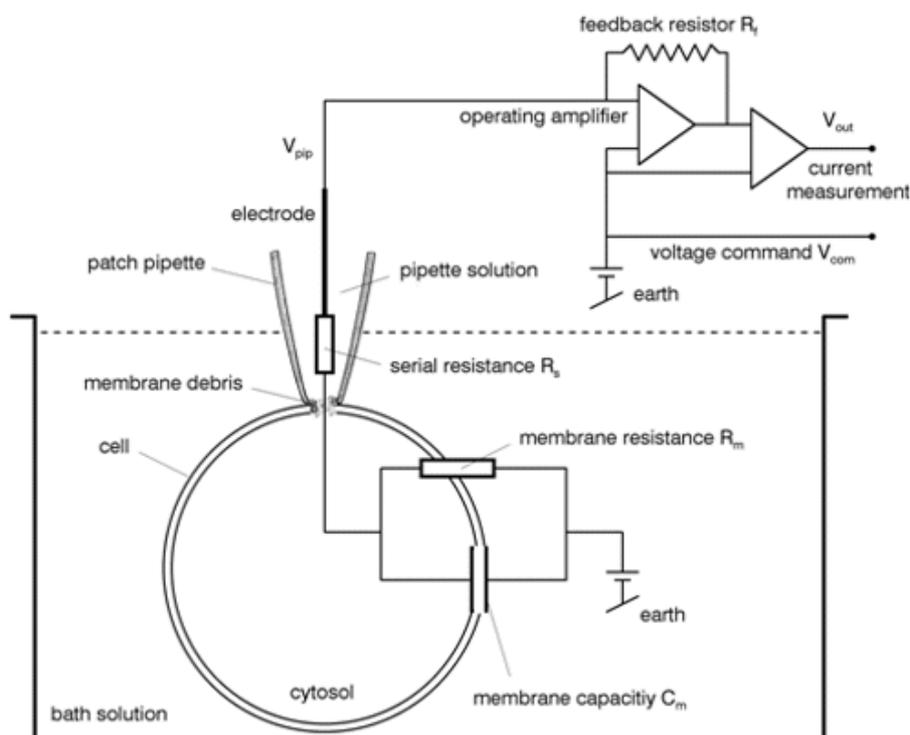


Figura 2.5: Whole cell voltage clamp: circuito di clamp, collegamento con la cellula tramite micropipetta, e circuito equivalente delle membrana (<http://patch-clamp.info/techniques/techniques.htm>)

Nel caso del protocollo di Current Clamp viene invece stimolata la cellula tramite l'iniezione di un treno di impulsi di corrente e viene registrato il potenziale di membrana. Negli articoli in letteratura viene solitamente omessa la forma dello stimolo di corrente, trattandosi di una serie di impulsi rettangolari standard, mentre vengono invece indicati ampiezza dello stimolo, frequenza e duty cycle (solitamente molto basso) come ad esempio in figura 2.6.

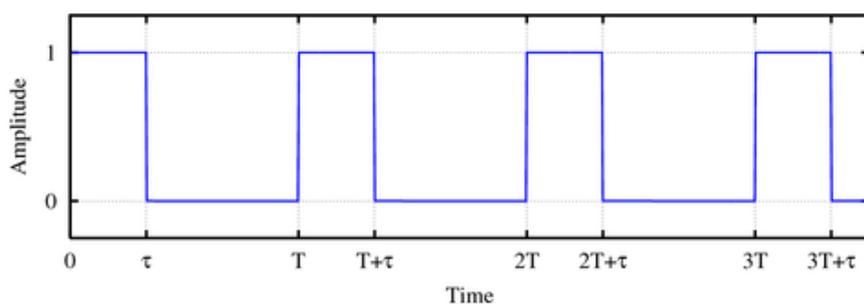


Figura 2.6: Sequenza di impulsi di forma rettangolare
(http://it.wikipedia.org/wiki/Duty_cycle)

In figura 2.7 è riportato un possibile schema elettrico per un circuito di current clamp, in cui l'ingresso V_{cmd} controlla l'iniezione nella cellula di una corrente di intensità V_{cmd} / R_0 , e l'uscita V_p fornisce traccia del potenziale di membrana.

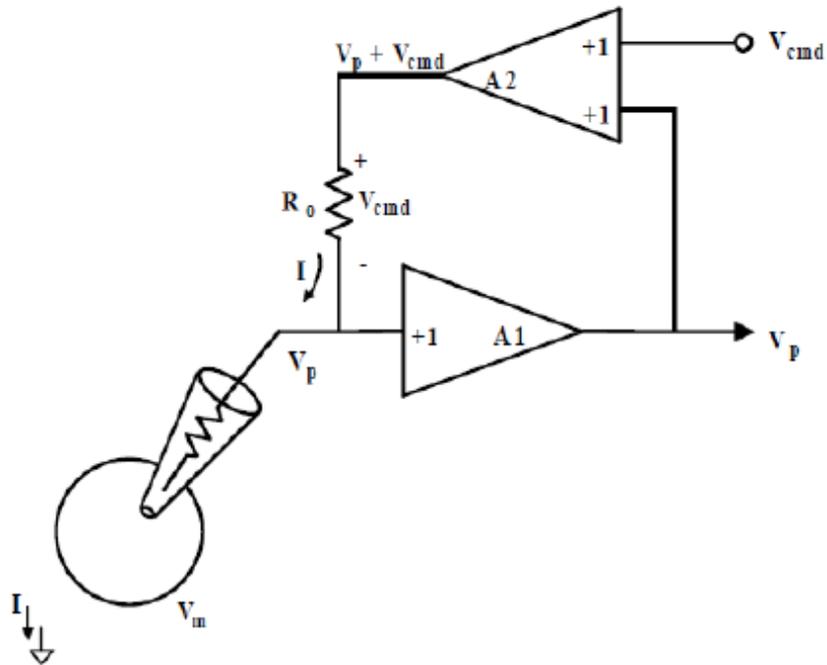


Figura 2.7: Schema circuitale per current clamp (manuale amplificatori Axon)

L'ultimo protocollo a cui si è fatto riferimento, indicato con il nome di *Action Potential Clamp* (o "AP Clamp") può essere invece classificato come una variante del Voltage Clamp nella quale il potenziale di comando fissato tramite strumentazione non è più un gradino standardizzato ma un potenziale d'azione preregistrato dalla cellula stessa in condizioni basali. Questo tipo di protocollo viene utilizzato per registrare e confrontare i tracciati di corrente totale di membrana prima e dopo l'applicazione di un bloccante: la possibilità di osservare l'andamento della corrente in parallelo ad un comportamento fisiologico del potenziale di membrana è un'opportunità in più di ottenere informazioni dettagliate. Si può osservare un'esempio di AP-Clamp in figura 2.8.

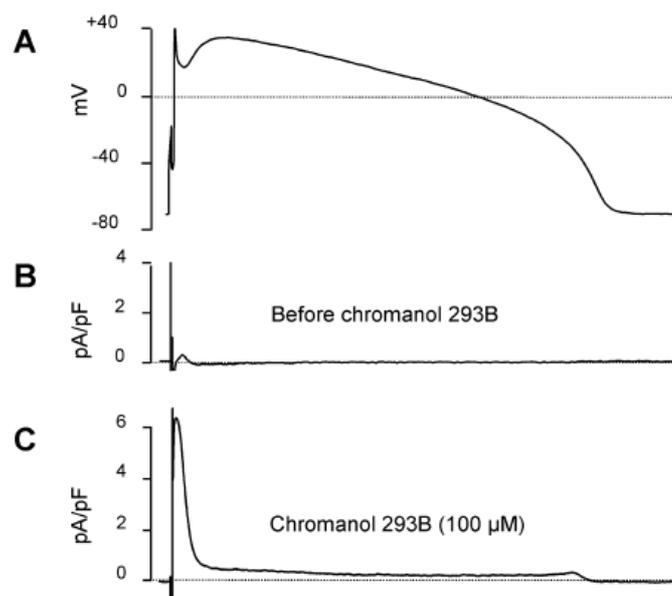


Figura 2.8: Potenziale di comando applicato ad un cardiomiocita ventricolare canino, registrato dalla cellula stessa (A), corrente registrata in condizioni basali (B), corrente registrata dopo l'applicazione di un bloccante (C) (Viràg2011)

Lo svolgimento di un esperimento di clamp in modalità whole-cell può causare un inconveniente: essendo il volume interno della micropipetta molto più grande del volume intracellulare di alcune delle cellule sotto esame, la formazione del giga-seal con conseguente creazione di un foro nella membrana cellulare porta alla rapida diluizione del liquido intracellulare. La fuoriuscita di ioni altera in questo modo i valori delle concentrazioni intracellulari e di conseguenza i potenziali di equilibrio, compromettendo il funzionamento fisiologico della cellula. Si può ovviare a questo problema tramite la tecnica definita *Perforated patch-clamp*, applicabile ai protocolli descritti in precedenza. Tale tecnica consiste semplicemente nell'aggiunta alla soluzione contenuta nella pipetta di una sostanza capace di creare pori nella membrana cellulare senza per questo distruggerla completamente (le più comuni sono nystatina e anfotericina). La creazione di questi pori permette quindi il normale funzionamento del clamp impedendo (o perlomeno rallentando sensibilmente) la fuoriuscita del materiale intracellulare (figura 2.9).

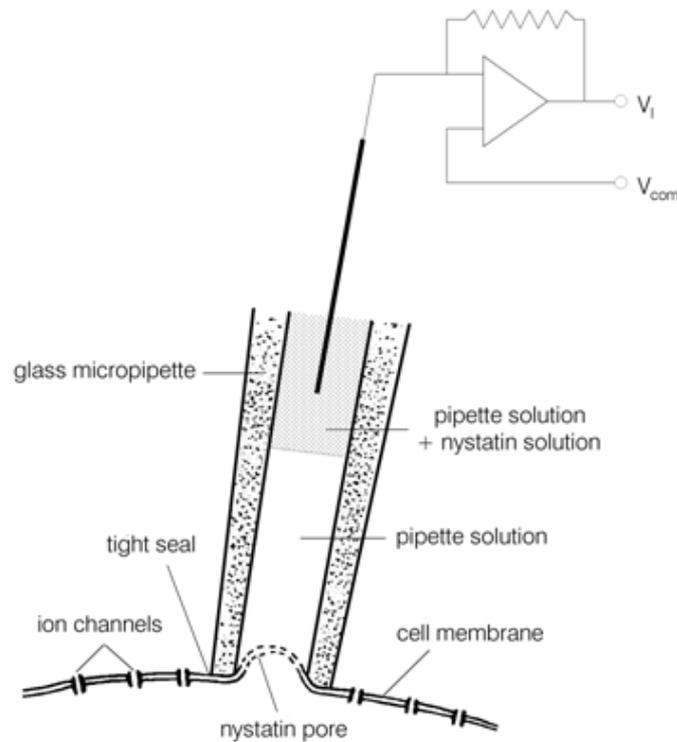


Figura 2.9: Applicazione della tecnica Perforated patch tramite nystatina. Nell'immagine specifica viene rappresentato uno schema circuitale di voltage clamp ma è possibile utilizzare anche il current clamp. (<http://patch-clamp.info/techniques/techniques.htm>)

2.3 – La modellistica cardiaca

Le tecniche descritte nel paragrafo precedente permettono di ottenere dati che, oltre ad essere interpretati in modo diretto, possono essere utilizzati per la costruzione o modifica di un modello matematico del sistema di interesse (in questo caso specifico, il canale ionico oggetto di studio oppure l'intera cellula). La branca dell'elettrofisiologia ben si presta a questo scopo in quanto i fenomeni di tipo elettrico sono già stati trattati con formalismo matematico in altre discipline (fisica, ingegneria): si pensi ad esempio agli schemi circuitali tipici dell'elettrotecnica. Sviluppando un modello si giunge quindi ad una

serie di risultati che sono frutto di due fattori diversi: uno è la nostra conoscenza oggettiva di ciò che stiamo rappresentando, l'altro è l'insieme delle scelte fatte dallo sviluppatore in corso d'opera (formalismi adottati, approssimazioni, fonti dei dati, ecc.). Confrontando quindi il comportamento del modello sviluppato con i dati sperimentali non è soltanto necessario chiedersi se è sbagliata l'ipotesi di lavoro ma anche se sono state fatte le giuste scelte durante il processo di formalizzazione del fenomeno fisico in esame. In caso di risultati coerenti possiamo aspettarci di aver raggiunto una descrizione del fenomeno corretta e sufficientemente astratta, in caso contrario si ottiene comunque un risultato di grande importanza: la possibilità di guidare lo sviluppo di nuovi esperimenti e di modifiche al modello in modo metodico (in alternativa a semplici tentativi) concentrandosi sulle aree di interesse in cui dati e modello divergono sensibilmente. I primi a svolgere una quantità sensibile di lavoro modellistico in elettrofisiologia (dando origine ad una delle formulazioni più usate anche in ambito moderno) furono Hodgkin e Huxley negli anni '50. Come già accennato in precedenza, Hodgkin e Huxley lavorarono su assoni di calamaro gigante compiendo i primi esperimenti di patch-clamp: essi intuirono la presenza di correnti ioniche di Na^+ e K^+ (che sarebbe stata confermata sperimentalmente solo più avanti) e ipotizzarono l'esistenza dei canali ionici. Essendo la membrana cellulare di natura fosfolipidica (quindi elettricamente isolante) e circondata sui due lati da particelle cariche, l'idea avuta dai due scienziati di rappresentarla come una capacità elettrica si rivelò corretta:

$$C_m \cdot \frac{dV_m}{dt} = I_{tot}$$

C_m rappresenta la capacità elettrica della cellula (solitamente espressa in sottomultipli del Farad, ad esempio pF, e correlata al volume totale

della cellula), V_m rappresenta il potenziale ai capi della membrana e I_{tot} la somma algebrica delle correnti entranti e uscenti che scorrono attraverso la membrana. In figura 2.10 è possibile osservare una rappresentazione corrispondente alla formula riportata. Hodgkin e Huxley diedero una formalizzazione riconducibile all'elettrotecnica (in particolare alla legge di Ohm) anche per le singole correnti di membrana. Per ogni corrente si ha:

$$I_{ion} = x \cdot g_{max} \cdot (V - E_{ion})$$

Il termine $(V - E_{ion})$ è denominato *Driving Force* e rappresenta la forza elettromotrice data dalla differenza fra potenziale di membrana V e potenziale d'equilibrio dello ione E_{ion} . Se la corrente è data dal flusso di più ioni, E_{ion} è calcolato con la formula di Goldman (riportata in capitolo 1, paragrafo 1.2). G_{max} (espresso in Siemens o suoi sottomultipli) è detto conduttanza massima, ed è indice del valore massimo di intensità raggiungibile dalla corrente per via di una popolazione di canali più o meno numerosa.

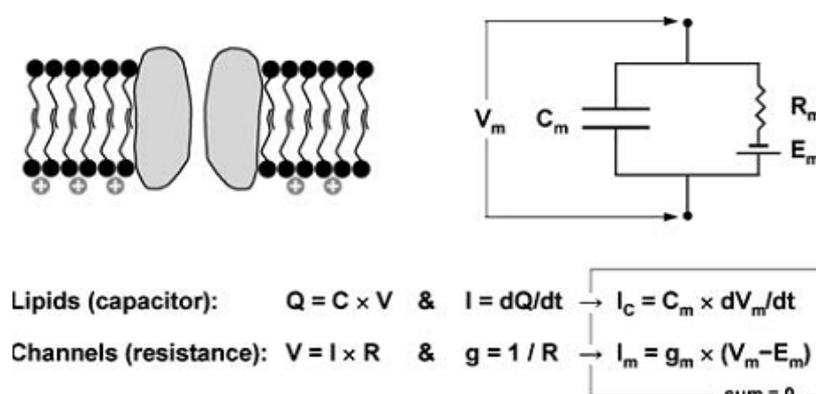


Figura 2.10: Rappresentazione di un canale ionico e schema elettrico equivalente (Wilders2007)

Il termine X indica una “variabile di gating”, ovvero un numero puro (quindi adimensionale) che può assumere valori compresi fra 0 e 1 in quanto rappresenta la frazione di canali di un certo tipo aperti in un dato istante. Se quindi ad esempio X assume valore 0.5, significa che il 50% dei canali di una popolazione sono totalmente aperti (o con un’interpretazione probabilistica alternativa, che tutti i canali permettono in quel momento il 50% del flusso massimo possibile di ioni). Va specificato che può essere presente il prodotto di più di una variabile di gating, ognuna a sua volta elevata a potenza. In figura 2.11 è rappresentato l’analogo elettrico che Hodgkin e Huxley hanno proposto in base a questa formulazione di corrente.

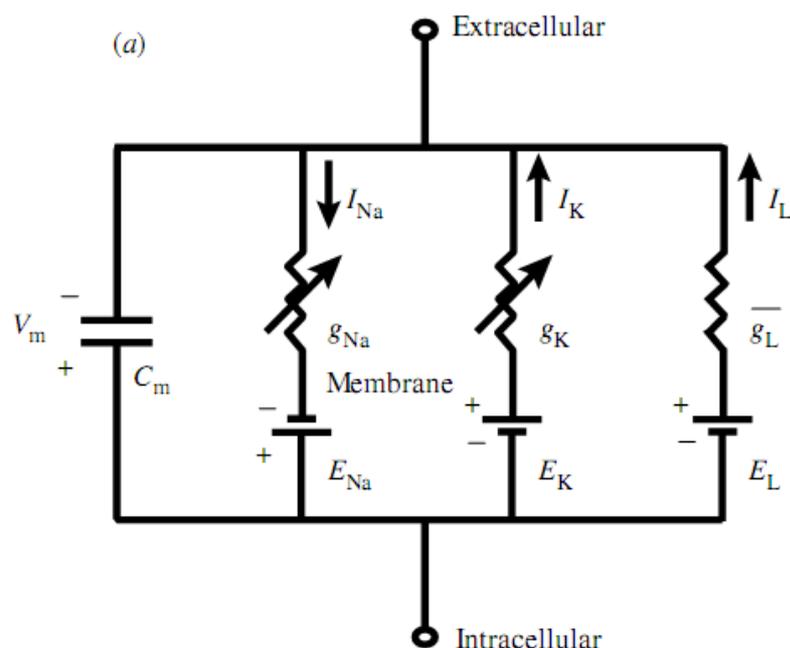


Figura 2.11: Schema circuitale equivalente per l’assone di calamaro gigante, secondo la formulazione Hodgkin-Huxley (Rudy2006)

Le variabili di gating hanno un valore che si evolve nel tempo in base al potenziale di membrana (ed eventualmente alle concentrazioni

ioniche). Vengono quindi descritte tramite equazioni differenziali, del tipo:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{(x_{\infty} - x)}{\tau_x}$$

in cui X_{∞} rappresenta il valore di *steady-state*, ovvero il valore stabile che verrebbe raggiunto dopo un tempo proporzionale alla costante di tempo τ_x se il sistema fosse mantenuto in condizioni inalterate. Per stimare i valori di X_{∞} e τ_x vengono applicate ai risultati degli esperimenti di clamp delle procedure di *fitting*, ovvero si definiscono delle espressioni matematiche (ad esempio una sigmoide per lo *steady-state* e una gaussiana per la costante di tempo) e al calcolatore vengono determinati i coefficienti che permettono una migliore somiglianza con i dati sperimentali. Una formulazione alternativa per il gating (più utilizzata in passato) si basa sulla definizione di due coefficienti α e β :

$$\frac{dx}{dt} = \alpha \cdot (1 - x) + \beta \cdot x$$

Ci si può ricondurre alla formulazione precedentemente descritta ponendo:

$$x_{\infty} = \frac{\alpha}{\alpha + \beta} \quad \tau_x = \frac{1}{\alpha + \beta}$$

I coefficienti α e β rappresentano i ratei cinetici di transizione fra gli stati di apertura e chiusura del canale, e sono calcolati con dipendenza dal potenziale di membrana. L'utilizzo più esteso dei ratei cinetici di transizione fra gli stati è anche alla base di un nuovo tipo di

formulazione che si è recentemente diffusa in modellistica, la formulazione Markoviana. In un modello Markoviano vengono definiti una serie di possibili stati probabilistici per il canale ionico, collegati in modo più o meno definito agli stati fisici che il canale può assumere (ad esempio aperto, chiuso, inattivo). I valori numerici delle variabili di stato assumeranno sempre valore compreso fra 0 e 1 e la loro somma totale sarà unitaria (perché il canale deve sempre trovarsi in uno dei possibili stati). I ratei cinetici di transizione fra gli stati vengono anche in questo caso inseriti nelle equazioni differenziali. Ad esempio per il modello a 4 stati contenuto in figura 2.12b corrisponderanno le seguenti equazioni (Rudy2006):

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

Il valore dello stato O (Open, aperto) viene poi utilizzato per moltiplicare la driving force e la conduttanza massima nell'equazione della corrente di canale.

Il processo completo di studio delle correnti ioniche, costituito da esperimenti di clamp, formulazione delle equazioni, fitting dei dati e simulazione al calcolatore è riassunto dallo schema in figura 2.13.

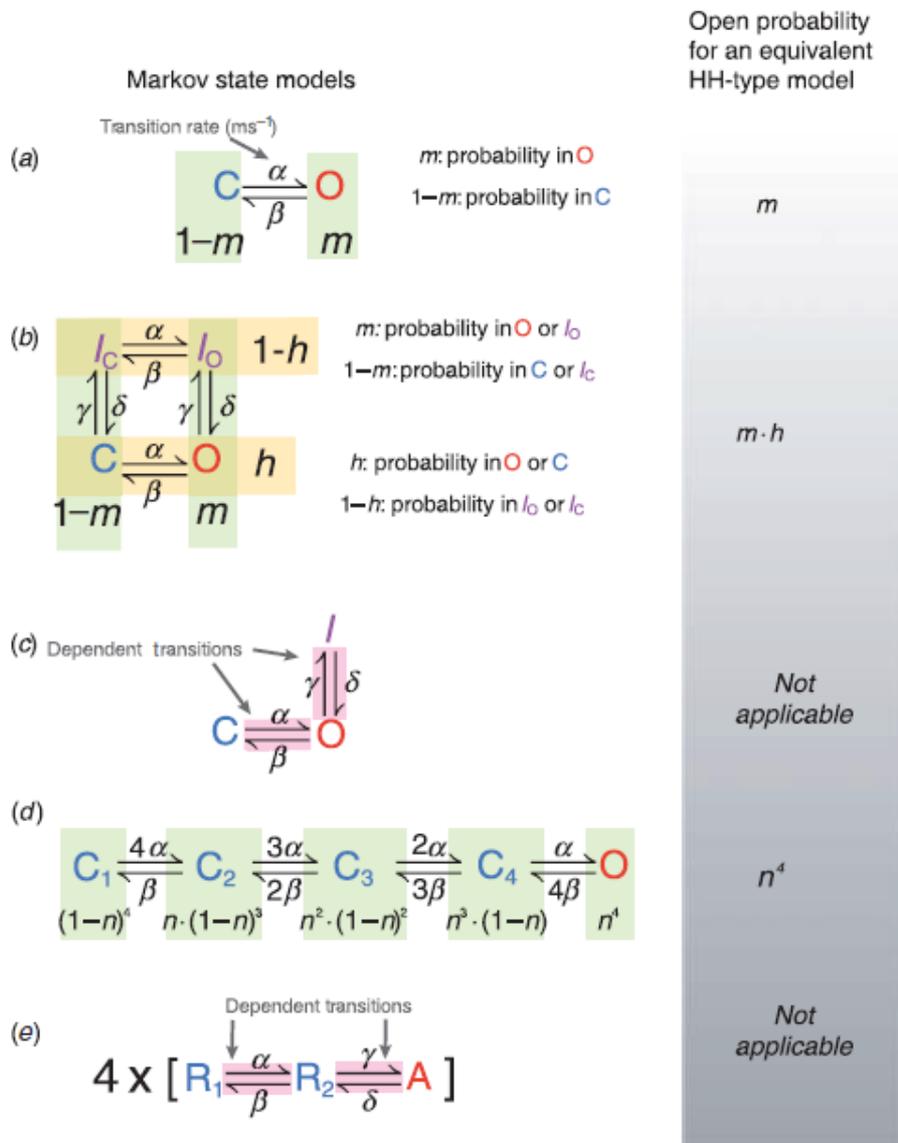


Figura 2.12: Esempi di formulazione Markoviana e, sulla destra, possibile equivalenza con formulazione classica Hodgkin-Huxley (Rudy2006)

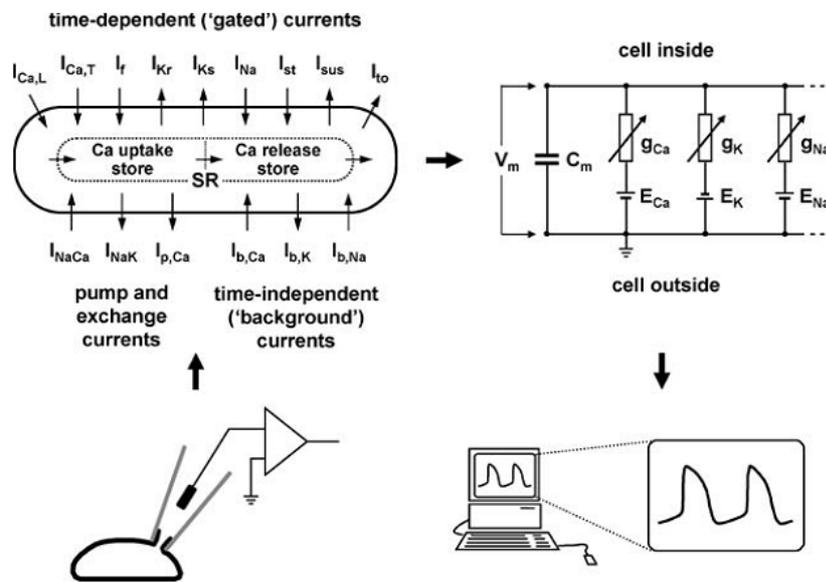


Figura 2.13: Paradigma moderno di acquisizione di dati tramite tecniche di clamp, modellizzazione e simulazione al calcolatore (Wilders2007)

In seguito al lavoro su assoni di Hodgkin e Huxley non fu necessario attendere molto per vedere le prime applicazioni in campo cardiaco delle loro scoperte: nel 1962 Noble sviluppò uno dei primi modelli veramente significativi di cellula cardiaca (nello specifico, cellula del Purkinje). Il modello venne poi aggiornato negli anni seguenti in base a dati sperimentali più precisi, ad esempio da McAllister nel 1970 e da DiFrancesco (assieme allo stesso Noble) nel 1985. In seguito alla creazione di questi modelli cominciarono a diffondersene anche altri, di tipo atriale e ventricolare (es. modello di cellula ventricolare umana, sviluppato da Beeler e Reuter nel 1977). Si trattava in ogni caso di modelli molto semplici, comprensivi di poche correnti ioniche e variabili di stato. Se da un lato questo era dovuto alla scarsa potenza di calcolo disponibile in quei decenni (si pensi che Hodgkin e Huxley dovettero addirittura svolgere i loro calcoli a mano) d'altra parte le equazioni utilizzate erano di natura molto generica. Dagli anni '80 in poi la maggiore disponibilità di risorse computazionali e di dati

sperimentali più dettagliati permisero un progressivo incremento nella complessità dei modelli. Fu anche possibile passare da concentrazioni ioniche intracellulari costanti (tipiche dei modelli definiti di prima generazione) a concentrazioni calcolate dinamicamente in base a equazioni differenziali di bilancio delle quantità (modelli di seconda generazione). L'approccio a concentrazioni costanti è ancora oggi importante in fase di sviluppo del modello per osservare il comportamento delle correnti simulate in condizioni fisiologiche. In questo periodo cominciarono anche ad essere inclusi in alcuni modelli i primi compartimenti intracellulari come il reticolo sarcoplasmatico, e di conseguenza il sistema di gestione del calcio intracellulare. L'inclusione di questo sistema divenne poi pratica comune, si pensi ad esempio al modello DiFrancesco-Noble del 1985 (già citato sopra) o alle varie versioni del modello Luo-Rudy degli anni '90.

Table 1 Early ionic models of mammalian cardiac cells (1960–1988)

Model	Parent model
Purkinje fibre models	
Noble	–
McAllister et al.	Noble
DiFrancesco and Noble	McAllister et al.
Ventricular cell models	
Beeler and Reuter	McAllister et al.
Drouhard and Roberge	Beeler and Reuter
Atrial cell models	
Hilgemann and Noble	DiFrancesco and Noble
Sinoatrial cell models (rabbit)	
Yanagihara et al.	–
Irisawa and Noma	Yanagihara et al.
Bristow and Clark	McAllister et al.
Noble and Noble	DiFrancesco and Noble

Figura 2.14: Modelli cardiaci sviluppati fra gli anni '60 e '80 (Wilders2007)

Da questo punto in poi la storia dei modelli cardiaci prosegue con lo sviluppo di versioni sempre più complesse (e con un numero sempre più alto di variabili di stato), una sempre maggiore importanza per la dinamica del calcio, e la diffusione di nuovi paradigmi come la modellazione Markoviana o la simulazione di intere strisce di tessuto cardiaco.

Entrando nel merito specifico della modellazione del SAN, il primo tentativo al riguardo fu svolto da Yanagihara nel 1980, basandosi su dati relativi a cellule di coniglio. Nel tempo il coniglio divenne la specie più utilizzata per ottenere dati sul nodo senoatriale, infatti molti dei modelli attuali sono modelli di cellula cardiaca di *rabbit*: questo si può notare subito dalla frequenza basale di circa 3 Hz delle oscillazioni del potenziale (nel caso umano si avrebbero circa 1.2 Hz). Successivamente al lavoro di Yanagihara fu proposto un altro modello da Bristow e Clark, che nel 1982 riadattarono il modello di cellula del Purkinje di McAllister e Noble. Questo modello verrà poi a sua volta aggiornato in seguito alla scoperta della corrente I_f , che va a sostituire la corrente di potassio I_{K2} (la cui esistenza era soltanto un'ipotesi di lavoro). Da notare che data la natura dei preparati utilizzati negli esperimenti, i modelli a cui si è finora fatto riferimento rappresentano il comportamento di aggregati multicellulari: Irisawa e Noma svilupparono sempre negli anni '80 un modello in cui indicavano la quantità di cellule nel preparato nell'ordine di circa un centinaio. È interessante osservare come i modelli Bristow-Clark e Irisawa-Noma, seppur accomunati da un andamento del potenziale d'azione molto simile, presentavano un comportamento piuttosto diverso in termini di correnti ioniche: segno del fatto che lo stesso comportamento del modello può essere spiegato con equilibri dinamici diversi. I due modelli erano anche stati sviluppati con approcci diversi, in un caso cercando di intuire e implementare l'andamento delle correnti

necessario per ottenere la forma desiderata del potenziale e nell'altro caso con un'implementazione basata il più possibile su dati sperimentali. Il modello del 1985 di DiFrancesco e Noble fu poi utilizzato come base per lo sviluppo di due modelli senoatriali (il Noble-Noble del 1984 e il Noble-DiFrancesco-Denyer del 1989): tali modelli includevano il reticolo sarcoplasmatico e la corrente di scambiatore $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$. Il Noble-DiFrancesco-Denyer fu anche il primo modello a rappresentare una singola cellula, attraverso la riduzione di un fattore 100 di tutte le correnti ioniche. L'accumulo di nuovi dati sperimentali portò negli anni '90 allo sviluppo dei modelli di Wilders (nel 1991), di Demir e di Dokos. Questi ultimi due, basati sulle equazioni di Noble-DiFrancesco, introdussero alcune novità: nel modello di Demir furono incorporati il buffering intracellulare di calcio ed una pompa di calcio per il sarcolemma, mentre nel modello di Dokos fu eliminata la corrente di background di calcio utilizzata in alcuni dei modelli precedenti. Sia Demir che Dokos introdussero inoltre una corrente di potassio modulata dalla concentrazione di acetilcolina. Dopo i lavori di Wilders, Dokos e Demir negli anni '90, lo sviluppo dei modelli senoatriali è proseguito con un aumento generale di accuratezza (grazie ai più precisi dati sperimentali disponibili) e con un'attenzione particolare ad una migliore rappresentazione delle correnti preesistenti: sono state introdotte formulazioni separate per le componenti lente e veloci delle correnti di potassio e sodio (sebbene come già detto I_{Na} sia presente in modo ridotto nel SAN). È stato inoltre indagato recentemente il complesso tema della presenza di differenze regionali fra cellule provenienti dalla zona periferica o centrale del nodo senoatriale. Queste differenze possono essere prese in considerazione ad esempio rapportando l'intensità delle correnti alla capacità elettrica della cellula (come già detto, correlata al volume), o gestendo la presenza/assenza di correnti come I_{Na} . Fra i modelli più recenti si ricordano quello di Zhang (Zhang2000) che

implementa la possibilità di scalare automaticamente i parametri scegliendo se la cellula da simulare è centrale o periferica (tale modello implementa purtroppo concentrazioni ioniche fisse) e il modello di Kurata (Kurata2002) che si ritiene essere uno dei più validi ed aggiornati, essendo utilizzato negli articoli più recenti come base di partenza per analisi modellistiche. Tale modello non presenta correnti come I_{K1} e I_{Na} , considerandole trascurabili in quanto estremamente ridotte nel SAN. Altri due modelli senoatriali molto recenti sono il modello Maltsev-Lakatta (Maltsev2009) e il modello Severi-Fantini-Charawi-DiFrancesco (Severi2012). Il Maltsev-Lakatta viene proposto dagli autori come supporto alla teoria del Calcium Clock (descritta nel capitolo precedente) mentre nel modello Severi la tematica del pacemaking viene studiata anche attraverso una revisione delle formulazioni delle correnti di membrana preesistenti in base ad un set il più ampio e robusto possibile di dati sperimentali. Per un approfondimento sulla storia della modellistica senoatriale e sulla modellistica cardiaca in generale, si rimanda a due ottimi articoli di review scritti da Wilders (Wilders2007) e da Rudy (Rudy2006).

Dal punto di vista computazionale, l'aumento esponenziale della potenza di calcolo degli elaboratori ha permesso di testare le equazioni sviluppate con una rapidità sempre crescente, fino al punto per cui al giorno d'oggi è possibile (a seconda degli strumenti informatici utilizzati) implementare un modello nell'arco di pochi giorni e visualizzare i risultati delle simulazioni quasi istantaneamente. Si può affermare che lo sviluppo in questo senso della modellistica è stato aiutato anche dallo sviluppo dell'analisi numerica, in quanto le simulazioni su elaboratori sono per loro natura digitali e sviluppate tramite *step* discreti.

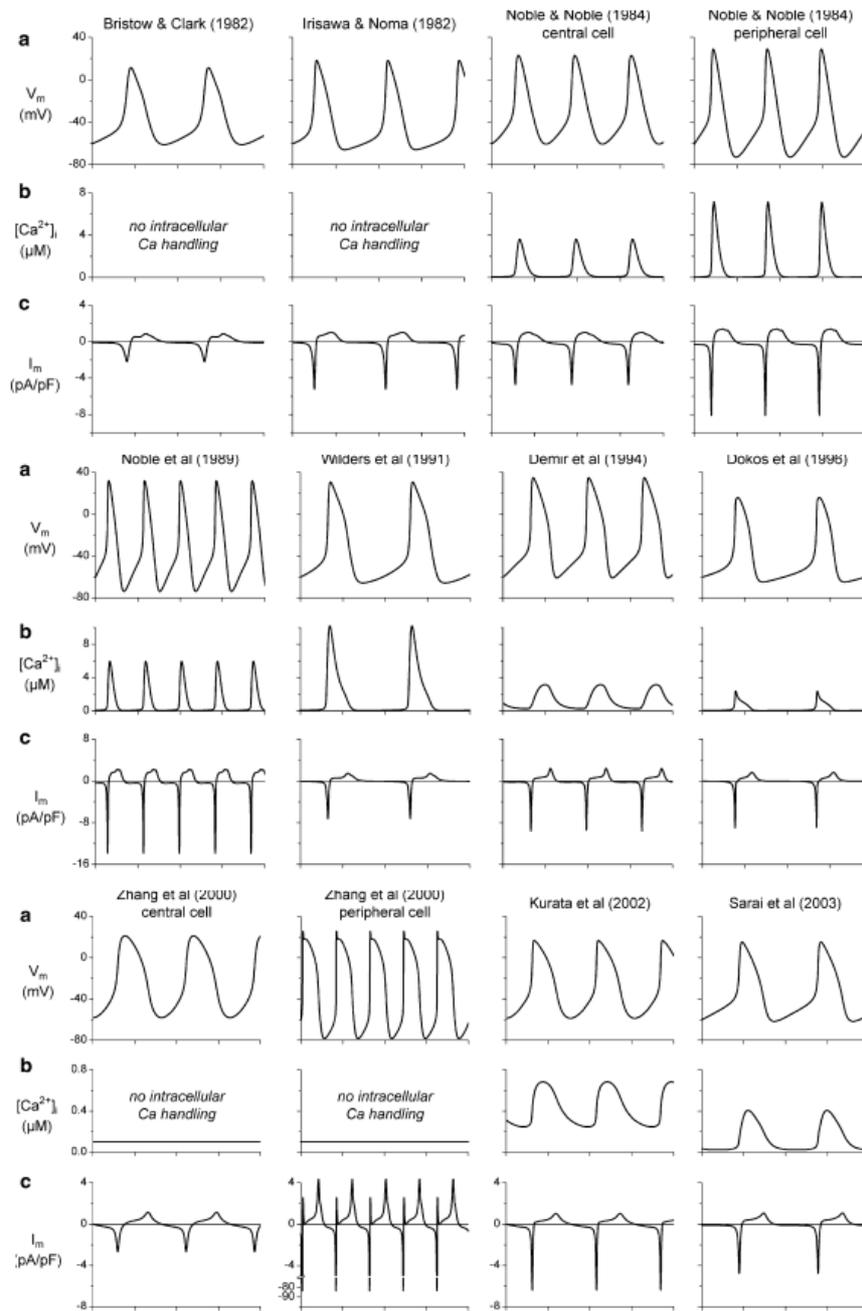


Figura 2.15: Comparazione grafica fra alcuni dei modelli citati in termini di (a) potenziale di membrana (b) livello di calcio intracellulare (c) corrente totale di membrana (Wilders2007)

Solitamente la pubblicazione in letteratura di un articolo di modellistica è accompagnata (nell'articolo stesso o in forma di supplemento) da un elenco comprensivo di tutte le equazioni del

modello, dei parametri e delle relative unità di misura. Data la possibilità di errori viene spesso reso accessibile anche il codice sorgente del modello: la sua natura sarà però dipendente dal tipo di linguaggio utilizzato dallo sviluppatore. Al momento le scelte più comuni in termini di linguaggi includono C++, Java, Visual Basic, Delphi e Matlab. Data la varietà di linguaggi a disposizione, si è cercato nel tempo di sviluppare uno standard in grado di uniformare almeno la parte della simulazione relativa alla descrizione matematica del modello. Da questo sforzo è nato il progetto CellML, un formato basato su XML per creare file manipolabili da diversi simulatori ma inclusivi di tutte le equazioni e relazioni significative di un modello. Le specifiche della struttura sintattica di CellML sono state rilasciate per la prima volta nel 2001 dai ricercatori che lo hanno sviluppato e successivamente in forma aggiornata nel 2006. A seconda del software utilizzato per lavorare sui file CellML è possibile creare nuovi modelli in modo gradevole per l'utente, visualizzare l'andamento delle simulazioni o creare codice macchina per programmi eseguibili. Si ricordano fra i più famosi: JSim, COR, AGOS, CESE, PCENV ed OpenCell. Da notare che essendo il codice XML prolisso per la lettura e manipolazione da parte di utenti umani, alcuni di questi software consentono anche la creazione e modifica dei modelli in modalità alternative alla semplice scrittura. Per il presente lavoro si è scelto l'utilizzo del software COR (Cellular Open Resource) sviluppato da Alan Garny nel 2003. In figura 2.16 è riportata una tipica schermata di lavoro di COR durante una simulazione. È possibile visualizzare i tracciati relativi alle variabili di stato e alle correnti calcolate, oltre che ai valori dei parametri. Fra una simulazione e l'altra è anche possibile alterare i valori di tali parametri o i valori iniziali delle variabili di stato. Sono inoltre a discrezione dell'utente la scelta del passo di integrazione e dell'algoritmo numerico utilizzato per la risoluzione delle equazioni differenziali (a

partire da una lista). Per maggiori informazioni su CellML e COR si consiglia di visitare i siti web <http://www.cellml.org/> e <http://cor.physiol.ox.ac.uk>.

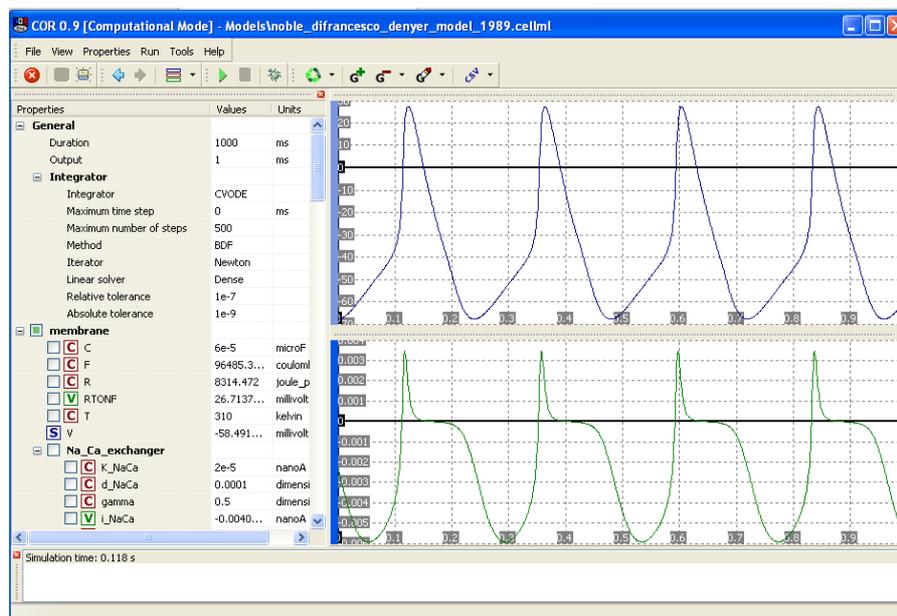


Figura 2.16 Simulazione dell'andamento di alcune variabili di stato di un modello su software COR

2.4 – La tecnica del dynamic clamp

Quando si parla di dynamic clamp ci si riferisce in realtà ad una collezione di tecniche strettamente collegate fra di loro, che presentano la caratteristica comune di permettere lo svolgimento di esperimenti in cui la cellula in esame viene sottoposta ad un protocollo che si evolve dinamicamente nel tempo, a differenza delle tecniche classiche in cui il blocco del potenziale o l'iniezione di corrente sono di forma predeterminata e costante.

Sebbene la nascita di questo concetto sia spesso attribuita a studi di neurofisiologia, il primo a sviluppare una forma di dynamic clamp fu

Scott, nel 1979, per studiare la sincronizzazione fra cellule ventricolari: in figura 2.17 è riportato uno schema del suo “Ersatz Nexus”, in grado di iniettare corrente in ognuno dei due cluster di cellule ventricolari simulando la presenza di una gap junction fra le due cellule (l'intensità di tale corrente viene calcolata in base al valore di conduttanza del collegamento elettrico e ai valori di potenziale misurati nei due cluster, secondo la formula $I = G * (V1-V2)$). Il valore di conduttanza del collegamento artificiale può essere variato tramite il circuito elettronico per studiare l'effetto di un accoppiamento elettrico più o meno pronunciato fra le cellule. Circa una decina di anni dopo il lavoro di Scott, venne sviluppato un circuito simile da Joyner (Tan&Joyner1990, Joyner1991, Tan1991): come si può osservare in figura 2.18, tale circuito di *analog coupling clamp* permette l'accoppiamento elettrico fra cellule cardiache tramite un valore di conduttanza imposto artificialmente. I valori dei potenziali di membrana delle due cellule vengono registrati da due amplificatori, per poi essere forniti come ingresso differenziale ad altri due amplificatori che agiscono da convertitori tensione-corrente. La corrente calcolata viene poi iniettata nel cardiomiocita di destinazione in modalità di current clamp. In questo caso l'entità della conduttanza intercellulare G_C viene variata agendo sul guadagno del convertitore tensione-corrente.

Poco tempo dopo l'introduzione del dynamic clamp nell'ambito dell'elettrofisiologia cardiaca, tecniche simili furono sviluppate in ambito neurofisiologico da Sharp (Sharp1992, Sharp1993a,b) e Robinson&Kawai (1993). È proprio con Sharp che nasce il termine generale di *dynamic clamp*, in alternativa al più specifico *coupling clamp* utilizzato fino a quel momento.

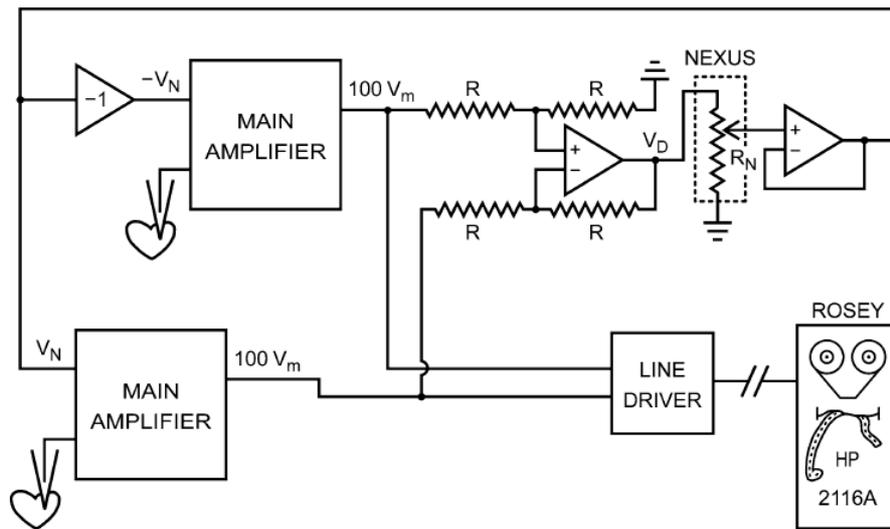


Figura 2.17: Schema del circuito usato da Scott nel 1979 per studiare la sincronizzazione di piccoli cluster di cellule ventricolari (Wilders2006)

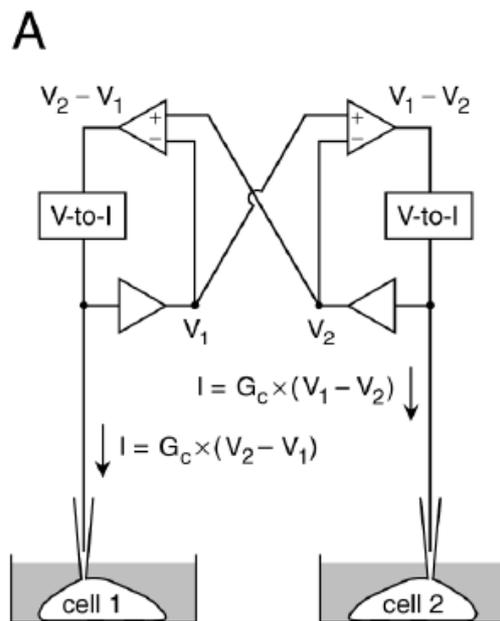


Figura 2.18: Analog coupling clamp: collegamento elettrico di cellule tramite conduttanza di valore G_c imposto dal circuito (Wilders2001)

Le tre configurazioni di dynamic clamp più utilizzate attualmente in elettrofisiologia cardiaca sono rappresentate in figura 2.19 (da notare il passaggio dalla circuiteria analogica alla gestione digitale delle connessioni elettriche tramite calcolatore):

- Nella modalità di *Digital coupling clamp* (figura 2.19a) vengono acquisiti i valori di potenziale di membrana da due cardiomiociti collegati tramite amplificatori patch-clamp in modalità di current clamp. Il calcolatore determina tramite un valore preimpostato di conduttanza (modificabile via software) l'intensità della corrente da iniettare in ognuna delle due cellule: in questo caso specifico la simulazione di una gap junction implica l'iniezione di due correnti di stessa intensità e segno opposto. Si tratta quindi della versione moderna del coupling clamp analogico descritto in precedenza, con il vantaggio della possibilità di gestire via software parametri e registrazione dei dati.
- Nella modalità di *model clamp* (figura 2.19b) un cardiomiocita viene collegato in modalità di current clamp, però rispetto al caso precedente la seconda cellula viene sostituita da un modello al calcolatore: si va in questo modo a simulare la presenza di una corrente ionica aggiuntiva sulla membrana cellulare. Come si può osservare nella figura l'intensità della corrente da iniettare viene calcolata in tempo reale in base al potenziale di membrana della cellula reale e in base all'evoluzione delle equazioni differenziali che regolano il modello (siano essere riferite a variabili di gating o ad un modello markoviano). La configurazione di model clamp può anche essere utilizzata con un modello descrittivo del funzionamento di un'intera cellula: in tal caso la configurazione diventa una sorta di coupling clamp fra cellula reale e simulata, e la corrente iniettata nella cellula reale è quella di gap junction.

- L'innovativa tecnica di *dynamic action potential clamp* (figura 2.19c) permette lo studio di una singola corrente ionica in un contesto più fisiologico di quelli tradizionali. Se ad esempio si vuole studiare l'alterazione di una corrente per colpa di una mutazione del canale ionico associato, si può bloccare farmacologicamente la corrente fisiologica in un cardiomiocita ed esprimere il mutante in una cellula HEK-293. A questo punto le due cellule possono essere sottoposte rispettivamente a current clamp e voltage clamp come rappresentato in figura 2.19c: l'effetto ottenuto è quello di sottoporre i canali ionici mutanti nella cellula HEK al potenziale di membrana del cardiomiocita, e di iniettare la corrente mutante registrata dalla cellula HEK nel cardiomiocita. In questo modo si ottiene il vantaggio di un sistema il cui la corrente mutante è elettricamente presente nella membrana del cardiomiocita (come se fosse espressa all'interno di tale cellula al posto della corrente fisiologica) con la possibilità di registrare esclusivamente l'intensità di tale corrente durante il passaggio sul calcolatore. In questo modo inoltre la corrente viene studiata durante un potenziale d'azione a cui essa stessa ha modo di contribuire.

Le modalità finora descritte si basano sulla possibilità di mantenere intatte per tutta la durata dell'esperimento le funzionalità di base delle cellule utilizzate: per fare questo è necessario applicare nystatina o anfotericina all'interno della micropipetta di patch per effettuare un clamp di tipo perforated-patch (descritto nei paragrafi precedenti). Emerge proprio in questo senso la più grande limitazione del dynamic clamp: sebbene possa essere mimato l'effetto elettrico della corrente ionica simulata dal sistema, non può essere riprodotto l'effetto che tale corrente ha sulle concentrazioni ioniche intracellulari.

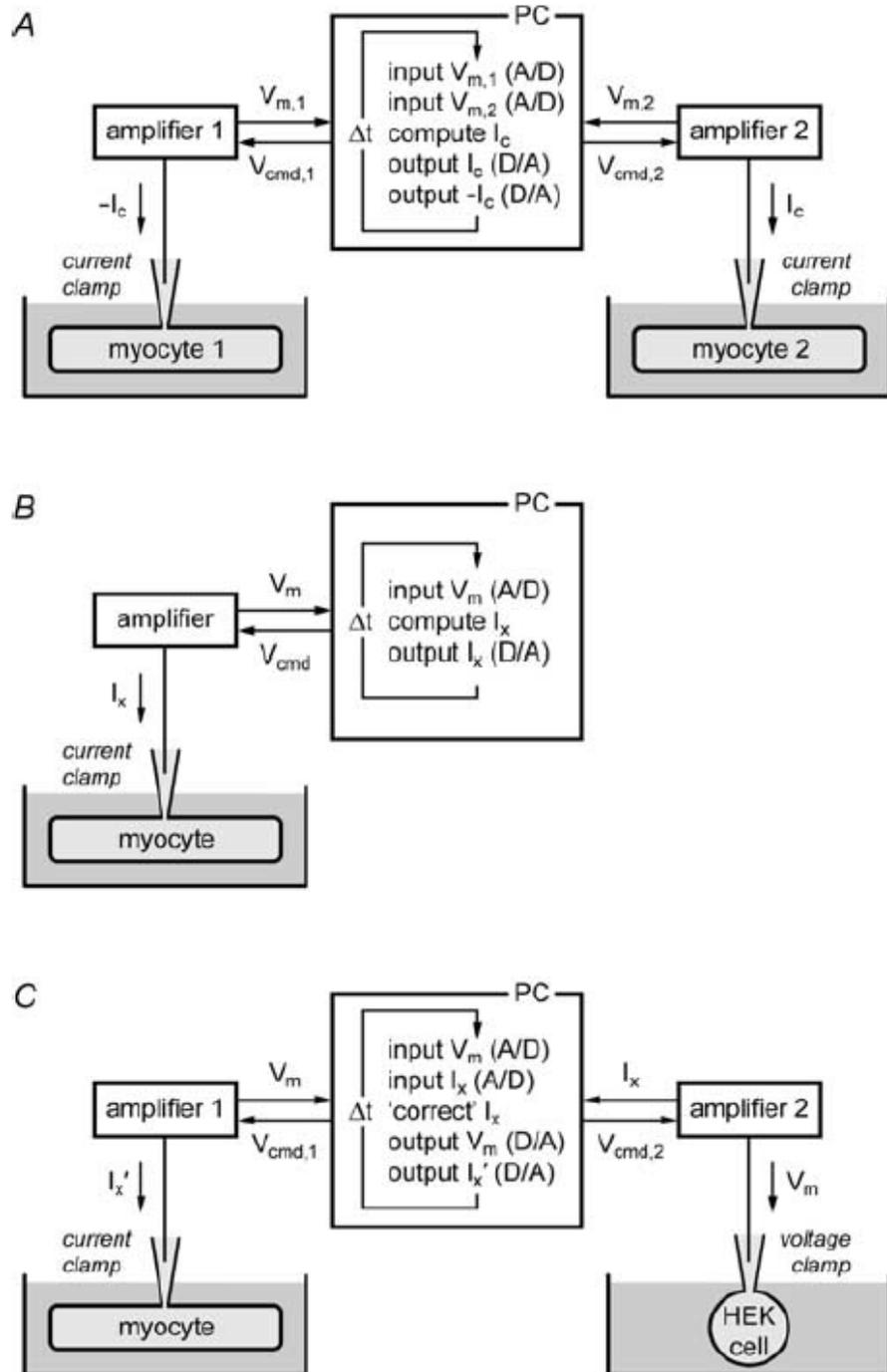


Figura 2.19: Evoluzione digitale del dynamic clamp: digital coupling clamp (A), model clamp (B) e dynamic action potential clamp (Wilders2006)

Esistono inoltre una serie di aspetti pratici da valutare prima dell'implementazione di un sistema di dynamic clamp. Anche se si tratta più di criticità che di vere e proprie limitazioni, vanno comunque considerati per sviluppare il sistema migliore o scegliere la piattaforma preesistente più consona all'esperimento da svolgere:

- Velocità del sistema: i sistemi definiti come *real-time* sono caratterizzati dalla garanzia che tutte le operazioni da svolgere vengono completate entro uno specifico intervallo di tempo. Nel caso in esame questo significa che acquisizione del valore di potenziale di membrana, integrazione numerica del nuovo valore di corrente da iniettare e sua applicazione al sistema di current clamp avverranno con una frequenza minima garantita. Per ottenere un comportamento stabile del sistema è allora necessario assicurarsi che il cosiddetto *update rate* sia molto più veloce del più veloce fenomeno fisico da simulare all'interno del modello. Per fare un esempio, nei capitoli precedenti si è accennato al fatto che la corrente I_{Na} presenta un'attivazione molto veloce. Se si volesse quindi iniettare correttamente una corrente I_{Na} simulata all'interno di una cellula, si renderebbe necessario un sistema con periodo di aggiornamento molto più piccolo della costante di tempo della corrente in esame
- Risoluzione: la presenza del calcolatore nel sistema implica la necessità di una conversione analogico/digitale (A/D) dei dati registrati e una conversione digitale/analogico (D/A) dei valori calcolati di corrente e tensione. È quindi necessario l'utilizzo di una scheda di acquisizione, periferica che permette proprio la comunicazione fra strumentazione analogica e calcolatore. Sarà necessario scegliere una scheda con alte velocità di conversione A/D e D/A e con risoluzione molto alta, ad esempio 16 bit. Sebbene infatti discretizzare una corrente con 12 bit (ovvero 2^{12}

livelli) possa riverlarsi sufficiente anche con correnti il cui valore assume un range molto ampio, va tenuto conto che la scheda di acquisizione sarà collegata ad un amplificatore da patch-clamp che (se di tipo commerciale) può non permettere una regolazione del guadagno. Tale problematica sarà meglio descritta nel capitolo seguente

- Implementazione hardware/software: nonostante sia stata ormai superata l'implementazione completamente analogica dei primi esperimenti, anche con il passaggio all'elettronica digitale sviluppare un sistema basato su hardware dedicato e con una componente software molto leggera può avere i suoi vantaggi. Utilizzando ad esempio una scheda programmabile si può ottenere il calcolo dinamico della corrente pur mantenendo una velocità di aggiornamento del sistema molto alta. L'implementazione via software comporta invece l'ovvio vantaggio della possibilità di modifica online dei parametri del modello.

Nel presente lavoro è stata utilizzata la tecnica di model clamp per simulare la presenza di una corrente ionica (I_f , la già citata corrente *funny*) in cellule di nodo senoatriale nelle quali la corrente in esame era stata rimossa tramite blocco farmacologico. Nel capitolo successivo verranno descritti i dettagli implementativi e le soluzioni adottate in base agli aspetti critici sopra descritti.

CAPITOLO 3

IMPLEMENTAZIONE DI UNA PIATTAFORMA PER ESPERIMENTI DI PACEMAKING CARDIACO IN DYNAMIC CLAMP

Introduzione

La parte iniziale del capitolo descrive la piattaforma utilizzata come base per l'implementazione del dynamic clamp e i motivi che hanno condotto a tale scelta. La seconda parte riporta le specifiche hardware del setup sperimentale e le problematiche affrontate in fase di allestimento. La terza parte riporta una descrizione funzionale del codice software utilizzato negli esperimenti, mentre nel paragrafo successivo viene descritto lo svolgimento di tali esperimenti. Il capitolo si conclude con l'analisi dei risultati ottenuti.

3.1 – La piattaforma RTXI

Per il presente lavoro si è scelto di applicare la tecnica del dynamic clamp allo studio del pacemaking cardiaco, in particolare soffermandosi sulle rappresentazioni modellistiche esistenti della corrente funny. È stato quindi necessario scegliere come allestire il sistema, partendo da una delle possibili soluzioni già presenti in letteratura ed in commercio. La tecnica del dynamic clamp richiede l'utilizzo di un calcolatore capace di computazione real-time, caratteristica definita dal sistema operativo installato sul calcolatore stesso: un sistema operativo real-time è progettato per gestire le applicazioni installate sulla macchina con un alto grado di rapidità e affidabilità. Questi sistemi operativi vengono utilizzati dunque in quel

tipo di sistemi di controllo in cui un ritardo anche minimo può causare un fallimento critico dell'intero apparato.

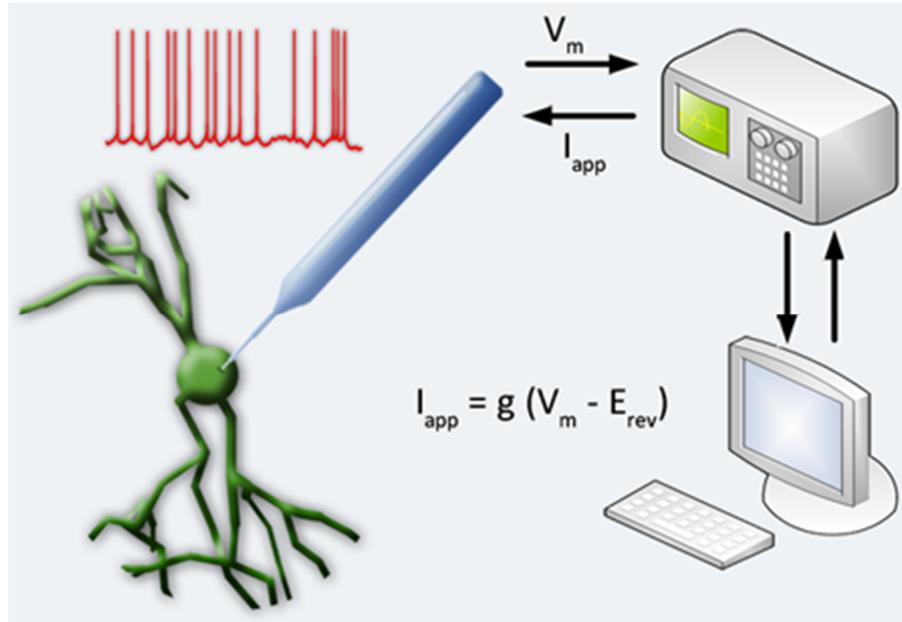


Figura 3.1: Interazione fra cellula e calcolatore tramite amplificatore e current clamp (<http://www.rtxi.org/>)

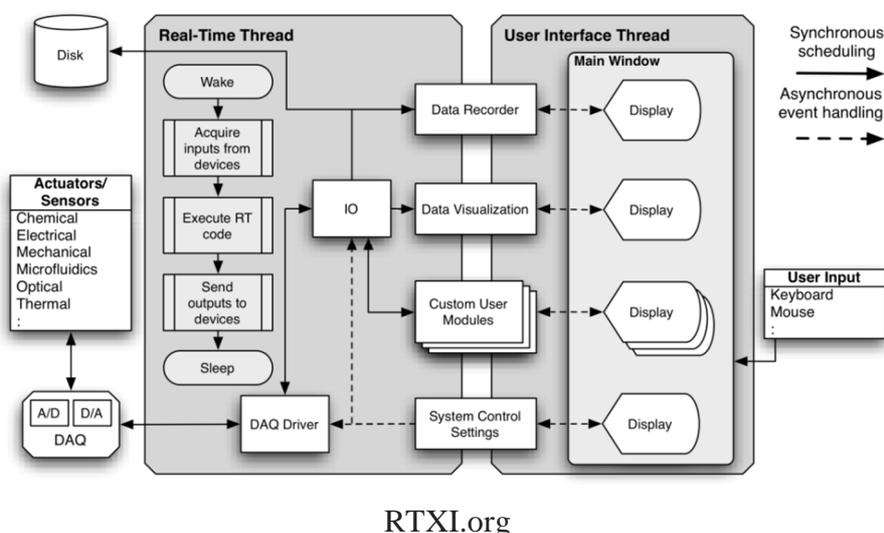
Un sistema real-time deve quindi avere un tempo massimo (garantito in modo assoluto) per l'esecuzione di ognuna delle operazioni da svolgere (a differenza di sistemi *general purpose* come le versioni tradizionali di Windows o Linux). Partendo allora proprio dalla scelta di un sistema operativo real-time, si sono presentate diverse possibili strade implementative (tratto da Christini1998):

- DOS: l'ormai datato sistema operativo DOS viene utilizzato per molti sistemi di controllo in quanto non essendo per sua natura *multitasking*, la rapidità di esecuzione di un'operazione è limitata solo dalla velocità dell'hardware. Tale sistema operativo non è stato preso in considerazione per la mancanza di flessibilità e di interazione rapida con l'utente.

- Sistemi proprietari (RTOS): l'utilizzo di sistemi operativi real-time sviluppati privatamente da aziende è stato escluso a causa degli alti costi di tali sistemi e del fatto che spesso vengono sviluppati non come sistemi general-purpose ma per operazioni specifiche.
- Windows NT: tale sistema operativo incorpora alcune caratteristiche real-time, ma per garantire realmente un tempo massimo di svolgimento delle operazioni è necessario lo sviluppo di add-ons di natura sia software che hardware
- RT-Linux: tale sistema consiste in una variante del normale Linux su cui sono attivi solamente due processi software. Uno di essi è un processo real-time a cui è garantita massima velocità di esecuzione (alta priorità), mentre il secondo processo (a bassa priorità) viene utilizzato per gestire l'interfaccia utente e la memorizzazione dei dati ma sempre e soltanto quando è disponibile tempo di calcolo inutilizzato. Il sistema risulta comunque di facile utilizzo in quanto presenta anche le caratteristiche di una normale versione moderna di Linux. È inoltre gratuito e open-source.

In base alle caratteristiche sopra descritte si è scelto di utilizzare come sistema operativo RT-Linux. Tale sistema operativo è anche alla base di una piattaforma software più completa definita RTX (Real-Time eXperiment Interface) di recente diffusione: gli autori di tale software (distribuito liberamente) si propongono lo sviluppo di un sistema modulare per la definizione semplice e veloce di esperimenti scientifici real-time. RTX utilizza RT-Linux come sistema operativo di base ed integra i driver open-source COMEDI: grazie a tali driver (anch'essi open-source) è possibile l'interazione con un gran numero di schede di acquisizione (DAQ, *digital acquisition board*), ovvero periferiche in grado di permettere al calcolatore funzioni di I/O (Input/Output) sia analogico che digitale. Si è scelto allora di adottare

completamente la soluzione RTX1 come piattaforma di lavoro. A parte il sistema operativo di base e i driver, il software vero e proprio (sempre denominato RTX1) è composto da un'interfaccia utente che permette la selezione di una serie di parametri (ad esempio la frequenza di lavoro del sistema) e il caricamento di moduli software. Tali moduli possono essere pre-esistenti (forniti con il software) o scritti dall'utente in linguaggio C++, compilati e caricati nella schermata di lavoro.



RTXI.org

Figura 3.2: Schema concettuale del funzionamento di RTX1 (<http://www.rtxi.org/>)

Durante la scrittura dei moduli è inoltre necessario specificare quali variabili sono acquisite in ingresso, quali inviate in uscita dal modulo e quali parametri saranno disponibili nell'interfaccia grafica per la modifica on-line da parte dell'utente. Caricati tutti i moduli su RTX1 si procede poi alla creazione di connessioni fra le variabili (Figura 3.5), ovvero si specifica quale variabile in uscita da un modulo diventa ingresso di un altro modulo. In questo modo si costruisce un flusso logico delle informazioni, quasi sviluppando un circuito elettronico su una sorta di "tavolo di lavoro virtuale".

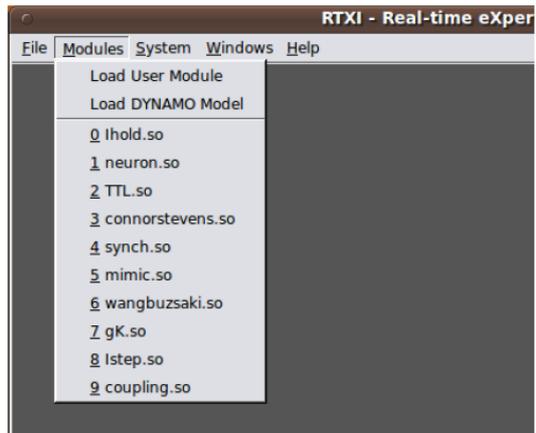


Figura 3.3: Schermata di lavoro iniziale di RTX e scelta dei moduli compilati (RTXI User Guide)

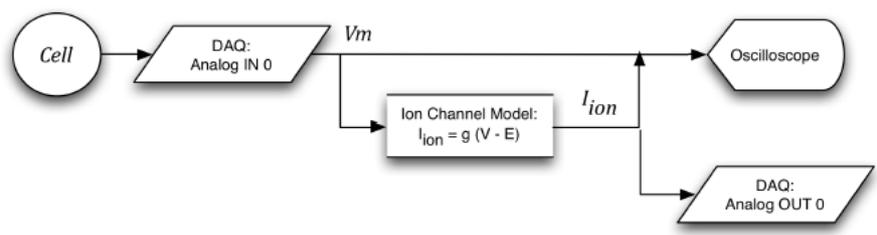


Figura 3.4: Schema concettuale delle connessioni necessarie per un esperimento di model clamp con simulazione di una corrente ionica aggiuntiva (RTXI User Guide)

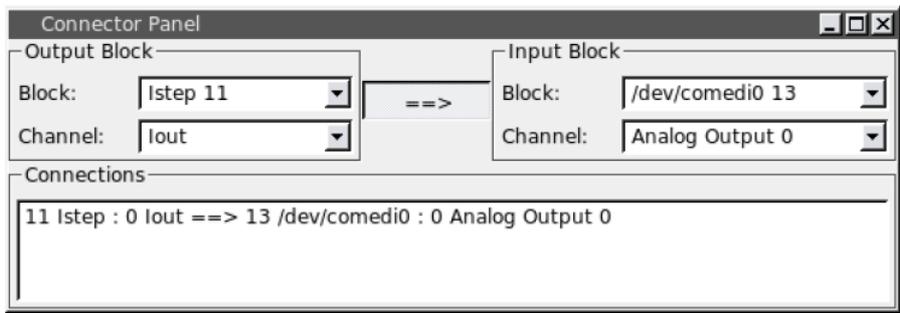


Figura 3.5: Pannello di creazione delle connessioni fra moduli (RTXI User Guide)

In caso di riconoscimento corretto della scheda di acquisizione da parte del sistema i suoi canali di input costituiscono le prime variabili di uscita disponibili, e i suoi canali di output costituiscono le prime variabili disponibili che accettano valori in ingresso provenienti da altri moduli. Una volta impostate tutte le connessioni, è possibile dare il via all'esperimento: nell'interfaccia grafica sono visibili dei riquadri corrispondenti ad ogni modulo, in cui sono elencati i parametri di cui è possibile la modifica. Ogni modulo è dotato di un pulsante "pausa" che permette di avviarne il funzionamento o di azzerarne temporaneamente le uscite.

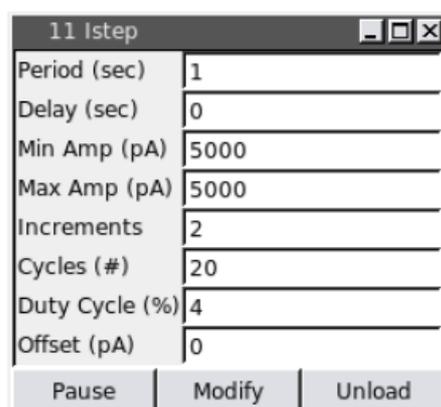


Figura 3.6: Esempio di modulo caricato su RTX1, con parametri modificabili e pulsanti di gestione (RTXI User Guide)

Una volta fatto partire il sistema (rimuovendo la pausa da tutti i moduli) l'esperimento è avviato, ed è possibile visualizzare su un oscilloscopio virtuale (un modulo precaricato su RTX1) l'andamento dei segnali in ingresso/uscita alla scheda DAQ ed il valore delle variabili calcolate nei moduli.

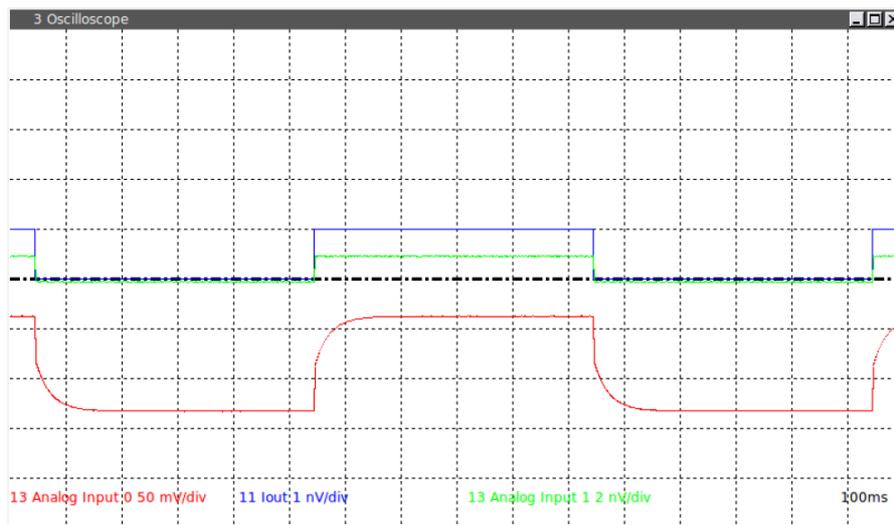


Figura 3.7: Tracce su oscilloscopio virtuale (RTXI User Guide)

È inoltre possibile salvare tali dati su file, sebbene molto spesso si utilizzino a questo scopo canali di acquisizione paralleli e il software originariamente in dotazione con la strumentazione.

3.2 – Setup Hardware

In figura 3.8 è riportato uno schema concettuale degli stadi che compongono il sistema implementato. Il software RTXI viene fornito sul sito web ufficiale (<http://www.rtxi.org/>) sotto forma di immagine ISO, con la possibilità di installare il tutto su PC o utilizzare l'immagine come Boot-CD dopo averla masterizzata. Si è scelto per questo lavoro di utilizzare un normale PC e di eseguire il boot da CD di RTXI ad ogni avvio, per semplicità. Il software interagisce poi con una scheda DAQ di tipo PCI (ovvero installata fisicamente come periferica interna al calcolatore): la scheda utilizzata è di tipo National Instruments 6221, con risoluzione a 16 bit. Tale scheda è poi collegata ad un amplificatore (di tipo specifico per laboratorio di elettrofisiologia) di tipo Axon 200B tramite una terminaliera, ovvero un componente elettronico con il solo scopo di rendere più agevole la

connessione elettrica fra la scheda DAQ e gli stadi successivi della strumentazione. Infatti mentre la comunicazione fra scheda e terminaliera avviene tramite cavo specifico (cavo e terminaliera utilizzati sono sempre di tipo National Instruments) l'uscita della terminaliera è di tipo BNC, ovvero un connettore di uso comune.

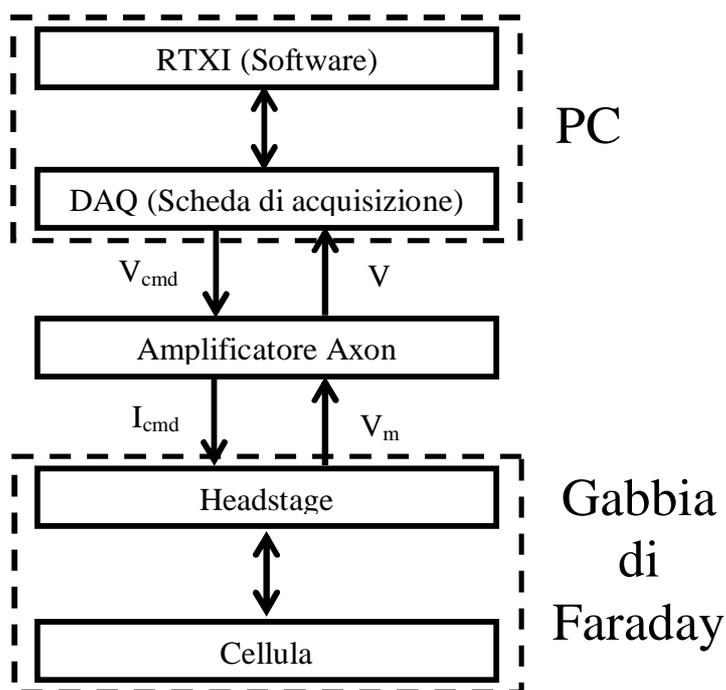


Figura 3.8: Schema a blocchi del sistema di dynamic clamp

L'amplificatore Axon è in grado di ricevere un segnale di *Voltage Command* (V_{cmd}) da sorgente esterna tramite suddetto connettore BNC: tale segnale, inviato dalla scheda DAQ, viene poi convertito in una corrente da iniettare in current clamp all'interno della cellula (I_{cmd}). L'amplificatore è anche in grado di fornire alla scheda DAQ il segnale in tensione associato al potenziale di membrana rilevato dalla cellula (V_m , V). Da notare che fra l'amplificatore e la cellula vera e propria è presente un ulteriore stadio detto *headstage*: si tratta di un convertitore che rappresenta l'ultimo intermediario della connessione

fra strumentazione e materiale biologico (oltre l'headstage è presente solamente la pipetta contenente il microelettrodo).

Durante l'implementazione si è verificato un problema per cui si è reso necessario l'inserimento di un ulteriore componente nel sistema: per descrivere meglio il problema riscontrato va spiegato che le schede di acquisizione permettono nella maggior parte dei casi la selezione via software del range di valori su cui acquisire il segnale di un canale di ingresso, mentre sulla quasi totalità delle schede in commercio è impossibile modificare il range di valori di tensione per i canali di uscita. Se quindi ad esempio è possibile scegliere di distribuire i 2^{16} livelli di discretizzazione (in caso di scheda a 16 bit di risoluzione) su un range di $\pm 10V$, $\pm 5V$, $\pm 1V$ o $\pm 200mV$ (come per la scheda a disposizione), è invece obbligatoria la selezione di $\pm 10V$ come range di tensioni da applicare sui canali di uscita della scheda. L'amplificatore Axon permette la selezione di due possibili valori di guadagno per la conversione di V_{cmd} in I_{cmd} : 20 nA/V e 2 nA/V . Da qui ne deriva che dovendo lavorare con una corrente molto piccola (la corrente I_f è nell'ordine dei pA) anche selezionando il guadagno più favorevole di 2 nA/V ci si ritrova con la possibilità di sfruttare pochissimi livelli di discretizzazione (vedi figura 3.9).

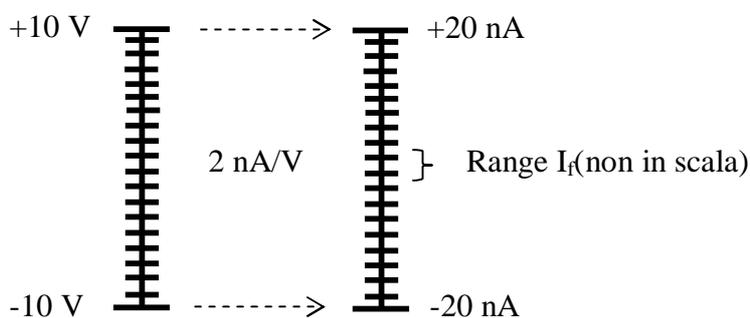


Figura 3.9: Conversione della risoluzione di uscita della scheda DAQ in valori di corrente iniettata

Volendo essere precisi, ad ogni intervallo sulla scala graduata corrispondono circa 0.61 pA, il che significa che I_f verrebbe rappresentata all'incirca su 10-15 livelli diversi (volendo considerare il range fisiologico di +2/-6 pA circa). Per ovviare a questo problema di scarsa risoluzione si è deciso di agire in modo combinato su hardware e software. È stato inserito un circuito assemblato su connettori BNC da interporre fra la terminaliera e il connettore di Voltage Command dell'amplificatore. Tale circuito, rappresentato in figura 3.10, è costituito da un partitore di tensione che agisce anche da filtro (per via della capacità). Premoltiplicando la corrente calcolata via software per un determinato valore (ad esempio 100) prima dell'invio sul canale di uscita, si ottiene l'utilizzo di un range molto più ampio di livelli di discretizzazione. Attenuando tramite il partitore resistivo per lo stesso valore (quindi in questo caso 100) si riottiene il valore corretto di corrente prima dell'applicazione su cellula, ma stavolta con risoluzione 100 volte maggiore. L'inserimento della capacità per implementare contemporaneamente un filtro avviene per evitare la quantità maggiore possibile di rumore termico proveniente dalle resistenze, eventuali interferenze esterne (ad esempio il disturbo di rete a 50 Hz) e per smorzare ancora di più la forma d'onda della corrente. Teoricamente questa funzione di filtraggio viene svolta dalla cellula stessa in base alle sue caratteristiche elettriche (ovvero la natura capacitiva della membrana esterna) ma il circuito elettronico garantisce la possibilità di scegliere in modo più affidabile la frequenza di taglio del sistema.

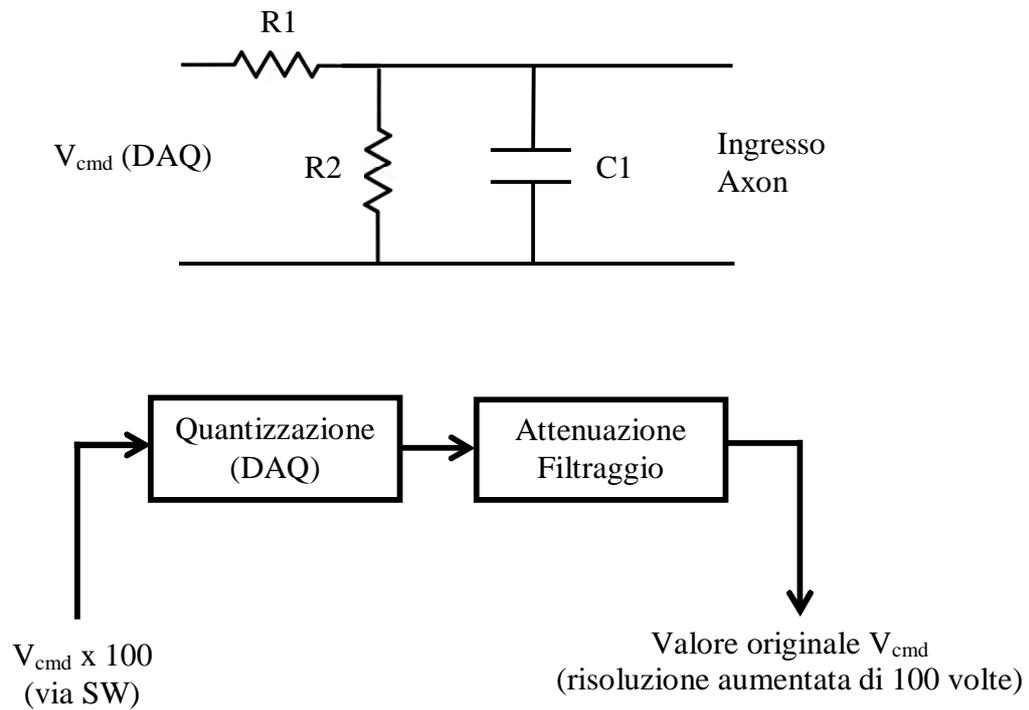


Figura 3.10: Circuito di attenuazione/filtraggio del segnale in uscita dalla scheda DAQ e in ingresso all'amplificatore, e schema concettuale

Scegliendo i valori di $R1=470 \text{ k}\Omega$, $R2=4.7 \text{ k}\Omega$ e $C1=1\mu\text{F}$ (vedi figura 3.10 in alto) si ottiene un'attenuazione pari a 101 ed una frequenza di taglio per il filtro di circa 45 Hz. Data la natura molto specifica del lavoro (studio del ruolo di I_f tramite dynamic clamp), è bastato a questo punto verificare che la frequenza di taglio del filtro non eliminasse componenti importanti dal contenuto armonico della corrente modellata al calcolatore (e che al contrario riducesse le brusche variazioni date dal rumore di quantizzazione). Si è fatto uso a questo scopo del software COR (descritto nel capitolo precedente) per simulare il funzionamento di I_f per alcuni secondi e valutarne il contenuto spettrale (tramite importazione su MATLAB): come si può osservare in figura 3.11 (in basso) oltre i 40 Hz la corrente non presenta armoniche significative (per la simulazione è stato utilizzato il modello Severi2012).

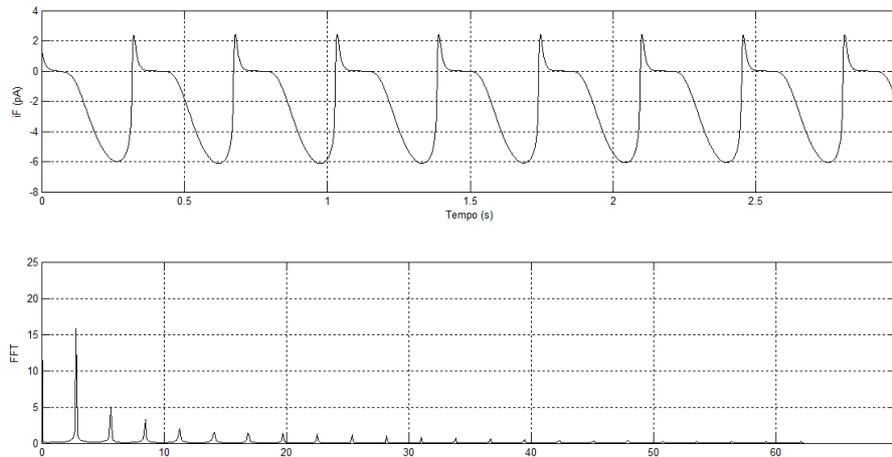


Figura 3.11: In alto, simulazione di 3 secondi di attività della corrente I_f nel modello Severi 2012. In basso, contenuto in frequenza di tale segnale.

Dopo la risoluzione di questo problema è stato possibile procedere verificando il funzionamento del sistema con una *model cell*: si tratta di un circuito elettronico (molto simile ad un filtro passa-basso passivo) che simula il collegamento di una cellula all'headstage per poter testare la procedura di current clamp (escludendo ovviamente la registrazione di risultati fisiologici).

Durante la fase di testing del sistema sono stati scoperti problemi relativi ai canali della scheda DAQ: sia il canale di lettura del potenziale di membrana che quello di comando del current clamp presentavano rumore aleatorio e forti *offset* (valore medio non nullo anche in assenza di segnale).

- La correzione dell'offset in output è stata affrontata tramite lo sviluppo di un modulo software di compensazione la cui uscita si somma in modo diretto alla corrente calcolata dal modello su RTX1 (descritto meglio nel paragrafo successivo)

- Per la correzione dell'offset in lettura non è stato necessario sviluppare codice in quanto il software RTXI prevede già questa possibilità da menù
- Il disturbo aleatorio in lettura si è dimostrato sufficientemente ridotto da non necessitare interventi su software o strumentazione
- Il disturbo aleatorio sul canale di output si è rivelato il problema maggiore, in quanto tramite oscilloscopio è stata verificata la presenza di rumore anche a valle del filtro (sul connettore di voltage command dell'amplificatore). Le cause ipotizzate sono disturbi esterni o rumore interno dell'amplificatore stesso. È stato allora condotto uno studio modellistico: in quanto il rumore osservato si presentava a frequenza molto maggiore della frequenza della corrente da studiare, si è ipotizzato che la natura filtrante della cellula stessa avrebbe permesso l'iniezione senza problemi di una corrente rumorosa. È stato inserito un termine di rumore bianco nell'equazione di I_f del modello Severi2012 ed è stato osservato l'effetto al crescere della deviazione standard del rumore. È possibile osservare in figura 3.13 che soltanto per valori di deviazione standard maggiori di 100 pA e vicini a 1000 pA (quarto e quinto grafico) l'effetto del rumore sul potenziale d'azione diventa significativo. Essendo stato misurato sul connettore dell'amplificatore un rumore a deviazione standard di 5 mV (ovvero 10 pA di corrente iniettata con il guadagno di 2 nA/V dell'Axon, terzo grafico in figura 3.13) si può assumere il rumore come trascurabile ai fini dell'esperimento.

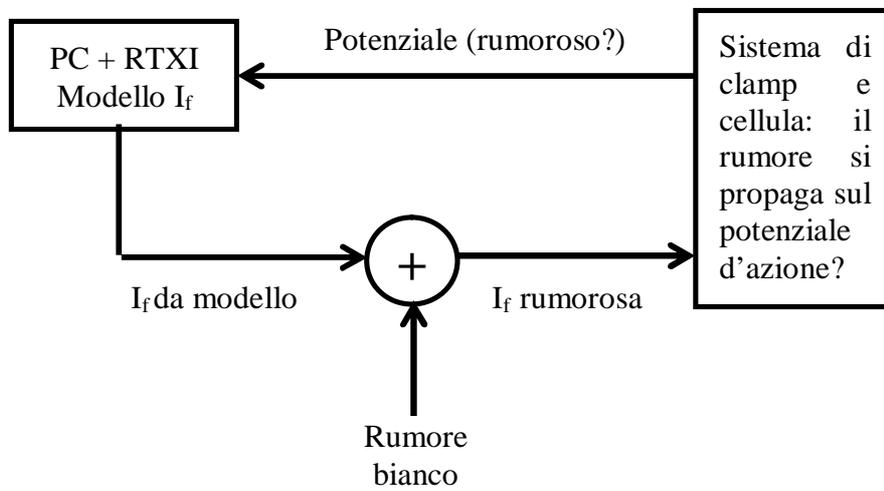
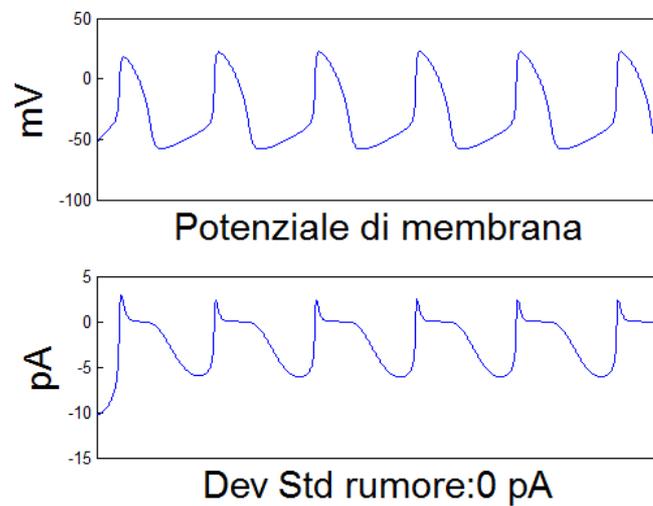
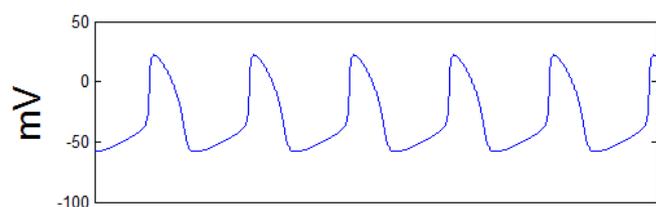
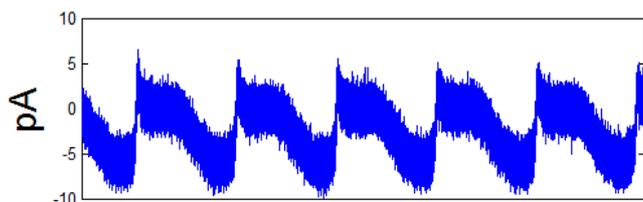


Figura 3.12: Schema concettuale della presenza del rumore in current clamp come possibile fonte di rumore sul potenziale d'azione

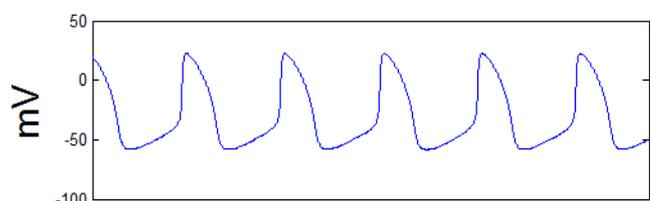




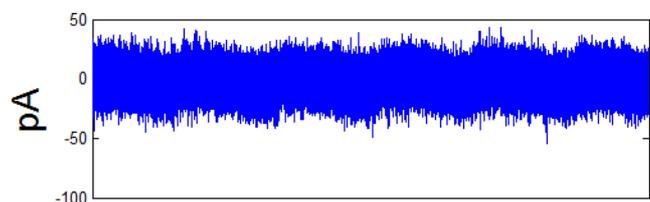
Potenziale di membrana



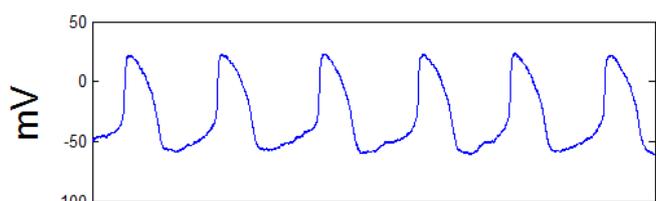
Dev Std rumore:1 pA



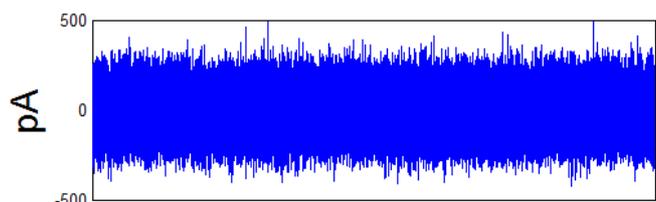
Potenziale di membrana



Dev Std rumore:10 pA



Potenziale di membrana



Dev Std rumore:100 pA

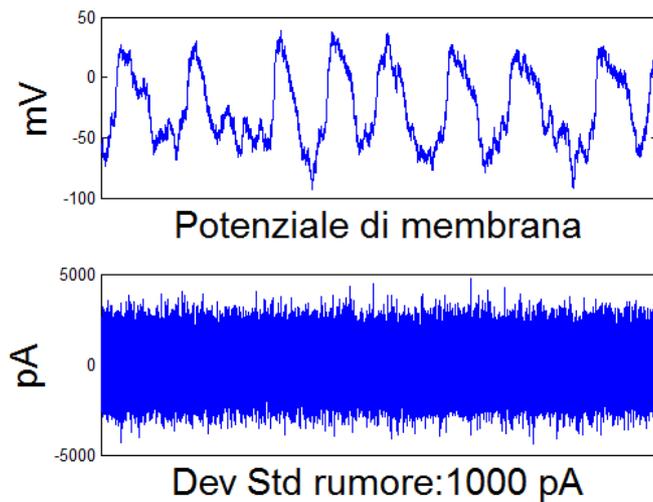


Figura 3.13: Variazione della forma del potenziale d'azione in base a diversi valori di deviazione standard del rumore sulla corrente funny

3.3 – Codice Software

La caratteristica alla base della grande flessibilità di RTX1 è la possibilità di sviluppare e collegare fra di loro moduli software personalizzati in modo da allestire un esperimento di dynamic clamp su misura. Tali moduli vanno scritti in linguaggio C++, ed è possibile trovare numerosi esempi e template sul sito di RTX1 (utili anche per capire la struttura generale da adottare durante i primi tentativi di sviluppo). Sebbene si rimandi il lettore ai testi relativi al linguaggio C++ e alla guida di RTX1 risulta utile un'introduzione generale. I moduli sono costituiti da due file con estensione *.cpp* e *.h*: il primo è quello che contiene la parte importante del codice, mentre il secondo è un header file (una sorta di interfaccia per il file *cpp*), dove è necessario soltanto riportare le intestazioni di funzioni e variabili utilizzate nel file *cpp*. È necessario porre nella stessa cartella di questi due file anche il cosiddetto *makefile*, che contiene soltanto una serie di istruzioni per la compilazione del modulo. Il *makefile* è sempre

identico per tutti i moduli, quindi può essere preso dai template sul sito di RTXI. Parti importanti del modulo:

- *static DefaultGUIModel::variable_t vars[]*: in questo vettore vengono elencate tutte le variabili con rilevanza esterna al modulo. Vengono dichiarate come INPUT le variabili il cui valore va specificato attraverso una connessione di ingresso al modulo, come OUTPUT le variabili il cui valore può essere portato in uscita verso un altro modulo e come PARAMETER le variabili che compariranno nell'interfaccia grafica durante lo svolgimento dell'esperimento e il cui valore sarà quindi modificabile online. È anche possibile definire le variabili come STATE: esse compariranno nell'interfaccia grafica soltanto allo scopo di visualizzarne il valore, senza possibilità di modifica.
- *Init*: questa parte del modulo viene eseguita una sola volta dopo il suo avvio, di conseguenza vanno qui specificati i valori di inizializzazione di tutte le variabili (tranne quelle definite come INPUT e OUTPUT)
- *Execute*: qui avviene la vera interazione fra modello e mondo esterno. Questa parte del modulo viene eseguita ripetutamente in modo ciclico ed è quella che determina il maggiore carico computazionale da sopportate perché il sistema funzioni in real-time. Avremo quindi l'acquisizione dei valori aggiornati delle variabili di input (provenienti da canali della scheda DAQ oppure da altri moduli), l'eventuale aggiornamento di variabili descritte da equazioni differenziali tramite metodi numerici, il calcolo dei nuovi valori delle variabili di uscita del modulo, e la loro applicazione
- *Modify*: il codice all'interno di questa funzione viene chiamato ogni volta che si clicca sul pulsante "Modify" nell'interfaccia grafica, quindi è necessario scrivere qui istruzioni che associno il

cambiamento di valore di una casella dell'interfaccia al cambiamento di valore della relativa variabile

- *Pause*: in questa parte di modulo si inserisce il codice da eseguire alla pressione del pulsante "Pause" nell'interfaccia. Di conseguenza se oltre all'azzeramento degli output non è prevista nessuna operazione particolare, si può lasciare vuoto

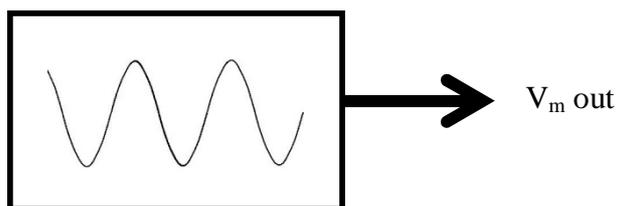
Completata la scrittura di un modulo è necessaria la sua compilazione e installazione, da svolgere in questo modo:

1. Copia dei file relativi al modulo (*modulo.cpp* e *modulo.h*) in una cartella locale del PC
2. Apertura del terminale di Linux e posizionamento su tale directory
3. Esecuzione del comando *sudo make clean* per la pulizia di file temporanei da precedenti compilazioni
4. Esecuzione del comando *sudo make* per la compilazione del modulo
5. Esecuzione del comando *sudo make install* per l'installazione dei file compilati su RTXI

In seguito alla compilazione e all'installazione di tutti i moduli è necessario l'avvio di RTXI e il caricamento dei moduli. I moduli caricati compariranno in veste grafica nella schermata di lavoro e sarà possibile la creazione delle connessioni necessarie. Un'interessante funzionalità offerta dal software è quella del *workspace*, ovvero un file che può essere creato dopo aver impostato sulla schermata di lavoro moduli e connessioni. Tale file memorizza la configurazione presente al momento della sua creazione (inclusi parametri specificati nei menu delle opzioni) permettendo durante prove successive di limitarsi a caricare e installare i moduli necessari senza dover reimpostare tutti i collegamenti. Attenzione: in caso di utilizzo di

Linux-RTXI da boot-CD, allo spegnimento del calcolatore ogni file in memoria verrà perso. Si ricorda quindi di salvare i moduli su supporto rimovibile in caso siano stati sviluppati direttamente su RTXI o siano state apportate modifiche a moduli preesistenti. Di seguito sono descritti i moduli sviluppati sia per scopi di testing del sistema sia per gli esperimenti veri e propri. Per evitare una trattazione prolissa si è ritenuto più agevole descrivere il codice sviluppato solo in termini funzionali: il codice vero e proprio è riportato in appendice.

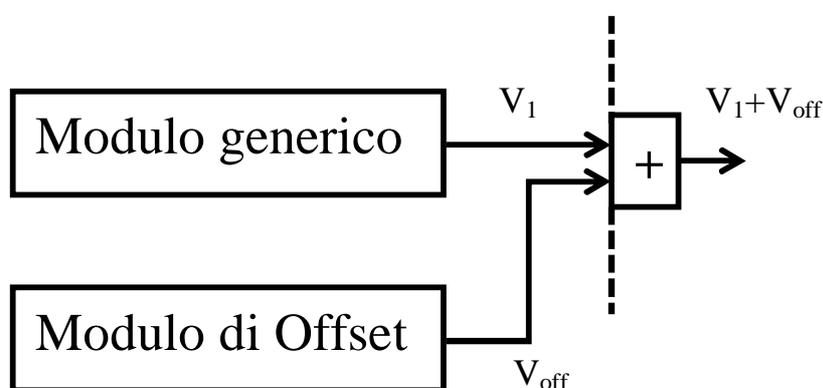
- Modulo *AP Generation*: questo modulo è costituito da un vettore di valori numerici registrati dal tracciato del potenziale d'azione del modello Severi2012.



Il modulo non presenta variabili di input e si limita a fornire una variabile di output il cui valore è dato dalla ripetizione periodica del potenziale d'azione. Il suo utilizzo principale è in fase di testing, come ingresso per il modulo di calcolo della corrente funny. In questo modo è possibile fornire a tale modulo un potenziale d'azione fisiologico per il calcolo della corrente e verificare il funzionamento del segnale di comando del current clamp. Questo non sarebbe altrimenti possibile in quanto la I_f fisiologica è sufficientemente forte da depolarizzare una cellula reale ma non una model-cell

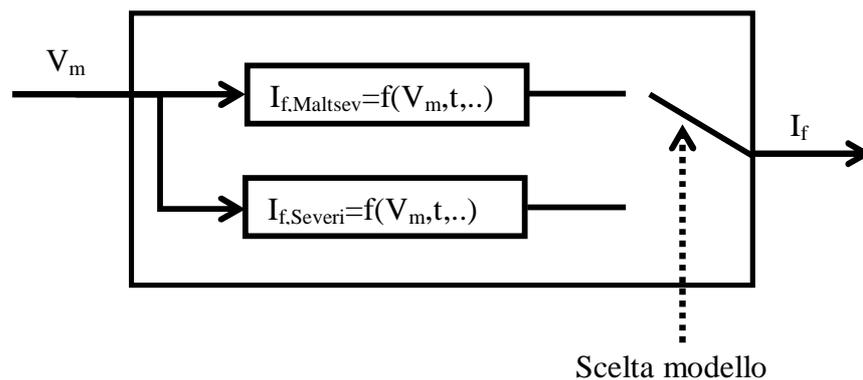
- Modulo *Offset*: Questo modulo è stato sviluppato per compensare la presenza di un offset sul valore di voltage command dell'amplificatore. Il motivo per cui la compensazione non viene

direttamente inserita nel modulo che calcola la corrente da iniettare è che l'offset deve essere sempre attivo, mentre l'iniezione della corrente può essere attivata o messa in pausa a seconda della fase dell'esperimento. È presente una sola casella nell'interfaccia grafica che permette l'impostazione del valore di offset, dopo la sua misura sul connettore dell'amplificatore. Dato che gli output di due moduli si sommano se connessi alla stessa variabile di ingresso, è sufficiente una connessione sullo stesso canale di uscita DAQ della corrente iniettata per introdurre l'offset



- Modulo I_f : questo modulo realizza la funzione principale del model clamp e si occupa di simulare la presenza della corrente I_f sulla membrana cellulare secondo due diverse formulazioni modellistiche (Severi2012 e Maltsev2009). L'interfaccia grafica è costituita da un elenco dei parametri che può essere utile modificare in sede di esperimento (capacità cellulare, concentrazioni ioniche, conduttanza massima e shift delle variabili di gating per dirne alcuni) e da una variabile booleana che permette di impostare quale dei due modelli viene utilizzato per il calcolo. La variabile di input del modulo è il valore di potenziale di membrana proveniente dall'amplificatore tramite il canale di input della scheda DAQ. In seguito all'acquisizione del valore del potenziale, i valori delle variabili di gating e della driving force

vengono aggiornati tramite integrazione numerica (viene utilizzata la formula di Eulero in avanti, per semplicità e soprattutto per minor carico computazionale). Va fatto notare che il passo di integrazione necessario per la stabilità numerica del sistema richiede di integrare più volte all'interno di un ciclo di acquisizione del potenziale: se ad esempio si utilizza una frequenza di real-time di 1 KHz e si integra 100 volte per ogni campionamento, avremo una frequenza di integrazione di 100 KHz (i valori utilizzati come esempio sono quelli utilizzati di default nel modulo). Dopo l'aggiornamento di tutti i termini dipendenti dal potenziale è possibile calcolare il nuovo valore di corrente e impostarlo come uscita del modulo fino al ciclo successivo.



3.4 – Svolgimento degli esperimenti in laboratorio biologico

In seguito alla fase di testing del sistema e allo sviluppo dei moduli software necessari, è stato possibile procedere con le prove sperimentali in-vivo. Tali prove sono state svolte su cellule di nodo senoatriale di coniglio presso il laboratorio di elettrofisiologia cardiaca del professor Dario DiFrancesco (Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università di Milano). Prima di procedere alla descrizione degli esperimenti verranno elencati i

passaggi fondamentali per la preparazione del sistema, in quanto il corretto allestimento e la precisa calibrazione della strumentazione si sono rivelati fondamentali per ottenere risultati apprezzabili:

1. Collegare tutti i cavi (a strumentazione spenta) in configurazione di lavoro finale, in modo da non necessitare di attaccare o staccare connettori in seguito (operazione che può generare offset)
2. Accendere il PC e inserire il boot-CD di RTX- Linux nel lettore. In caso di mancato boot, riavviare con CD inserito
3. Attendere il caricamento, poi scegliere "Lingua > Italiano" e "Prova Ubuntu" dal menu e attendere di nuovo il caricamento
4. Verificare la presenza di eventuali messaggi d'errore generali e la corretta lettura dei supporti rimovibili (USB drive). In caso di mancata lettura è impossibile caricare in memoria i moduli software ed è necessario riavviare il PC
5. Aprire un terminale di lavoro su Linux e calibrare la scheda DAQ: seguire le istruzioni sulla userguide di RTX (comando "comedi_calibrate" per scheda a 12 bit e "comedi_soft_calibrate" per scheda a 16 bit). Nota: può essere irrilevante ma si consiglia di svolgere questa operazione ad amplificatore spento

In parallelo alle operazioni finora svolte è possibile lavorare su headstage, collegando la model-cell o la cellula reale, comunque solo in caso sia possibile lavorare ad amplificatore spento (finchè il sistema non è pronto vanno evitate comunicazioni elettriche fra calcolatore e campione).

6. Verificare le corrette impostazioni di manopole e interruttori sull'amplificatore (guadagno in lettura, guadagno in voltage command, modalità di current clamp, ...) ed in particolare verificare che sia disattivato lo switch "External input command"

7. Copiare in memoria locale i moduli da utilizzare e i workspace, compilare i suddetti e installarli
8. Lanciare RTX1
9. Attivare i canali di input e output da RTX1, ricordandosi di impostare il valore corretto di guadagno (1 V/V per l'ingresso e 500 MV/V per l'uscita, nel caso specifico). Nota: per via di un cross-talk non voluto fra i canali della terminaliera, gli offset assumono valore finale solo dopo l'attivazione di tutti i canali da utilizzare.
10. Impostare l'oscilloscopio virtuale di RTX1
11. Verificare il valore di offset sul canale di input
12. Verificare il valore di offset sul canale di output tramite la connessione del connettore ad un oscilloscopio esterno
13. Caricamento su RTX1 dei moduli necessari e impostazione delle connessioni fra moduli (oppure caricamento del workspace predefinito). Mantenimento in stato di pausa di tutti i moduli per evitare la presenza di valori di uscita diversi da zero all'inizio dell'esperimento
14. Compensazione via software degli offset rilevati (tramite menu di RTX1 e moduli sviluppati)
15. Se viene utilizzato un cavo attenuatore (descritto in precedenza) assicurarsi di moltiplicare per il valore corretto di guadagno l'uscita del modulo collegata al canale di output della scheda DAQ
16. Impostare correttamente i valori di capacità di membrana cellulare e concentrazioni ioniche extracellulari nei moduli che lo richiedono

A questo punto è possibile dare il via alle prove sperimentali semplicemente attivando lo switch presente sul pannello dell'amplificatore per attivare l'iniezione di corrente nella cellula (cosa che ad ogni modo non avverrà fino all'attivazione del

corrispondente modulo software). Nella procedura sopra descritta non è stata menzionata nessun tipo di operazione per impostare la registrazione dei dati: questo perché sebbene tale funzionalità sia prevista da RTX1, si tratta comunque di carico computazionale aggiuntivo. Si è deciso invece di lavorare in parallelo con la strumentazione già presente in laboratorio (scheda di acquisizione Digidata e software PClamp) per registrare sia la corrente iniettata nella cellula che il potenziale di membrana rilevato, attraverso uno sdoppiamento nelle connessioni della strumentazione.

Esperimento di sostituzione della corrente funny:

Questo tipo di prova svolta ha lo scopo di verificare quale delle due formulazioni modellistiche di I_f si avvicini di più alla realtà fra quella proposta in Severi2012 e quella proposta in Maltsev2009, in quanto la prima ha un valore molto più alto in fase di depolarizzazione diastolica rispetto alla seconda. Per fare questo si è deciso di procedere attraverso il blocco farmacologico di una parte della corrente in una cellula e la verifica di quale modello si dimostri il più adatto a riportare il potenziale d'azione in condizione basale. Si è agito in questo modo:

1. Applicazione della tecnica di perforated patch – current clamp (descritta nei capitoli precedenti) alla cellula in esame.
2. Registrazione dell'attività elettrica spontanea della cellula per ottenere alcuni potenziali d'azione come riferimento basale
3. Applicazione di Ivabradina 3 μM , che come descritto in precedenza blocca circa il 66 % di I_f .
4. Registrazione di alcuni potenziali d'azione spontanei dopo la stabilizzazione dell'effetto dell'ivabradina
5. Attivazione del modulo per il calcolo di I_f (da potenziale acquisito) e iniezione di una corrente simulata (scegliendo uno dei due

modelli) con conduttanza massima scalata al 66% (idealmente corrispondente alla corrente bloccata farmacologicamente).

6. Aggiustamento del valore di conduttanza massima allo scopo di riportare il potenziale d'azione in condizioni pre-ivabradina
7. Annotazione del valore percentuale necessario per verificare il punto 6 e stop dell'iniezione di corrente
8. Passaggio alla seconda formulazione modellistica tramite variazione di un *flag* da interfaccia grafica e ripetizione dei punti 5-6 con il secondo modello di I_f

L'ordine di applicazione dei due modelli di I_f è stato variato di prova in prova, con un intervallo di tempo fra l'applicazione dell'uno e dell'altro per consentire alla cellula il ripristino delle condizioni presenti al punto 4.

Si procederà nel prossimo paragrafo all'analisi dei dati ottenuti da questi esperimenti.

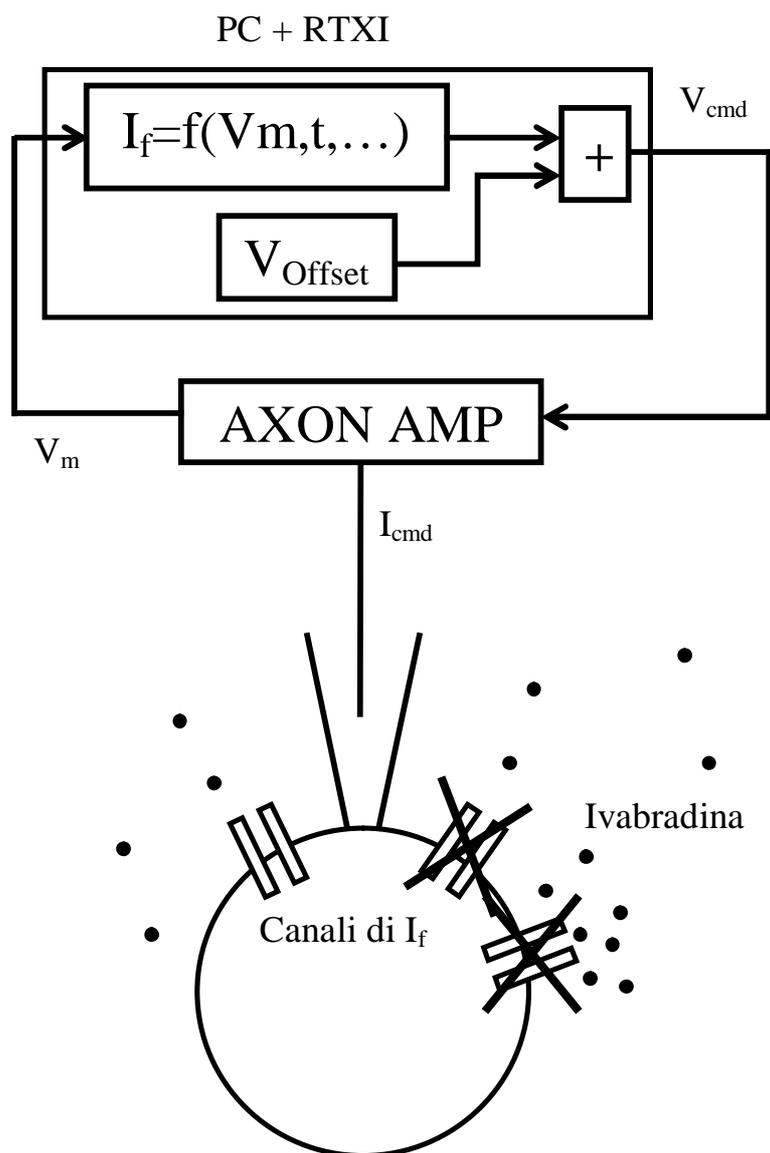


Figura 3.14: Interazione fra cellula e moduli SW su calcolatore tramite amplificatore. L'ivabradina blocca circa il 66 % dei canali funny

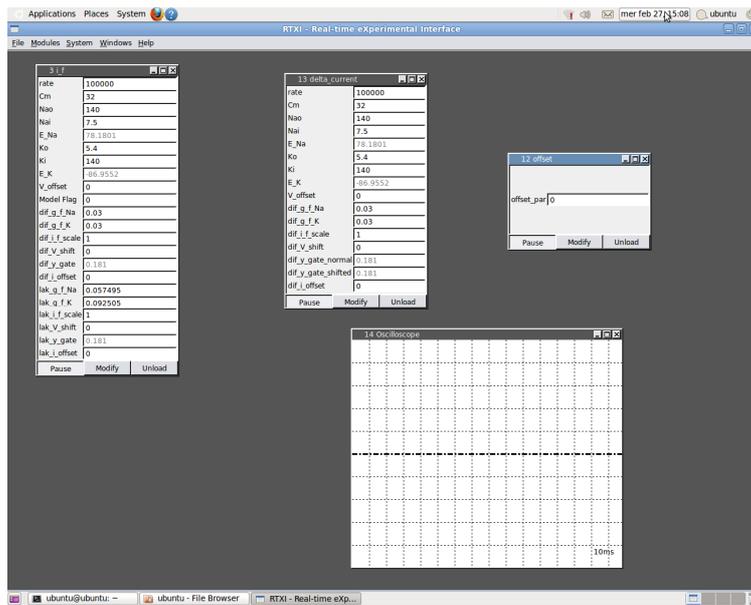


Figura 3.15: Esempio di schermata di lavoro contenente i moduli I_f e Delta (da non utilizzare assieme, solo per rappresentazione grafica), il modulo di offset e l'oscilloscopio virtuale

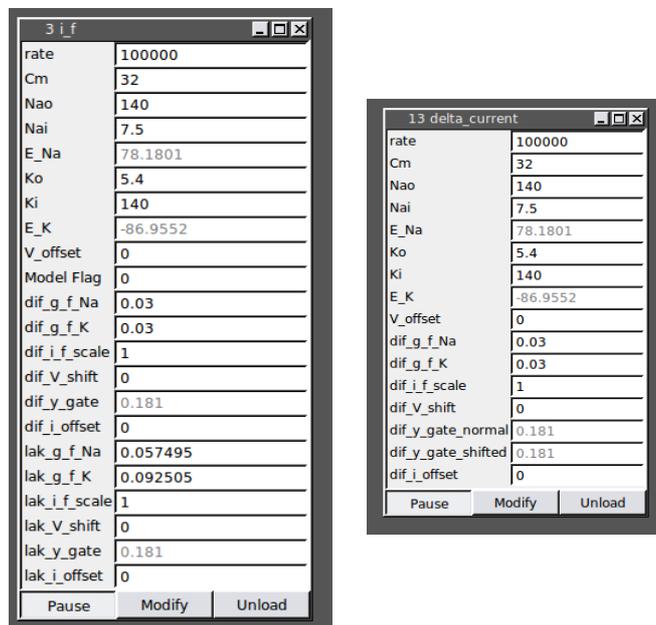


Figura 3.16: Interfaccia grafica per i moduli I_f e Delta

3.5 – Analisi dei risultati sperimentali

Nonostante la fase di testing del sistema sia stata sufficiente per verificare il funzionamento della strumentazione, è l'esecuzione dei primi esperimenti che ha dimostrato concettualmente la validità di questo nuovo metodo di indagine sperimentale. Nelle figure seguenti sono riportati alcuni dei dati ottenuti: da notare che per ogni cellula viene riportato anche il valore di capacità elettrica misurato (impostato nell'interfaccia grafica del modulo I_f) in quanto viene utilizzato per lo scaling del modello originariamente predisposto per cellula da 32 pF. Se quindi viene per esempio indicato "50% di corrente iniettata", significa che la corrente in uso è data dalla moltiplicazione della capacità effettiva della cellula per il 50% della densità di corrente del modello.

In figura 3.17 (A) si può osservare un tracciato di potenziale d'azione in controllo (nero) e l'effetto dell'applicazione di Ivabradina ($3\mu\text{M}$, rosso). La frequenza delle oscillazioni diminuisce del 12% (meno di quanto atteso dai dati in letteratura, per possibili problemi di setup o del bloccante stesso) ed è necessaria l'iniezione della densità di corrente totale del modello Severi-DiFrancesco per riportare l'AP in condizioni molto simili a quelle basali (in blu). La linea verde rappresenta invece l'iniezione nel sistema del 50% della densità di corrente massima, e come si può osservare non è sufficiente a riportare il sistema in controllo. Si nota dalla sovrapposizione iniziale fra gli AP come la forma d'onda e l'MDP rimangono fondamentalmente invariati, ulteriore segno della validità della formulazione della corrente iniettata (che agisce proprio in iperpolarizzazione). In basso nella stessa figura sono riportate le correnti calcolate e iniettate dal sistema di dynamic clamp nelle varie condizioni (stesso codice colori). In figura 3.17 (B) è riportato

l'andamento della frequenza del sistema (inteso come frequenza dei potenziali d'azione) nelle varie fasi dell'esperimento. Si osserva il *rate* iniziale del sistema che poi si riduce per via dell'applicazione di ivabradina, poi l'applicazione di varie densità di corrente nel tentativo di riportarlo al suo valore originale, e il ritorno al valore inferiore dopo la rimozione dell'iniezione di corrente.

In figura 3.18 (A) sono riportati i risultati dello stesso esperimento svolto su una cellula con capacità inferiore (19 pF contro i precedenti 32), frequenza basale più bassa e un potenziale d'azione con caratteristiche vagamente atriali. Su questa cellula è stato possibile confrontare le formulazioni di I_f relative ai due modelli citati. È sufficiente un 20% della densità di corrente massima del modello Severi-DiFrancesco per riportare l'AP in condizioni basali, mentre con il modello Maltsev-Lakatta serve il 100%. Va ricordato che l'ivabradina blocca soltanto una frazione (seppure alta) dei canali funny, di conseguenza il risultato ottenuto può essere interpretato in questo modo: nella cellula in esame il contributo della corrente funny alla depolarizzazione viene sovrastimato dal modello DiFrancesco e sottostimato dal modello Lakatta. Il risultato può però essere influenzato dalla frequenza basale molto bassa della cellula (2 Hz), che può essere indicativa di un'espressione dei canali funny già in partenza minore della media. In figura 3.18 (B) è di nuovo riportato l'andamento in frequenza del sistema: si può osservare ancora come l'iniezione di diverse percentuali di corrente sia un modo efficace per modulare la frequenza delle oscillazioni. Anche in questo caso la forma d'onda originale della cellula viene qualitativamente conservata durante il dynamic clamp: si può quindi affermare che il ripristino della frequenza al valore di controllo non viene ottenuto a scapito di altri importanti parametri di valutazione dell'AP.

Vengono presentati in figura 3.19 (A) e 3.19 (B) i risultati di un'ultima cellula, il cui potenziale d'azione in controllo presenta caratteristiche marcatamente atriali. Questa cellula, di capacità intermedia rispetto a quelle precedenti (25 pF contro 19 e 32) conferma i risultati ottenuti sopra in termini di densità di corrente: anche in questo caso per ristabilire le condizioni di controllo è necessario iniettare il 100% della densità di corrente dal modello Maltsev-Lakatta e il 25% dal modello Severi-DiFrancesco. Anche in questo caso i dati mostrati sul grafico B relativo alla frequenza sono consistenti con gli stimoli applicati sperimentalmente.

Come si può osservare comparando i valori riportati, la prima cellula presenta dei valori percentuali molto diversi dalle due successive: serve il 100% di I_f del modello Severi-DiFrancesco per riportare il potenziale d'azione in condizioni basali, mentre nelle cellule successive è necessario soltanto il 20-25% della densità massima di corrente. Nonostante questa discrepanza necessiti di indagini più approfondite (e della creazione di una statistica su un numero più consistente di cellule) una sua possibile spiegazione è legata alla forma parzialmente atriale dei potenziali d'azione della seconda e terza cellula. Le cellule senoatriali tendono infatti ad assumere caratteristiche atriali man mano che ci si sposta dal centro del nodo verso la zona esterna, con conseguente diminuzione della densità di corrente funny. Indipendentemente però dalle considerazioni che si possono trarre dai risultati specifici (a scopo elettrofisiologico o modellistico) e che necessitano di ulteriori verifiche, si può constatare la validità del metodo di indagine proposto: il sistema di dynamic clamp implementato (inclusa la parte software) si dimostra in grado di interagire in tempo reale con la cellula in esame, in modo sufficientemente veloce e poco rumoroso.

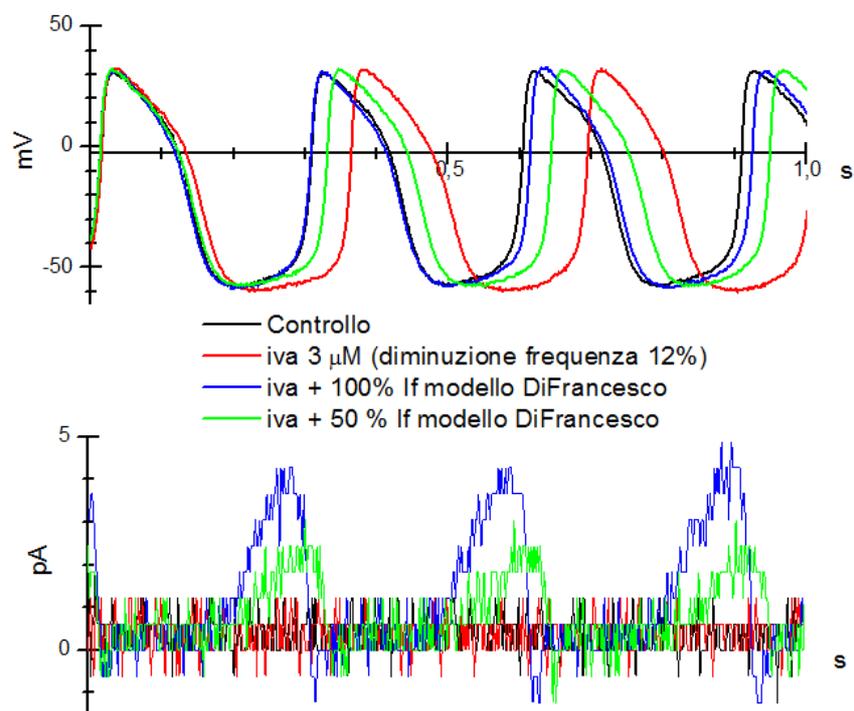


Figura 3.17 (A): AP e correnti iniettate, C=32 pF

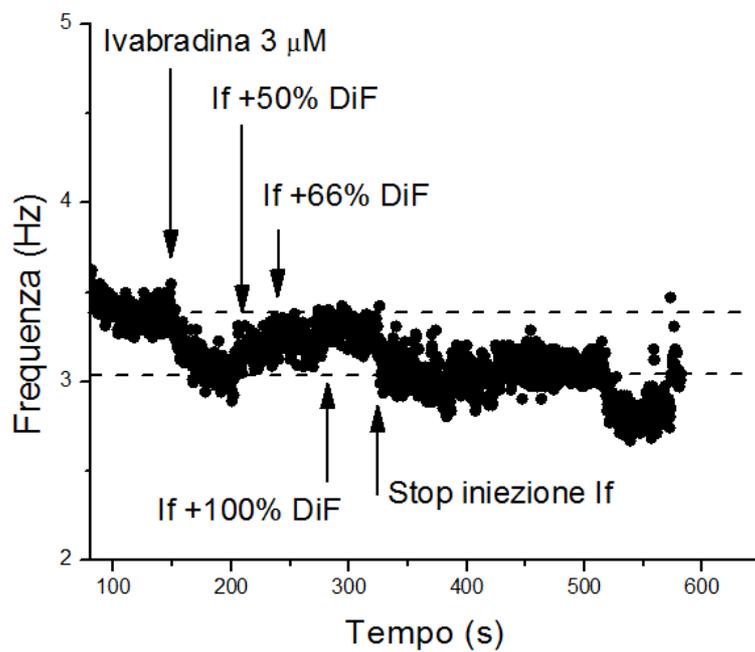


Figura 3.17 (B): Frequenza degli AP nel tempo

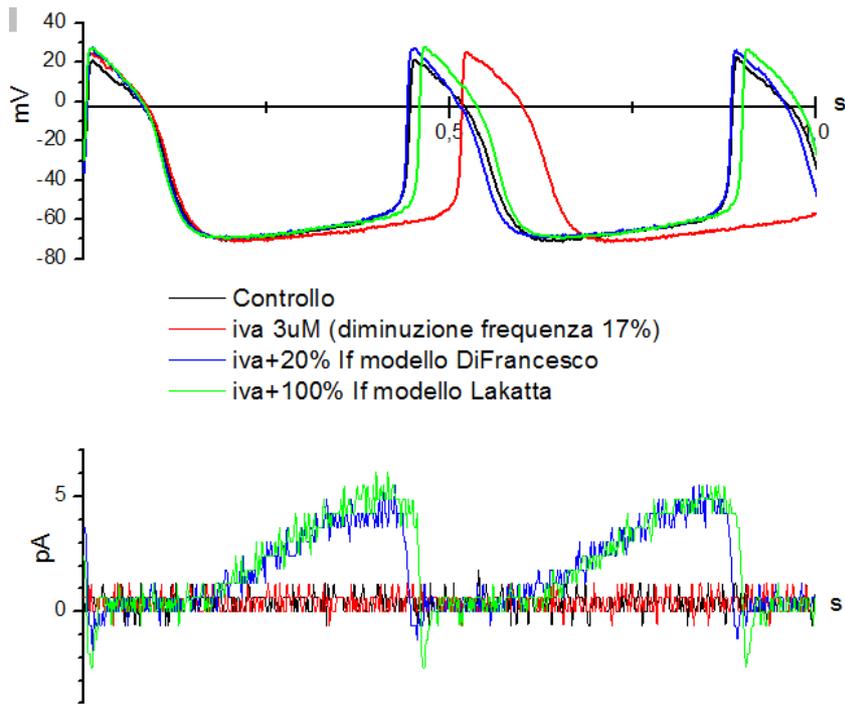


Figura 3.18 (A): AP e correnti iniettate, C=19 pF

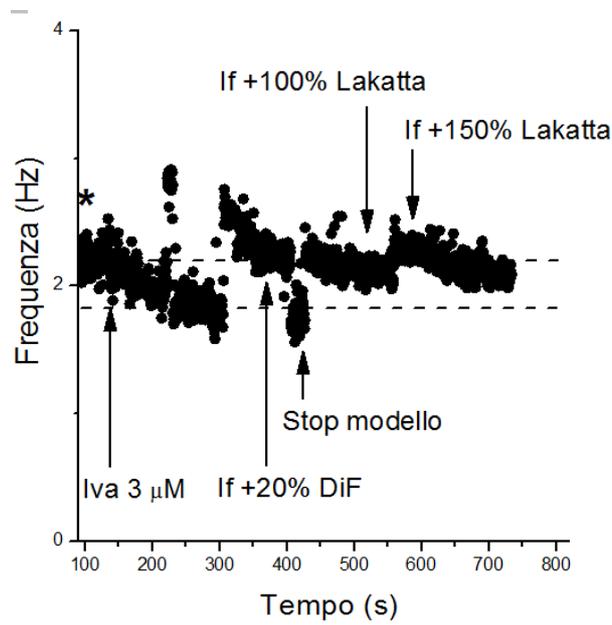


Figura 3.18 (B): Frequenza degli AP nel tempo

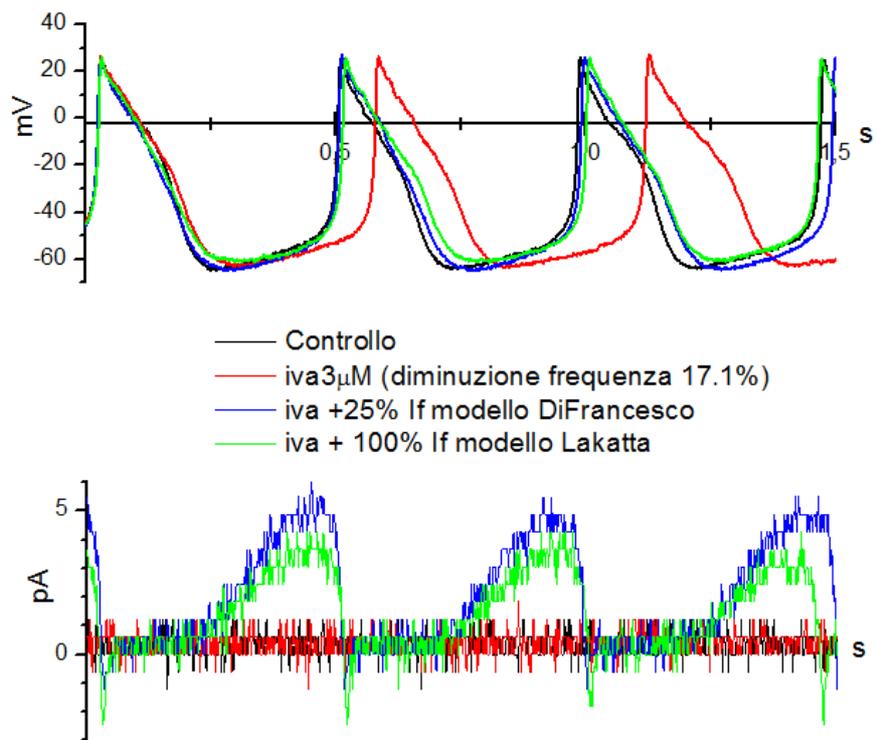


Figura 3.19 (A): AP e correnti iniettate, C=25 pF

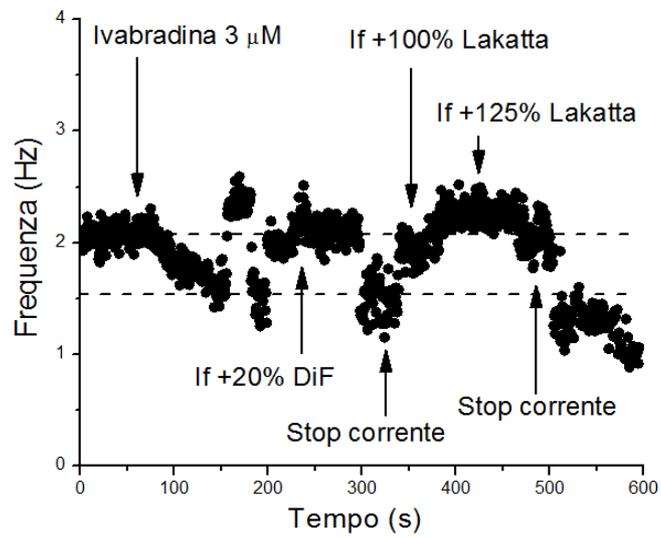


Figura 3.19 (B): Frequenza degli AP nel tempo

CAPITOLO 4

ANALISI MODELLISTICA DELLA DINAMICA DEL CALCIO INTRACELLULARE

Introduzione

La prima parte del capitolo descrive l'obiettivo dell'analisi modellistica (ovvero i dati a disposizione sul fenomeno da riprodurre), la rappresentazione modellistica del fenomeno e la possibilità di riproduzione dei risultati sperimentali da parte dei due modelli sinoatriali discussi in precedenza. Vengono poi descritte le prove preliminari svolte e l'approccio adottato. Nella parte successiva vengono riportate informazioni su alcune delle strade intraprese per la modifica del modello che ad una prima analisi non si sono rivelate sufficientemente valide. L'ultima parte del capitolo descrive invece le modifiche che hanno portato il modello più vicino alla riproduzione dei dati sperimentali.

4.1 – Riproduzione degli effetti della rianodina

Nonostante le tecniche di clamp si rivelino utili per indagare sul funzionamento delle correnti di membrana, lo studio dei fenomeni legati al calcio intracellulare necessita comunque di una più forte componente modellistica in base alla difficoltà di manipolazione dei compartimenti intracellulari (come il reticolo sarcoplasmatico). Se quindi è possibile utilizzare il dynamic clamp (o tecniche più tradizionali) per studiare il lato del dibattito sul pacemaking relativo a I_f , viene invece utilizzata la modellistica (assieme a dati sperimentali le cui informazioni sono più "indirette") per indagare il calcium clock. Il modello Severi2012 (in cui I_f gioca un ruolo importante in

membrana) eredita la gestione del calcio intracellulare dal modello Maltsev2009 e verrà utilizzato in questo capitolo come base per l'analisi modellistica.

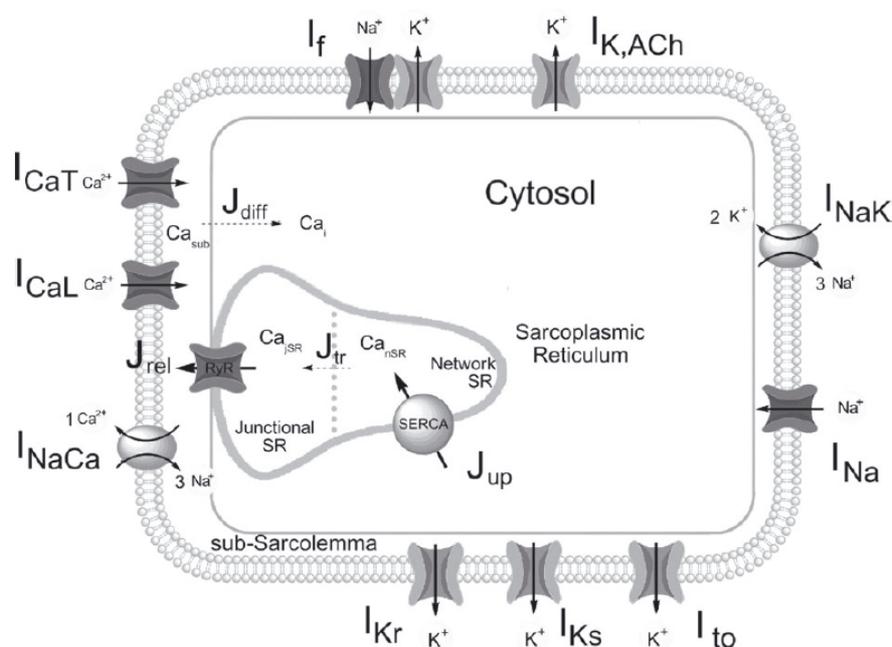


Figura 4.1: Rappresentazione grafica per il modello Severi2012 (tratto da Severi2012)

Una delle basi sperimentali scelte per indagare la validità delle equazioni del modello è l'effetto della rianodina. La rianodina è un alcaloide di origine vegetale in grado di influenzare l'attività dei canali RyR (detti appunto recettori della rianodina) presenti sulla superficie del reticolo sarcoplasmatico. Secondo Li (Li1997) l'applicazione di 10 μM di rianodina porta ad un rallentamento in frequenza del 32 % dato dall'azione di questa molecola sul reticolo (e non ad esempio su I_f), lasciando inalterato l'MDP. Satoh (Satoh1997) riporta un effetto dipendente dalla concentrazione utilizzata ma sempre ad MDP inalterato. Secondo tale studio si ottiene un rallentamento del 35% alla concentrazione di 100 μM . È riportato

come l'effetto della rianodina sia quello di mantenere i canali RyR completamente aperti, in uno stato semiaperto o completamente chiusi a seconda della concentrazione utilizzata e delle condizioni sperimentali. Escludendo quest'ultimo caso, l'effetto sulla frequenza dei potenziali d'azione deriva dal fatto che, non potendo i canali mantenere il loro normale ciclo di apertura/chiusura temporizzata, si ha uno svuotamento progressivo del reticolo e un conseguente aumento di calcio libero citoplasmatico (anch'esso riportato in Satoh). Secondo Fill (Fill2002) l'applicazione della rianodina causa il prolungamento temporale dello stato di apertura dei canali RyR e la riduzione della corrente ionica di singolo canale al 30-50% dell'ampiezza in controllo. Fill riporta inoltre 1 μM come concentrazione necessaria per l'azione "classica" della rianodina (semiapertura dei canali) e 100 μM come concentrazione necessaria per l'occlusione completa dei canali. Il modello Maltsev implementa però l'applicazione di rianodina (a media concentrazione) tramite blocco della pompa SERCA, responsabile del *re-uptake* di calcio verso il reticolo, giustificando questa scelta con l'idea che l'apertura incondizionata dei canali RyR influisce a tal punto sulla dinamica da portare anche a questo effetto. Come si può osservare in figura 4.2, si ottengono soltanto degli AP erratici.

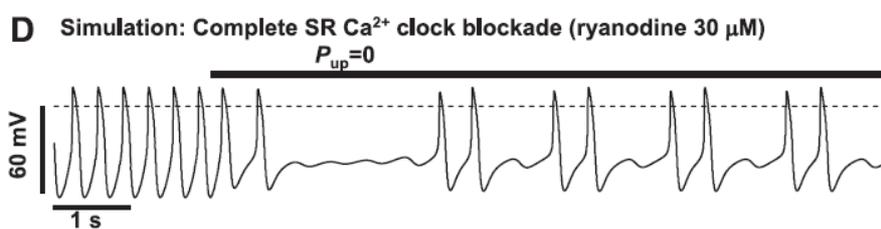


Figura 4.2: Effetto della simulazione dell'applicazione di ryanodina tramite inibizione dell'uptake (in Maltsev2009)

Per il presente lavoro si è scelto di adottare una formulazione alternativa per la simulazione dell'effetto della rianodina, essendo

qualitativamente noto l'effetto fisico della molecola sul canale RyR: si è scelto di agire sulla formula che descrive la corrente di rilascio J_{rel} (vedi figura 4.1 e 4.7) impostando ad un valore costante la variabile che descrive la frazione di apertura dei canali. Tale valore viene determinato per ogni modello sotto analisi come il 50% del valore massimo raggiunto dalla variabile stessa (in figura 4.7, relativa ad analisi descritte successivamente, ci si riferisce alla variabile O).

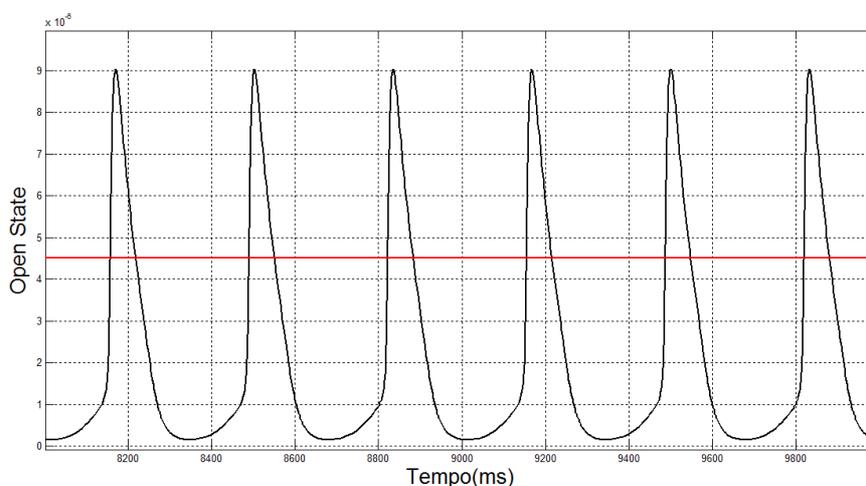


Figura 4.3: Frazione di apertura dei canali RyR nel modello Maltsev2009 in condizioni basali (linea nera) e con rianodina applicata (rosso)

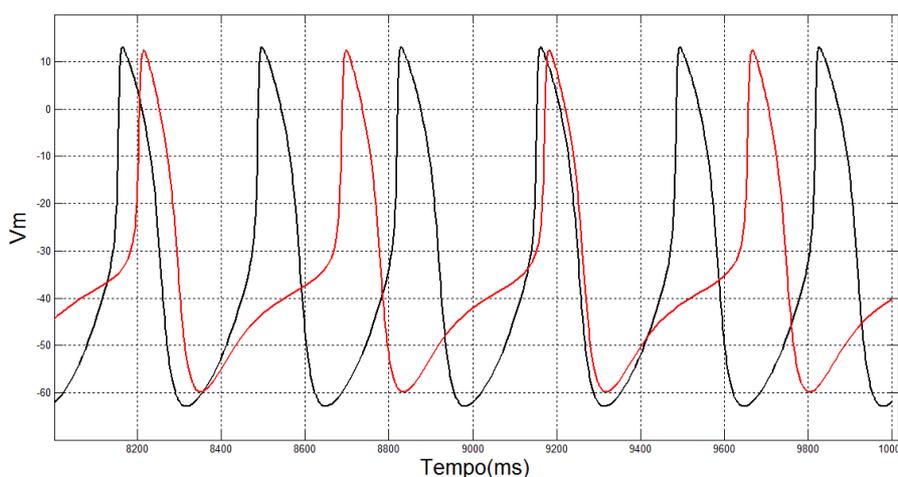


Figura 4.4: Effetto della simulazione dell'applicazione di rianodina sull'AP nel modello Maltsev2009

In figura 4.3 è riportata una rappresentazione grafica per la modellizzazione della rianodina (in nero il valore basale di apertura dei canali, in rosso quello con rianodina applicata). In figura 4.4 si può osservare invece l'effetto ottenuto sul potenziale d'azione applicando questa analisi al modello Maltsev2009. L'effetto della simulazione della rianodina si riassume (dopo un intervallo di tempo necessario al modello per effettuare la transizione) con un'alterazione della fase diastolica dell'AP, un innalzamento dell'MDP di circa 3 mV ed una riduzione di frequenza del 30% (da 3Hz a 2.1 Hz). Analizzando invece l'effetto dell'applicazione di rianodina al modello Severi2012 vengono rilevati un innalzamento dell'MDP e un'alterazione della forma dell'AP in diastole, ma nessuna variazione di frequenza (costante a 2.8 Hz). Data la presenza dello stesso set di equazioni per il reticolo sarcoplasmatico all'interno di entrambi i modelli, questo risultato può essere interpretato come l'effetto di una differente interazione del reticolo con le diverse formulazioni delle correnti di membrana. Si è deciso quindi di considerare la riproduzione degli effetti della rianodina come uno dei principali fattori per valutare la validità delle modifiche da effettuare al modello Severi2012.

4.2 – Analisi preliminari

Si ricorda innanzitutto che nel modello preso in considerazione il reticolo sarcoplasmatico si affaccia verso un compartimento intracellulare funzionale denominato *subspace*, nel quale le concentrazioni ioniche sono più elevate (in quanto rappresenta lo spazio ridotto vicino alla membrana cellulare). Un fattore determinante per la validità delle equazioni del calcio e per lo studio delle teorie di clock (oltre alla riproduzione degli effetti della

rianodina) è dato dall'ordine temporale di attivazione e inattivazione delle correnti. L'ipotesi da testare è stata la seguente: il lento aumento della concentrazione di calcio nel subspace, determinato da una combinazione di correnti entranti diastoliche e di debole rilascio di calcio da parte del reticolo sarcoplasmatico, determina l'attivazione del meccanismo del CICR. L'aumento significativo di calcio intracellulare a causa del CICR attiva allora la corrente I_{NCX} , che oltre a riequilibrare la concentrazione di calcio provoca anche una depolarizzazione ulteriore della cellula. Raggiunto un determinato valore di potenziale (il TOP, già descritto nei capitoli precedenti), l'attivazione di I_{CaL} è completa e si ottiene l'avvio dell'upstroke.

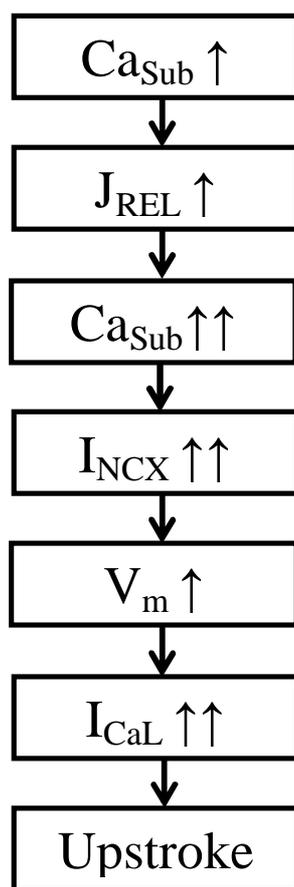


Figura 4.5: Ipotetica sequenza temporale di eventi cellulari legati alla dinamica del calcio citoplasmatico

Per verificare questa ipotesi è stato necessario sviluppare un metodo per studiare l'influenza delle varie correnti sul potenziale d'azione alterandone il meno possibile la dinamica originale. L'approccio adottato è stato quello di verificare l'effettiva importanza di I_{CaL} confrontando il potenziale d'azione del modello in condizioni fisiologiche con quello di una versione in cui la suddetta corrente viene rimossa solo dalla *master equation* di calcolo del potenziale di membrana (la prima equazione di capitolo 2, paragrafo 3). Viene così mantenuto il contributo della corrente alla variazione delle concentrazioni ioniche. Si è scelto di effettuare una prova simile con la corrente di scambiatore I_{NCX} , ma dato che tale corrente influisce anche sul valore di MDP raggiunto dal potenziale d'azione, invece di rimuoverla completamente dall'equazione di V_m è stata impostata in modo costante al valore che assume in diastole. I risultati di questa analisi sono visibili in figura 4.6a.

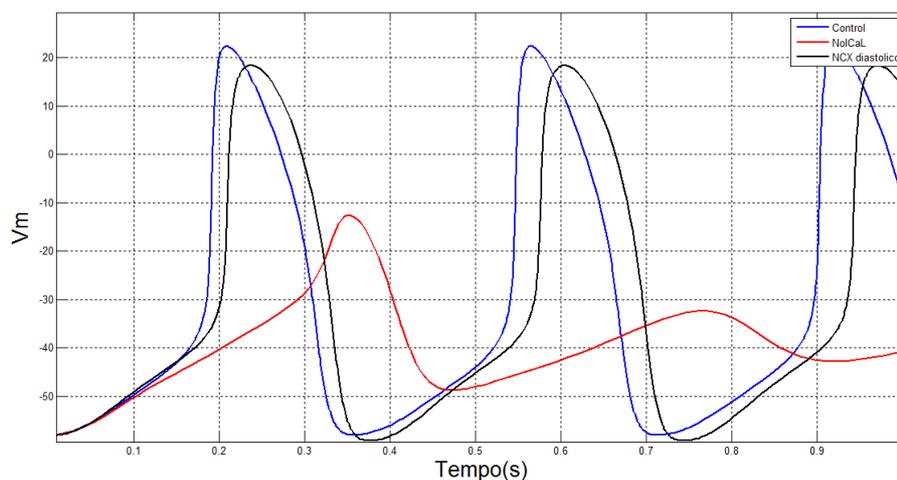


Figura 4.6a: Andamento del potenziale d'azione nel modello Severi2012 in condizioni basali (blu), con I_{NCX} diastolica (nero) e senza I_{CaL} (rosso)

Da questa prova si capisce come la corrente I_{CaL} si attivi prima del tempo, in quanto rimuovendo la quasi totalità del contributo di I_{NCX}

(AP in linea nera) si verifica comunque un upstroke, mentre dovrebbe essere I_{NCX} a portare a valori di potenziale di membrana sufficientemente alti per l'attivazione della corrente del calcio. Dal tracciato in linea rossa invece viene confermato che senza il contributo di I_{CaL} al potenziale si ottiene comunque un AP abortito dovuto a J_{rel} e I_{NCX} ma solo molto più tardi, a valori più alti di calcio nel subspace. In figura 4.6b viene riportato lo stesso tipo di analisi applicata al modello Maltsev2009 (stesso codice colori).

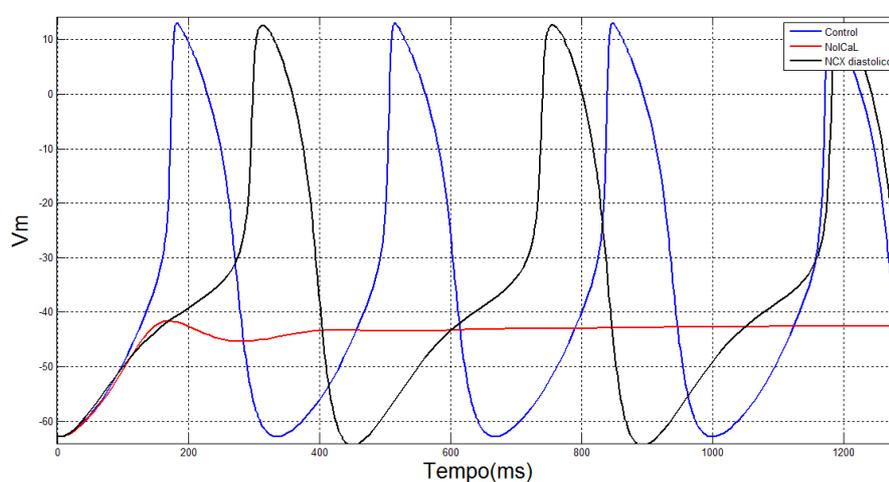


Figura 4.6b: Andamento del potenziale d'azione nel modello Maltsev2009 in condizioni basali (blu), con I_{NCX} diastolica (nero) e senza I_{CaL} (rosso)

Questa prova indica come possibile modifica al modello un'alterazione delle cinetiche di attivazione di I_{CaL} e di rilascio dal reticolo. Sono state svolte due analisi preliminari sul comportamento della corrente di release di calcio reticolare. Tale corrente viene modellata attraverso tre termini: una conduttanza massima, un termine di gradiente di calcio (differenza fra concentrazione di calcio interna ed esterna al reticolo) e un coefficiente relativo allo stato di apertura dei canali, determinato tramite un modello markoviano (vedi figura 4.7).

$$j_{SRCarel} = ks \cdot O \cdot (Ca_{jsr} - Ca_{sub})$$

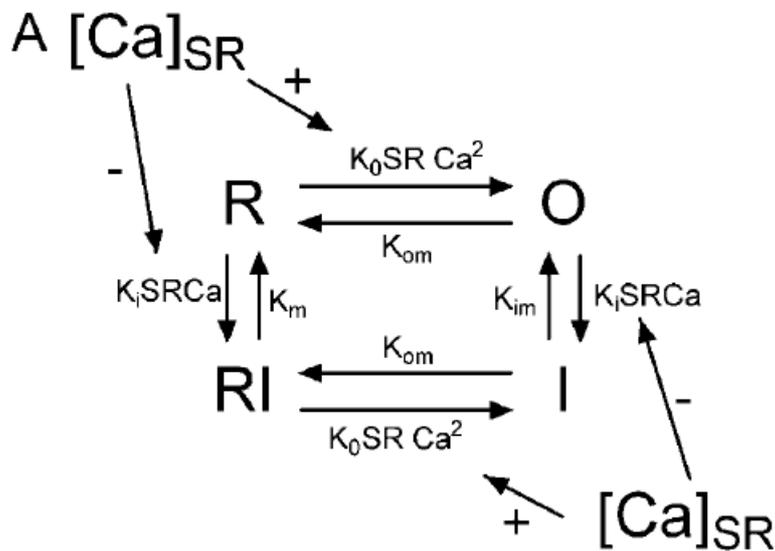


Figura 4.7: Espressione della corrente di rilascio del calcio reticolare (in alto) e stati del relativo modello markoviano (in basso)

La prima prova svolta è stata quella di bloccare ad un valore fisso la concentrazione di calcio reticolare Ca_{jSR} e permettere l'evoluzione libera del sistema a partire da diversi valori iniziali di calcio di subspace. È stato notato che il meccanismo di CICR, fisiologicamente indotto da concentrazioni di calcio di subspace superiori ad una certa soglia, scatta nel modello a qualsiasi valore di concentrazione Ca_{sub} iniziale. Per svolgere un'analisi più chiara è stata allora isolata la sola equazione della corrente J_{rel} , impostando valore costante per Ca_{jSR} (0.4 mM, valore di diastole) e valore costante crescente per Ca_{sub} .

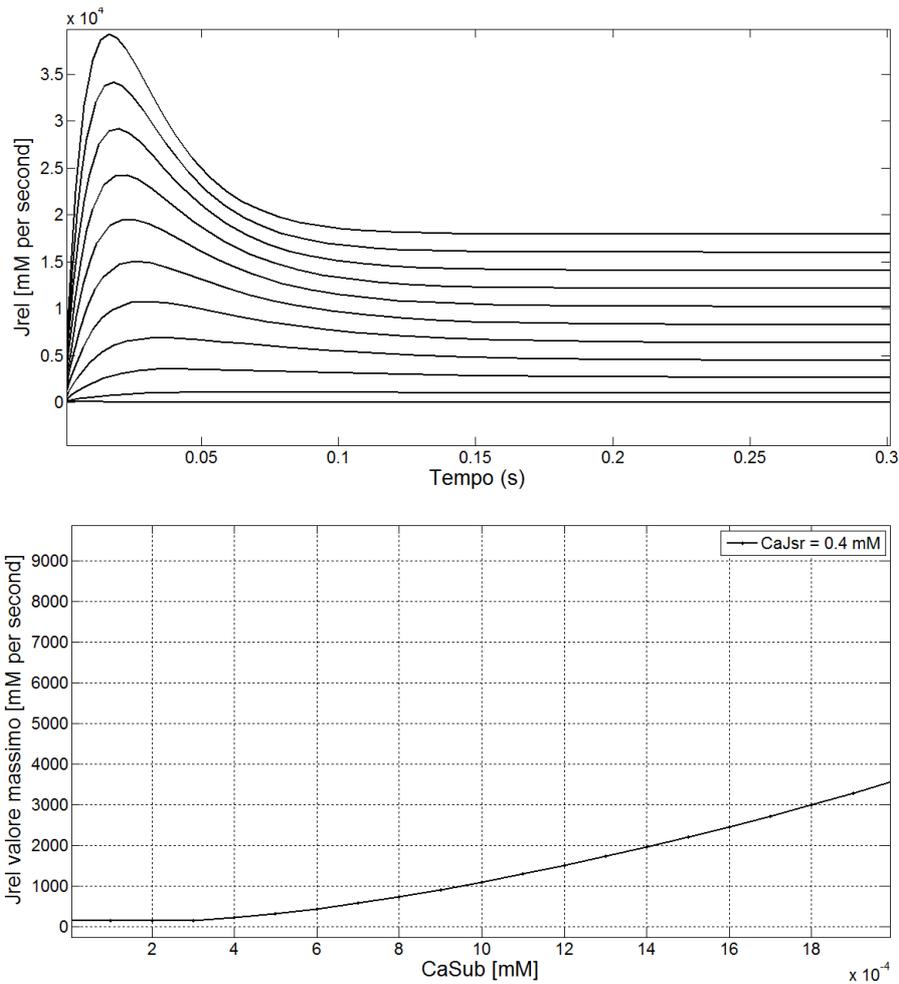


Figura 4.8: Corrente di rilascio reticolare nel tempo per diversi valori di Ca_{sub} (in alto) e confronto dei valori massimi raggiunti, sempre in funzione di Ca_{sub} (in basso)

Osservando i grafici in figura 4.8, si nota come sia presente un valore di Ca_{sub} per cui l'intensità massima di corrente reticolare subisce un aumento leggermente più ripido, ma tale valore si trova lontano dalla zona di lavoro del modello (in fase diastolica), e in ogni caso l'andamento non ha una variazione sufficientemente drastica da far pensare alla presenza di una vera e propria soglia di induzione del CICR. Questa caratteristica ha fatto sì che J_{rel} diventasse un'importante candidata per modifiche successive.

4.3 – Buffering del calcio e possibile esistenza dello spazio diadico

Anche se lo studio preliminare del paragrafo precedente ha messo in luce I_{CaL} e J_{rel} come principali candidate per indagini successive, sono stati studiati altri due aspetti della gestione del calcio con possibili influenze sulla sequenza temporale di attivazione delle correnti e sulla riproduzione dei dati della rianodina.

Uno di questi aspetti è la presenza, nelle equazioni di gestione del calcio importate dal modello Maltsev, del *buffering* del calcio intracellulare. Per *buffering* si intende il fenomeno per cui alcune molecole presentano siti di legame per uno ione e la loro presenza in soluzione permette di smorzare le oscillazioni nella concentrazione dello ione. In questo caso specifico sono state analizzate la provenienza e il ruolo delle equazioni relative alla Calmodulina, sostanza presente nel citoplasma e in grado di bufferizzare il calcio smorzandone i transienti. Il modello Maltsev importa direttamente le equazioni del *buffering* dal modello Kurata (Kurata2002, da cui eredita anche altri aspetti della dinamica del calcio). Kurata adotta dai modelli di Demir (Demir1994) e Lindblad (Lindblad1996) le cinetiche e la quantità totale di calmodulina disponibile per il binding, scalando i valori dei ratei cinetici per la diversa temperatura di lavoro. Va però riportato che Demir simula con il suo modello una cellula di tipo “transitional” ovvero una cellula senoatriale con caratteristiche vicine a quelle atriali. Inoltre Demir indica come alcuni dati non disponibili per cellule SAN di coniglio siano stati rimpiazzati con valori provenienti da cellule atriali o ventricolari (principalmente per quanto riguarda la quantità totale di calmodulina). Andando ad analizzare il lavoro di Robertson (Robertson1981) da cui Demir e Lindblad prendono a loro volta i valori dei ratei cinetici, si scopre inoltre che anch’essi sono modellati al calcolatore e in base a dati sperimentali

ottenuti solo in condizioni di regime (i ratei non sono misurati direttamente). Data la quantità di modifiche e approssimazioni già presenti in queste equazioni e la scarsità di dati disponibili si è deciso di non farne l'obiettivo principale per cambiare il comportamento del modello. Sono comunque state svolte alcune prove che hanno dimostrato come persino l'azzeramento della quantità totale di calmodulina non influisca in modo significativo sul valore diastolico di calcio di subspace e sulla durata dell'AP (esempio in figura 4.9).

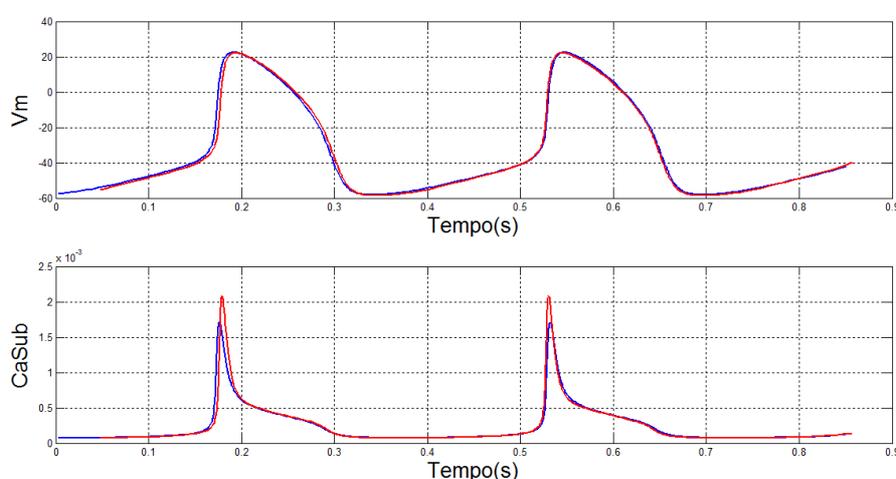


Figura 4.9: Gli AP (in alto) e l'andamento del calcio di subspace non presentano variazioni significative sia in presenza di calmodulina (quantità originale, in blu) sia in sua assenza (CM=0, in rosso)

Nel paragrafo precedente è stato indicato come la corrente I_{CaL} si attivi in anticipo rispetto alla sequenza temporale prevista. Una possibile alternativa all'alterazione delle sue cinetiche è anticipare l'attivazione del meccanismo del CICR, con conseguente scatto anticipato di J_{rel} e I_{NCX} (sensibile al calcio intracellulare). Per fare questo, senza modificare la formulazione di J_{rel} (strada comunque percorsa) è stata presa in considerazione la possibilità di aumentare la concentrazione di calcio intracellulare percepita dai canali RyR tramite la creazione di un compartimento di volume ridotto. Nel modello Severi2012 è già presente la suddivisione (solo in termini di gestione del calcio) in due

compartimenti citoplasmatici, ovvero il già citato subspace (o spazio di subsarcolemma) e il citoplasma vero e proprio. Tale suddivisione è però soltanto funzionale, in quanto gli ioni calcio tendono a depositarsi in grandi quantità vicino alla membrana dopo il loro ingresso nella cellula, per poi diffondere verso l'interno in modo più lento. Lo spazio di subsarcolemma non è quindi un compartimento di tipo anatomico. È però presente nelle cellule ventricolari il cosiddetto *dyadic space*, o spazio diadico (definito anche *cleft*). Come rappresentato in figura 4.10, si tratta di una zona di stretto accoppiamento fra i canali del calcio membranali e i recettori della rianodina, che quindi percepiscono transienti di calcio molto più alti (e concentrazioni più alte anche in diastole, ad attività di I_{CaL} ridotta). È stata quindi svolta una ricerca in letteratura per indagare sulla possibile esistenza di uno spazio di cleft anche nelle cellule senoatriali, in previsione di una sua inclusione nel modello. Secondo Himeno (Himeno2011) il reticolo sarcoplasmatico è poco sviluppato nel nodo senoatriale e la mancanza dei T-tubuli impedisce la formazione di uno spazio diadico. Anche Bleeker (Bleeker1980) scrive della presenza ridotta e disorganizzata di reticolo e miofibrille nelle cellule senoatriali. Un articolo di Rigg (Rigg2000) si basa su una tecnica di *labelling* per identificare la distribuzione dei recettori RyR all'interno di cellule senoatriali di *guinea pig*, osservando la loro presenza nello spazio submembranale e nella zona più interna della cellula secondo bande periodiche. In ogni caso la letteratura esclude la presenza di un'organizzazione spaziale come quella ventricolare, perciò l'implementazione di un compartimento aggiuntivo nel modello è stata esclusa.

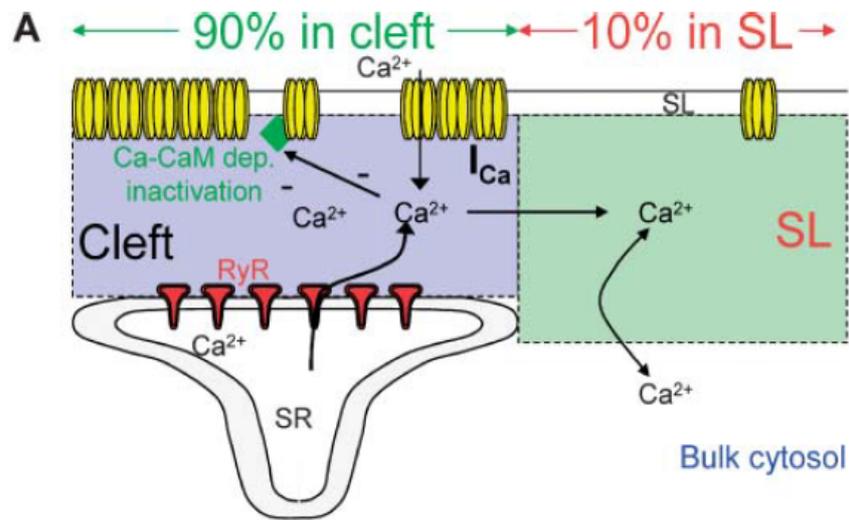


Figura 4.10: Concentrazione della maggior parte dei canali del calcio L-type in un *cleft space* che si affaccia sul reticolo sarcoplasmatico e sui recettori RyR, per cellula ventricolare (Shannon2004)

4.4 – Modifiche alla corrente di calcio L-Type e alla corrente di rilascio reticolare

La formulazione di J_{rel} , ereditata dal modello Maltsev assieme al resto della dinamica del calcio, è già stata riportata in figura 4.7: si tratta di un'equazione e di un modello markoviano presi dal modello di cellula ventricolare di Shannon con un riadattamento del valore massimo di corrente rappresentato dal coefficiente K_s (da 25/ms in Shannon a 250000/ms in Maltsev). Shannon eredita a sua volta la formulazione markoviana da Stern (Stern1999). Analizzando il comportamento del modello di questa corrente su COR è possibile accorgersi che lo stato O (*open*, canale aperto) assume sia nel modello Maltsev che nel modello Severi dei valori ridottissimi (nell'ordine di 10^{-7} – 10^{-5}) anche nel momento di maggiore apertura (durante il CICR). Volendo dare un'interpretazione fisica a questo dato (assieme all'alto valore di intensità massima di corrente attribuito da Maltsev), è come ipotizzare la presenza di una grande popolazione di recettori rianodinici dei quali

però più del 99% rimane sempre inattivo, anche durante il momento in cui è necessario lo svolgimento della loro funzione primaria.

Si è deciso a questo punto di effettuare una serie di modifiche al modello Severi2012: tali modifiche sono state applicate mantenendo come obiettivo la possibilità di riprodurre gli effetti sperimentali della rianodina e di proporre una sequenza di eventi intracellulari come quella descritta in figura 4.5. Data la scarsità di dati sperimentali relativi a tali fenomeni, si è tentato di mantenere come riferimento la riproduzione di transienti di concentrazione del calcio simili (in termini di andamento e intervallo di valori) a quelli del modello originale e di Maltsev2009. Di seguito vengono elencate sinteticamente le modifiche svolte, per poi descrivere le motivazioni che ne erano alla base:

- Sostituzione nel modello markoviano di J_{rel} del termine Ca_{Sub}^2 con un termine sigmoideale del tipo

$$\frac{3}{1 + e^{\frac{-(Ca_{Sub}-0.0005)}{0.00009}}}$$

(Tale termine è presente nel rateo di transizione fra gli stati R→O e RI→I)

- Shift di 1 mV nella dipendenza dal potenziale di membrana del valore di regime della corrente di calcio I_{CaL} , in direzione positiva (ovvero attivazione della corrente a potenziali più alti)
- $KoCa$: ridotto da 10000 a 10
- Ks : ridotto da 250000000 a 250000
- P_{up_basal} : aumentato da 12 a 60

Lo shift nella variabile di gating della corrente I_{CaL} è stato inserito per ritardarne l'attivazione rispetto alla corrente di release reticolare. Tale

modifica rimane comunque pienamente compatibile con i dati sperimentali: si noti in figura 4.11 come lo stesso modello Maltsev inserisca nella propria formulazione uno shift molto maggiore allontanandosi in modo consistente dai dati a disposizione.

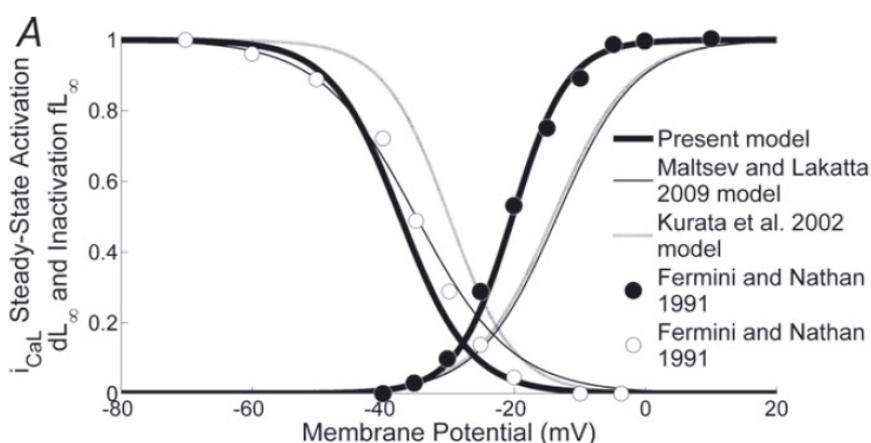


Figura 4.11: Dati sperimentali (punti) e formulazioni modellistiche (linee) per l'attivazione e inattivazione di I_{CaL} (Severi2012)

Le variazioni di $KoCa$ e Ks sono state inserite per passare ad una formulazione della corrente di release in cui una frazione maggiore di canali RyR risulta aperta durante il meccanismo del CICR (e dove invece esiste una minore popolazione di canali puramente inattivi). Il valore di $KoCa$ andrebbe per questo motivo aumentato: nell'elenco delle modifiche viene invece diminuito (di 1000 volte) in quanto viene anche eliminato il termine Ca_{Sub}^2 , termine che assume valori molto ridotti (ad esempio 10^{-8}). Viene perciò effettuata una semplificazione fra le due modifiche. Ca_{Sub}^2 viene sostituito da una sigmoide in tutti i ratei che lo contengono per rappresentare una transizione più netta fra la chiusura e apertura di massa dei canali RyR. L'alterazione delle cinetiche di J_{rel} ha anche reso necessario aumentare l'intensità massima di lavoro della pompa SERCA (formulata secondo Kurata2002, che a sua volta riprende alcune semplici formulazioni passate per mancanza di dati più dettagliati).

In figura 4.12 vengono riportati l'AP originale del modello (in nero) e quello risultante dalle modifiche (in rosso).

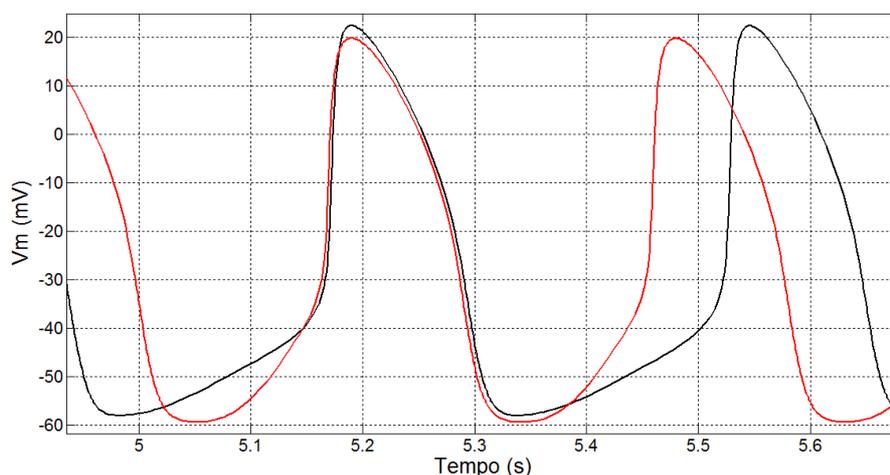


Figura 4.12: AP del modello Severi2012 prima delle modifiche (in nero) e dopo le modifiche (in rosso)

L'MDP scende da -58 mV a -59.5 mV, valore compatibile con i dati sperimentali riportati nell'articolo Severi2012 che indicano un range di -66÷-52 mV. Il potenziale di overshoot passa da +22.4 mV a 19.8 mV, leggermente inferiore al limite minimo riportato nell'articolo (+20 ÷ +32 mV): si tratta comunque di un parametro relativo alla fase di sistole, mentre l'indagine corrente è incentrata sui fenomeni del pacemaking e del CICR, più legati alla diastole. Il modello passa inoltre da un *Cycle Length* (ovvero il periodo delle oscillazioni) di 355 ms ad uno di 290 ms, ovvero da una frequenza di 2.8 Hz ad una di 3.4 Hz. Tali valori sono compatibili con il range sperimentale di 247÷389 ms.

In figura 4.13 è riportato l'effetto sull'AP della simulazione dell'applicazione di rianodina: si ottiene un aumento del CL (*Cycle Length*) da 290 ms a 371 ms, ovvero una diminuzione di frequenza da 3.4 Hz a 2.7 Hz. Tale abbassamento di frequenza corrisponde ad una

diminuzione del -22%: questo valore, pur essendo ancora distante dal -30% riportato sperimentalmente, corrisponde ad un netto miglioramento rispetto alla mancata variazione di frequenza del modello originale. Si notano anche gli stessi effetti presenti simulando la rianodina nel modello Maltsev (figura 4.4), ovvero leggero innalzamento dell'MDP, abbassamento del potenziale di overshoot e alterazione della forma d'onda in diastole.

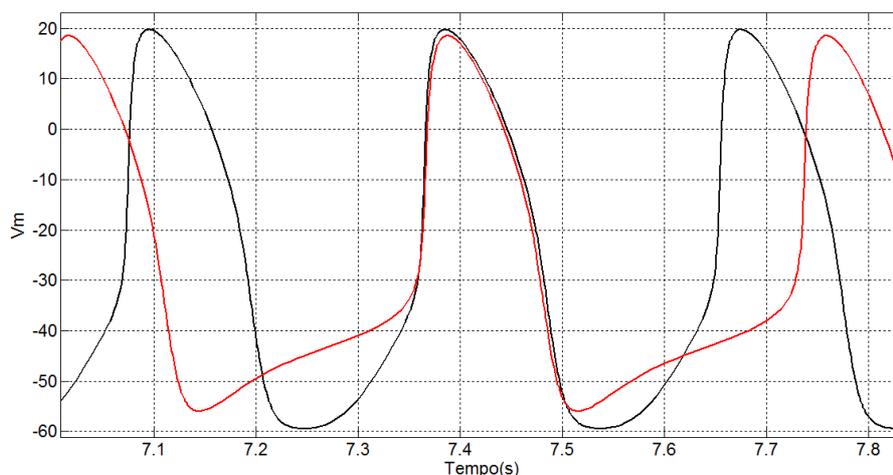


Figura 4.13: Effetto dell'applicazione di rianodina al modello modificato

Il modello Severi2012 originale implementa al suo interno anche la possibilità di simulare l'applicazione di ivabradina. È stata utilizzata tale funzionalità per verificare se le modifiche riportate al modello avessero in qualche modo alterato la possibilità di riprodurre i dati dell'ivabradina: è stato osservato un aumento di CL da 290 ms a 346 ms, corrispondente ad una riduzione di frequenza da 3.4 Hz a 2.9 Hz, ovvero -16.5%. Tale valore è consistente con il range di dati sperimentali riportato nell'articolo Severi2012 proveniente da Bucchi2007.

In figura 4.14 viene riportato il risultato dell'analisi svolta anche sul modello originale (Figura 4.6) riguardante la rimozione del contributo della corrente I_{CaL} e dell'alterazione di I_{NCX} .

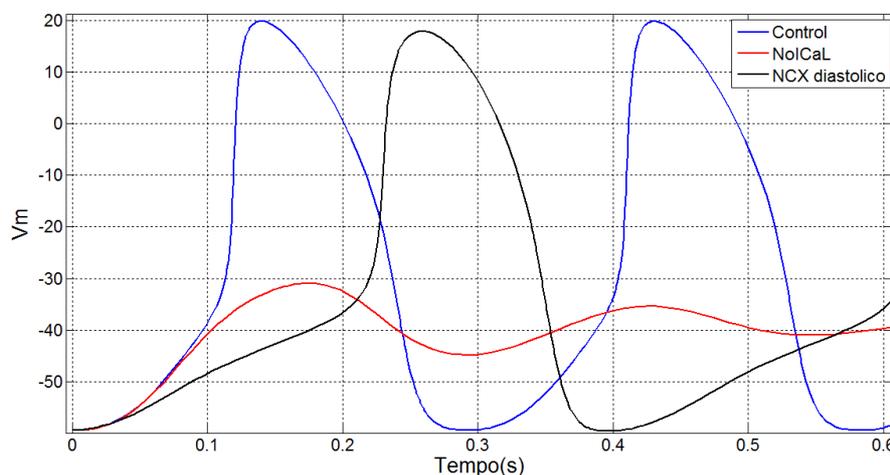


Figura 4.14: Andamento del potenziale d'azione nel modello Severi2012 modificato in condizioni basali (blu), con I_{NCX} diastolica (nero) e senza I_{CaL} (rosso)

Si può commentare il risultato ottenuto osservando che in figura 4.6, senza il contributo di I_{CaL} (linea rossa) si ottiene comunque una lieve oscillazione dovuta a J_{rel} . Osservando invece la linea nera, corrispondente ad una simulazione in cui la corrente di scambiatore Na-Ca non supera mai il valore diastolico (necessario per mantenere stabile l'MDP), si può affermare che l'intensificazione della corrente di scambiatore è determinante per far scattare l'upstroke sufficientemente presto: in sua assenza, la depolarizzazione continua in maniera lenta e costante fino a raggiungere (molto più lentamente) il valore di potenziale sufficiente ad attivare I_{CaL} .

La variante di modello proposta si può quindi considerare compatibile con la sequenza di eventi cellulari ipotizzata in figura 4.5 e riesce in ogni caso a riprodurre qualitativamente gli effetti di rianodina e ivabradina senza drastiche alterazioni (in condizioni basali)

all'andamento dei transienti del calcio. Il modello si avvicina molto a riprodurre tali dati anche in maniera quantitativa, necessitando solo dell'esplorazione più dettagliata dei possibili valori parametrici di interesse, legati all'anticipazione dell'azione di rilascio reticolare e al ritardo dell'azione della corrente di calcio L-type: nelle conclusioni verranno descritte le implicazioni di questa analisi, unite ai risultati ottenuti in dynamic clamp, per lo studio del pacemaking.

Vengono ora descritte a scopo illustrativo altre modifiche applicate ai parametri del modello. La variante proposta sopra è infatti un'ottima prova di concetto per dimostrare l'importanza dell'azione della corrente di scambiatore nell'ultima fase della depolarizzazione, ma i risultati ottenuti vanno a scapito della forma del potenziale d'azione. Sperimentalmente si ha una transizione piuttosto netta fra la fase di depolarizzazione (sostanzialmente lineare) e l'upstroke, mentre in figura 4.12 si può osservare che il nuovo modello (in linea rossa) non presenta questa caratteristica. Sono state effettuate le seguenti modifiche (rispetto al modello originale Severi2012):

- Shift di 1 mV del gate di attivazione dL della corrente di calcio I_{CaL} in direzione positiva (ovvero attivazione della corrente a potenziali più alti)
- $KoCa$ impostato a 1000
- Ks impostato a 2500
- Sostituzione nel modello markoviano di J_{rel} del termine Ca_{sub}^2 con un termine sigmoidale del tipo

$$\frac{3}{1 + e^{\frac{-(Ca_{sub} - 0.00014)}{0.000011}}}$$

(Tale termine è presente nel rateo di transizione fra gli stati $R \rightarrow O$ e $RI \rightarrow I$)

- P_{up_basal} lasciato inalterato (valore 12)

Lo shift dell'attivazione della corrente di calcio è già stato giustificato sopra. La dipendenza sigmoideale del rateo di transizione in J_{rel} è stata spostata a valori più bassi di calcio di subsarcolemma ed è stata resa più netta. L'alterazione di K_s e K_o permette inoltre di considerare una popolazione di canali RyR ancora meno numerosa ma dalla dinamica di apertura/chiusura ancora più rapida. In figura 4.15 è riportato l'AP risultante (in rosso).

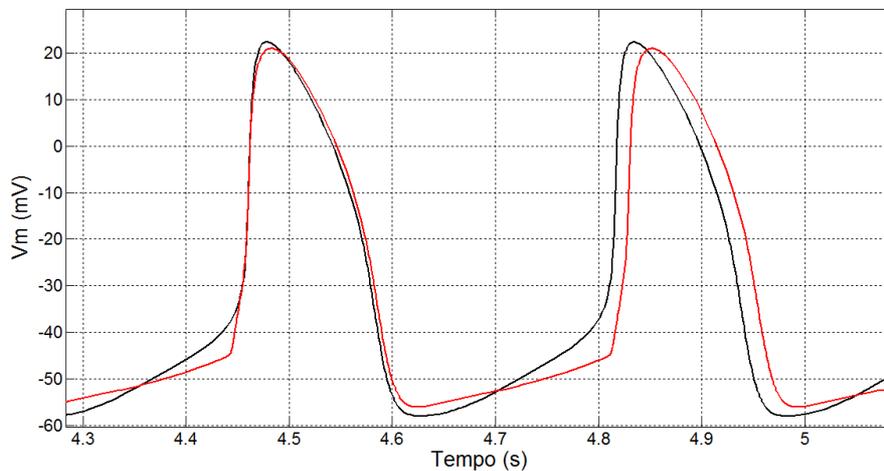


Figura 4.15: Andamento del potenziale d'azione nel modello Severi2012 (in nero) e nella versione con transizione più netta fra diastole e upstroke (rosso)

Si può notare come la transizione diastole/upstroke sia effettivamente più netta rispetto alla variante precedente. Durante la simulazione al calcolatore è stato osservato un ulteriore punto a favore, ovvero l'aumento della frazione di apertura dei canali RyR: la percentuale di canali aperti oscilla in questo caso fra 0% (o valore similmente trascurabile) e 60%, valore molto più fisiologico dei precedenti. Sebbene sia stata raggiunta una forma soddisfacente per l'AP basale, tale AP risulta rallentato (CL 369 ms contro i 355 ms del modello originale); è inoltre molto debole la riproduzione dell'effetto in frequenza della rianodina (CL da 369 ms a 388ms, ovvero -4.9% in

frequenza). Si è deciso di prendere in considerazione questa variante del modello come possibile punto di partenza per indagini modellistiche future, traendo però le conclusioni di questo lavoro sulla base della versione presentata in precedenza che riproduce gli effetti della rianodina.

CONCLUSIONI

Lo scopo del lavoro svolto è stato quello di studiare il pacemaking cardiaco senoatriale indagando l'importanza dei contributi forniti a questo fenomeno dai due meccanismi cellulari maggiormente coinvolti, ovvero la corrente funny (I_f) e le oscillazioni del calcio intracellulare. La diversa natura di questi meccanismi ha portato a metodi di indagine diversificati: il ruolo di I_f è stato studiato tramite l'innovativa tecnica del dynamic clamp, mentre data la delicata natura delle dinamiche intracellulari (e la conseguente scarsità di dati sperimentali) il ruolo del calcio è stato studiato tramite analisi modellistica.

Lo studio di I_f tramite dynamic clamp, seppur nella sua fase iniziale, si è rivelato utile anche per comprendere meglio il funzionamento di questa tecnica, le sue potenzialità ed i suoi attuali limiti. È stato implementato un sistema di dynamic clamp per lo studio di questa corrente prendendo accorgimenti specifici per via della sua intensità molto ridotta e della presenza di rumore. Il sistema si è dimostrato efficace nell'acquisizione in tempo reale del potenziale di membrana cellulare, nel calcolo della corrispondente corrente simulata e nella sua iniezione in modalità di current clamp. Analizzando i risultati ottenuti su cellule di coniglio sottoposte a blocco farmacologico parziale di I_f si può affermare che il dynamic clamp si è dimostrato un valido approccio per sostituire la frazione di corrente mancante e riportare il potenziale d'azione della cellula in condizioni basali (sia in termini di forma d'onda che di frequenza). Osservando sia l'effetto del farmaco (Ivabradina) che della corrente simulata iniettata, si può dedurre come la corrente I_f sia un fondamentale meccanismo di regolazione della frequenza di pacemaking. Per quanto riguarda l'entità della corrente I_f necessaria alla singola cellula, data l'estrema variabilità dei dati, per

fornire una stima più precisa si rende necessaria la costruzione di una statistica più robusta basata su un maggior numero di cellule. Al momento i risultati ottenuti mostrano che la densità di corrente proposta nel modello Maltsev-Lakatta appare insufficiente, mentre per quella proposta dal modello Severi-DiFrancesco i risultati sono al momento contrastanti. Va però fatto notare che i risultati ottenuti sulla cellula con il potenziale d'azione più somigliante a quello senoatriale puro indicano come persino la corrente del modello Severi-DiFrancesco possa essere sottostimata.

Lo studio modellistico della dinamica del calcio intracellulare è stato svolto su un set di equazioni matematiche che i modelli Severi e Maltsev condividono, ma che portano a risultati diversi in base alla diversa interazione con le correnti di membrana. Il modello Maltsev si è dimostrato in grado di riprodurre gli effetti di diminuzione di frequenza causati dalla somministrazione di rianodina, ma solamente simulando la somministrazione della sostanza in modo completamente diverso da quanto fatto dagli autori originali. È stata determinata l'impossibilità di giustificare morfologicamente l'inserimento di un compartimento cellulare analogo allo spazio diadico delle cellule ventricolari. È stata analizzata anche la formulazione della corrente di rilascio di calcio reticolare, derivata da una formulazione per cellule ventricolari e anch'essa manipolata più volte negli studi successivi. Sono poi state apportate modifiche al modello di rilascio del reticolo ed alla corrente dei canali di calcio L-type, il tutto allo scopo di riprodurre i dati della rianodina anche nel modello Severi-DiFrancesco, originariamente non in grado di farlo. È stata ottenuta una variante del modello che, oltre a riprodurre quasi totalmente la diminuzione di frequenza rilevata sperimentalmente, fornisce anche una prospettiva alternativa sulla catena di eventi cellulari che determinano il fenomeno della depolarizzazione nelle cellule

pacemaker. Tale sequenza consiste nell'attivazione in serie della corrente di rilascio reticolare e della corrente di calcio L-type solo grazie alla mediazione svolta dallo scambiatore sodio-calcio, che contribuisce in modo determinante alla fase finale della depolarizzazione. Di questa sequenza costituisce comunque parte integrante e fase iniziale l'azione di I_f .

In conclusione, in base agli esperimenti svolti è stata dimostrata la validità del dynamic clamp come metodo di indagine elettrofisiologica, applicando per la prima volta questa tecnica allo studio della corrente I_f . Inoltre è stato confermato che la corrente I_f gioca un ruolo importante nella generazione del pacemaking (a differenza di quanto si afferma nella teoria del calcium clock). L'analisi modellistica ha invece confermato, mediante la riproduzione dei risultati degli esperimenti con Rianodina, l'ipotesi interpretativa formulata riguardante la catena di processi fisiologici che portano alla depolarizzazione della cellule pacemaker.

APPENDICE A – CODICE MODULI SOFTWARE RTXI

Offset.h

```
#include <default_gui_model.h>

class offset : public DefaultGUIModel {

public:
    offset(void);
    virtual ~offset(void);

    virtual void execute(void);

protected:
    virtual void
    update(DefaultGUIModel::update_flags_t);

private:
    double offset_par;

};
```

Offset.cpp

```
#include "offset.h"
#include <math.h>

extern "C" Plugin::Object *createRTXIPlugin(void) {
    return new offset();
}

static DefaultGUIModel::variable_t vars[] = {

    { "offset_value", "", DefaultGUIModel::OUTPUT,
},

    { "offset_par", "pA",
DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },

};

static size_t num_vars =
sizeof(vars)/sizeof(DefaultGUIModel::variable_t);

offset::offset(void)
    : DefaultGUIModel("offset", ::vars, ::num_vars) {
    createGUI(vars, num_vars);
    update( INIT);
    refresh();
}
```

```

}

offset::~~offset(void) {}

void offset::execute(void) {
    output(0)=offset_par*1e-12; }

void offset::update(DefaultGUIModel::update_flags_t
flag) {

    switch (flag)
    {
    case INIT:

        offset_par=0;
        setParameter("offset_par",offset_par);

        break;

    case MODIFY:

        offset_par =
getParameter("offset_par").toDouble();
        break;

    case PAUSE:
        output(0) = 0;
        break;

    case PERIOD:
        break;

    default: break;
    }
}

```

i_f.h

```

#include <default_gui_model.h>

class i_f : public DefaultGUIModel {

public:

    i_f(void);
    virtual ~i_f(void);
    virtual void execute(void);

protected:

    virtual void
update(DefaultGUIModel::update_flags_t);

```

```

private:
    //-----Parametri in comune per i due modelli
    double V;
    double period;
    int steps;
    double Ko;
    double Ki;
    double Nao;
    double Nai;
    double E_Na;
    double E_K;
    double Cm;
    double rate;
    double V_offset;
    double model_flag;

    double Km_f;
    double dif_g_f_Na;
    double dif_g_f_K;
    double dif_y_gate;
    double dif_V_shift;
    double dif_i_f_scale;
    double dif_i_offset;

    double lak_g_f_scale;
    double lak_g_f_Na;
    double lak_g_f_K;
    double lak_i_f_scale;
    double lak_V_shift;
    double lak_y_gate;
    double lak_i_offset;
};

```

i_f.cpp

```

#include "i_f.h"
#include <math.h>

extern "C" Plugin::Object *createRTXIPlugin(void) {
    return new i_f();
}

static DefaultGUIModel::variable_t vars[] = {
    { "Vm", "", DefaultGUIModel::INPUT, },
    { "i_f_value", "", DefaultGUIModel::OUTPUT, },
    { "rate", "Hz", DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::UINTEGER, },
    { "Cm", "pF", DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },

```

```

        { "Nao", "mM", DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },
        { "Nai", "mM", DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },
        { "E_Na", "mV", DefaultGUIModel::STATE, },
        { "Ko", "mM", DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },
        { "Ki", "mM", DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },
        { "E_K", "mV", DefaultGUIModel::STATE, },
        //offset sulla lettura del potenziale in
ingresso
        { "V_offset", "mV", DefaultGUIModel::PARAMETER
| DefaultGUIModel::DOUBLE, },
        { "Model Flag", "0-DiFrancesco 1-Lakatta",
DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::UINTEGER, },

        { "dif_g_f_Na", "microS",
DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },
        { "dif_g_f_K", "microS",
DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },
        { "dif_i_f_scale", "Dimensionless",
DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },
        { "dif_V_shift", "mV",
DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },
        { "dif_y_gate", "Y Gate Activation",
DefaultGUIModel::STATE, },
        { "dif_i_offset", "nA",
DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },

        { "lak_g_f_Na", "nanoS/picoF",
DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },
        { "lak_g_f_K", "nanoS/picoF",
DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },
        { "lak_i_f_scale", "Dimensionless",
DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },
        { "lak_V_shift", "mV",
DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },
        { "lak_y_gate", "Y Gate Activation",
DefaultGUIModel::STATE, },

```

```

        { "lak_i_offset", "pA",
DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },

};

static size_t num_vars =
sizeof(vars)/sizeof(DefaultGUIModel::variable_t);

static inline double dif_y_inf(double V, double
V_shift) {
    return 1.0/(1.0+exp((V+52.5-V_shift)/9.0)); }
static inline double dif_tau_y(double V, double
V_shift) {
    return 0.7166529/(0.0708*exp(-(V+5.0-
V_shift)/20.2791)+10.6*exp((V-V_shift)/18.0)); }

static inline double lak_y_inf(double V, double
V_shift) {
    double V_i_f_half = -64.0;
    return 1.0/(1.0+exp((V-V_i_f_half-
V_shift)/13.5)); }
static inline double lak_tau_y(double V, double
V_shift) {
    return 0.7166529/(exp(-(V+386.9-
V_shift)/45.302)+exp((V-73.08-V_shift)/19.231));}

i_f::i_f(void)
: DefaultGUIModel("i_f", ::vars, ::num_vars) {
    createGUI(vars, num_vars);
    period = RT::System::getInstance()-
>getPeriod()*1e-6;

    steps =
static_cast<int>(ceil(period*rate/1000.0));
    update( INIT);
    refresh();
}

i_f::~~i_f(void) {}

void i_f::execute(void) {

    V=input(0)*1000+V_offset;

    double dydt;
    double dt;
    double temp_current;

    if (model_flag==0) {
        dt=(period/steps)/1000;

```

```

        for(int i = 0;i < steps;++i) {
            dydt =
(dif_y_inf(V,dif_V_shift)-
dif_y_gate)/dif_tau_y(V,dif_V_shift);
            dif_y_gate += dt*dydt;
        }
        temp_current= -(
pow(dif_y_gate,2.0)*Ko/(Ko+Km_f)*( dif_g_f_Na*(V-
E_Na) + dif_g_f_K*(V-E_K) ) *Cm/32 -
dif_i_offset)*dif_i_f_scale;
        temp_current=temp_current*1e-9;
    }
    else {
        dt=(period/steps);

        for(int i = 0;i < steps;++i) {
            dydt = (lak_y_inf(V,lak_V_shift)-
lak_y_gate)/lak_tau_y(V,lak_V_shift);
            lak_y_gate += dt*dydt;
        }

temp_current= -( Cm*pow(lak_y_gate, 2.0) *
(lak_g_f_Na * (V-E_Na) + lak_g_f_K * (V-E_K) ) -
lak_i_offset ) * lak_i_f_scale ;
        temp_current=temp_current*1e-12;
    }
    output(0)=temp_current;
}

const double R = 8314; // Universal Gas Constant
(J/kmol*K)
const double frdy = 96485; // Faraday's Constant
(C/mol)
const double temp = 310; // Temperature (K)

void i_f::update(DefaultGUIModel::update_flags_t
flag) {

    switch (flag)
    {
    case INIT:

        Cm = 32;
        Nao = 140;
        Nai = 7.5;
        Ko = 5.4;
        Ki = 140;
        E_K = ((R*temp)/frdy)*log(Ko/Ki);
        E_Na = ((R*temp)/frdy)*log(Nao/Nai);
        rate = 100000;
        V_offset=0;

```

```

model_flag=0;

V=input(0)*1000+V_offset;

dif_g_f_Na = 0.03;
dif_g_f_K = 0.03;
dif_i_f_scale= 1 ;
dif_V_shift=0;
dif_i_offset=0;
dif_y_gate=0.181;
Km_f = 45.0;

lak_g_f_scale = 0.15;

lak_g_f_Na = 0.3833*lak_g_f_scale;
lak_g_f_K = 0.6167*lak_g_f_scale;
lak_i_f_scale= 1 ;
lak_V_shift=0;
lak_i_offset=0;
lak_y_gate=0.181;

setParameter("Cm",Cm);
setParameter("Nao",Nao);
setParameter("Nai",Nai);
setParameter("Ko",Ko);
setParameter("Ki",Ki);
setParameter("rate",rate);
setState("E_Na",E_Na);
setState("E_K",E_K);
setParameter("V_offset",V_offset);
setParameter("Model Flag",model_flag);
setParameter("dif_g_f_Na",dif_g_f_Na);
setParameter("dif_g_f_K",dif_g_f_K);
setParameter("dif_V_shift",dif_V_shift);
setParameter("dif_i_f_scale",dif_i_f_scale);
setParameter("dif_i_offset",dif_i_offset);
setState("dif_y_gate",dif_y_gate);
setParameter("lak_g_f_Na",lak_g_f_Na);
setParameter("lak_g_f_K",lak_g_f_K);
setParameter("lak_V_shift",lak_V_shift);
setParameter("lak_i_f_scale",lak_i_f_scale);
setParameter("lak_i_offset",lak_i_offset);
setState("lak_y_gate",lak_y_gate);

break;

case MODIFY:

Cm = getParameter("Cm").toDouble();
Nao = getParameter("Nao").toDouble();
Nai = getParameter("Nai").toDouble();
Ko = getParameter("Ko").toDouble();

```

```

        Ki = getParameter("Ki").toDouble();
        V_offset =
getParameter("V_offset").toDouble();
        E_K = ((R*temp)/frdy)*log(Ko/Ki);
        E_Na = ((R*temp)/frdy)*log(Nao/Nai);
        rate = getParameter("rate").toDouble();
        steps =
static_cast<int>(ceil(period*rate/1000.0));

        model_flag = getParameter("Model
Flag").toDouble();

        dif_g_f_Na =
getParameter("dif_g_f_Na").toDouble();
        dif_g_f_K =
getParameter("dif_g_f_K").toDouble();
        dif_V_shift=getParameter("dif_V_shift").toDoub
le();
        dif_i_f_scale=getParameter("dif_i_f_scale").to
Double();
        dif_i_offset =
getParameter("dif_i_offset").toDouble();
        lak_g_f_Na = getParameter("lak_g_f_Na").toDouble();
        lak_g_f_K = getParameter("lak_g_f_K").toDouble();
        lak_V_shift=getParameter("lak_V_shift").toDouble();
        lak_i_f_scale=
getParameter("lak_i_f_scale").toDouble();
        lak_i_offset =
getParameter("lak_i_offset").toDouble();

        break;

        case PAUSE:
            output(0) = 0;
            break;

        case PERIOD:
            period = RT::System::getInstance()-
>getPeriod()*1e-6; // ms
            steps =
static_cast<int>(ceil(period*rate/1000.0));
            break;
        default: break;
    }
}

```

Delta_current.h

```

#include <default_gui_model.h>

class delta_current : public DefaultGUIModel {

```

```

public:

    delta_current(void);
    virtual ~delta_current(void);

    virtual void execute(void);

protected:
    virtual void
update(DefaultGUIModel::update_flags_t);

private:

    double      V;
    double period;
    int steps;
    double      Ko;
    double      Ki;
    double      Nao;
    double      Nai;
    double      E_Na;
    double      E_K;
    double      Cm;
    double      rate;
    double V_offset;

    double      Km_f;
    double dif_g_f_Na;
    double dif_g_f_K;
    double      dif_y_gate_normal;
    double      dif_y_gate_shifted;
    double dif_V_shift;
    double dif_i_f_scale;
    double dif_i_offset;

};

```

Delta_current.cpp

```

#include "delta_current.h"
#include <math.h> // libreria necessaria per
l'elevamento a potenza

extern "C" Plugin::Object *createRTXIPlugin(void) {
    return new delta_current();
}

static DefaultGUIModel::variable_t vars[] = {
    { "Vm", "", DefaultGUIModel::INPUT, },
    { "delta_value", "", DefaultGUIModel::OUTPUT,
},

```

```

        { "ifn_value", "", DefaultGUIModel::OUTPUT, },
        { "ifs_value", "", DefaultGUIModel::OUTPUT, },
        // frequenza di integrazione delle variabili di
gating in Hertz
        { "rate", "Hz", DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::UINTEGER, },
        { "Cm", "pF", DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },
        { "Nao", "mM", DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },
        { "Nai", "mM", DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },
        { "E_Na", "mV", DefaultGUIModel::STATE, },
        { "Ko", "mM", DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },
        { "Ki", "mM", DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },
        { "E_K", "mV", DefaultGUIModel::STATE, },
        { "V_offset", "mV", DefaultGUIModel::PARAMETER
| DefaultGUIModel::DOUBLE, },

        { "dif_g_f_Na", "microS",
DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },
        { "dif_g_f_K", "microS",
DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },
        { "dif_i_f_scale", "Dimensionless",
DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },
        { "dif_V_shift", "mV",
DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },
        { "dif_y_gate_normal", "Y Gate Activation",
DefaultGUIModel::STATE, },
        { "dif_y_gate_shifted", "Y Gate Activation",
DefaultGUIModel::STATE, },
        { "dif_i_offset", "nA",
DefaultGUIModel::PARAMETER |
DefaultGUIModel::DOUBLE, },

};

static size_t num_vars =
sizeof(vars)/sizeof(DefaultGUIModel::variable_t);

static inline double dif_y_inf(double V, double
V_shift) {
    return 1.0/(1.0+exp((V+52.5-V_shift)/9.0)); }
static inline double dif_tau_y(double V, double
V_shift) {

```

```

        return 0.7166529/(0.0708*exp(-(V+5.0-
V_shift)/20.2791))+10.6*exp((V-V_shift)/18.0)); }

delta_current::delta_current(void)
:
DefaultGUIModel("delta_current", ::vars, ::num_vars)
{
    createGUI(vars, num_vars);
    period = RT::System::getInstance()-
>getPeriod()*1e-6;
    steps =
static_cast<int>(ceil(period*rate/1000.0));

    update( INIT);
    refresh();
}

delta_current::~~delta_current(void) {}

void delta_current::execute(void) {

    V=input(0)*1000+V_offset;

    double dydt;
    double dt;
    double delta;
    double i_f_normal;
    double i_f_shifted;

    dt=(period/steps)/1000;

    for(int i = 0;i < steps;++i) {
        dydt = (dif_y_inf(V,0)-
dif_y_gate_normal)/dif_tau_y(V,0);
        dif_y_gate_normal += dt*dydt;

        dydt =
(dif_y_inf(V,dif_V_shift)-
dif_y_gate_shifted)/dif_tau_y(V,dif_V_shift);
        dif_y_gate_shifted += dt*dydt;
    }

    i_f_normal= -(
pow(dif_y_gate_normal,2.0)*Ko/(Ko+Km_f)*(
dif_g_f_Na*(V-E_Na) + dif_g_f_K*(V-E_K) )*Cm/32 -
dif_i_offset)*dif_i_f_scale;

    i_f_shifted= -(
pow(dif_y_gate_shifted,2.0)*Ko/(Ko+Km_f)*(
dif_g_f_Na*(V-E_Na) + dif_g_f_K*(V-E_K) )*Cm/32 -
dif_i_offset)*dif_i_f_scale;

```

```

        delta=(i_f_shifted-i_f_normal);

        delta=delta*1e-9;

        output(0)=delta;
        output(1)=i_f_normal*1e-9;
        output(2)=i_f_shifted*1e-9;
    }

    const double R = 8314; // Universal Gas Constant
(J/kmol*K)
    const double frdy = 96485; // Faraday's Constant
(C/mol)
    const double temp = 310; // Temperature (K)

void
delta_current::update(DefaultGUIModel::update_flags
_t flag) {

    switch (flag)
    {
    case INIT:

        Cm = 32;
        Nao = 140;
        Nai = 7.5;
        Ko = 5.4;
        Ki = 140;
        E_K = ((R*temp)/frdy)*log(Ko/Ki);
        E_Na = ((R*temp)/frdy)*log(Nao/Nai);
        rate = 100000;
        V_offset=0;

        V=input(0)*1000+V_offset;

        dif_g_f_Na = 0.03;
        dif_g_f_K = 0.03;
        dif_i_f_scale= 1 ;
        dif_V_shift=0;
        dif_i_offset=0;
        dif_y_gate_normal=0.181;
        dif_y_gate_shifted=0.181;

        Km_f = 45.0;

        setParameter("Cm",Cm);
        setParameter("Nao",Nao);
        setParameter("Nai",Nai);
        setParameter("Ko",Ko);
        setParameter("Ki",Ki);
        setParameter("rate",rate);
        setState("E_Na",E_Na);

```

```

        setState("E_K",E_K);
        setParameter("V_offset",V_offset);
        setParameter("dif_g_f_Na",dif_g_f_Na);
        setParameter("dif_g_f_K",dif_g_f_K);
        setParameter("dif_V_shift",dif_V_shift);
        setParameter("dif_i_f_scale",dif_i_f_scale);
        setParameter("dif_i_offset",dif_i_offset);

setState("dif_y_gate_normal",dif_y_gate_normal);
setState("dif_y_gate_shifted",dif_y_gate_shifted);

        break;

        case MODIFY:

                Cm = getParameter("Cm").toDouble();
                Nao = getParameter("Nao").toDouble();
                Nai = getParameter("Nai").toDouble();
                Ko = getParameter("Ko").toDouble();
                Ki = getParameter("Ki").toDouble();
                V_offset =
getParameter("V_offset").toDouble();
                E_K = ((R*temp)/frdy)*log(Ko/Ki);
                E_Na = ((R*temp)/frdy)*log(Nao/Nai);
                rate = getParameter("rate").toDouble();
                steps =
static_cast<int>(ceil(period*rate/1000.0));

                dif_g_f_Na =
getParameter("dif_g_f_Na").toDouble();
                dif_g_f_K =
getParameter("dif_g_f_K").toDouble();
                dif_V_shift=getParameter("dif_V_shift").toDouble();
                dif_i_f_scale=getParameter("dif_i_f_scale").toDouble();
                dif_i_offset =
getParameter("dif_i_offset").toDouble();

                break;

        case PAUSE:
                output(0) = 0;
                break;

        case PERIOD:
                period = RT::System::getInstance()-
>getPeriod()*1e-6; // ms
                steps =
static_cast<int>(ceil(period*rate/1000.0));
                break;

```

```

        default: break;
    }
}

```

AP_gen.h

```

#include <default_gui_model.h>

class AP_gen : public DefaultGUIModel {

public:

    AP_gen(void);
    virtual ~AP_gen(void);
    virtual void execute(void);

protected:
    virtual void
    update(DefaultGUIModel::update_flags_t);

private:
    double period;
    double      V;
};

```

AP_gen.cpp

```

#include "AP_gen.h"
#include <math.h>
#include <iostream>
#include <fstream>

using namespace std;

extern "C" Plugin::Object *createRTXIPlugin(void) {
    return new AP_gen();
}

static DefaultGUIModel::variable_t vars[] = {
    { "Vm", "", DefaultGUIModel::OUTPUT, },
};

static size_t num_vars =
sizeof(vars)/sizeof(DefaultGUIModel::variable_t);

int linecount=0;
double potenziale[1001]={

    -54.0290,
    -53.9175,
    -53.8050,
    -53.6917,

```

```

        -53.5774,
// in questo punto del codice originale sono
presenti tutti I valori del tracciato di AP
        -57.9447
};

AP_gen::AP_gen(void)
    : DefaultGUIModel("AP_gen", ::vars, ::num_vars) {
    createGUI(vars, num_vars);
    period = RT::System::getInstance()-
>getPeriod()*1e-6; // legge il periodo del real-
time in ns, convertito in ms
    update( INIT);
    refresh();
}

AP_gen::~~AP_gen(void) {}

void AP_gen::execute(void) {
    output(0)=potenziale[linecount]/1000;
    linecount++;
    if (linecount >=1000) linecount=0;
}

void AP_gen::update(DefaultGUIModel::update_flags_t
flag) {

    switch (flag)
    {
    case INIT:
        {
            linecount=0;
            output(0)=potenziale[linecount]/1000;
            break;
        }

    case PAUSE:
        output(0) = 0;
        break;

    case PERIOD:
        period = RT::System::getInstance()-
>getPeriod()*1e-6; // ms
        break;

    default: break;
    }
}

```

Makefile (da AP_gen)

```

PLUGIN_NAME = AP_gen

```

```
HEADERS = AP_gen.h
SOURCES = AP_gen.cpp
### Do not edit below this line ###
include $(shell rtxi_plugin_config --pkgdata-
dir)/Makefile.plugin_compile
```

BIBLIOGRAFIA

Anderson RH, Yanni J, Boyett MR, Chandler NJ, Dobrzynski H.

The anatomy of the cardiac conduction system.

Clin Anat. 2009 Jan;22(1):99-113

Anzivino S.

Tesi di laurea in Ingegneria Biomedica – Università di Bologna

Barbuti A, DiFrancesco D

Control of cardiac rate by "funny" channels in health and disease.

Ann N Y Acad Sci. 2008 Mar;1123:213-23.

Bers D.M.

Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force

Second edition – August 2001

Bianchini D.

Tesi di laurea in Ingegneria Biomedica – Università di Bologna

Bleeker WK, Mackaay AJ, Masson-Pévet M, Bouman LN, Becker AE.

Functional and morphological organization of the rabbit sinus node.

Circ Res. 1980 Jan;46(1):11-22

Bogdanov KY, Vinogradova TM, Lakatta EG.

Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na(+)-Ca(2+) exchanger: molecular partners in pacemaker regulation.

Circ Res. 2001 Jun 22;88(12):1254-8.

Boyett MR, Honjo H, Yamamoto M, Nikmaram MR, Niwa R, Kodama I.

Downward gradient in action potential duration along conduction path in and around the sinoatrial node.

Am J Physiol. 1999 Feb;276(2 Pt 2):H686-98.

Bucchi A, Baruscotti M, DiFrancesco D.

Current-dependent block of rabbit sino-atrial node I(f) channels by ivabradine.

J Gen Physiol. 2002 Jul;120(1):1-13.

Cellular Open Resource website: Help Section

<http://cor.physiol.ox.ac.uk/>

Christini DJ, Stein KM, Markowitz SM, Lerman BB.

Practical real-time computing system for biomedical experiment interface

Ann Biomed Eng. 1999 Mar-Apr;27(2):180-6.

Demir SS, Clark JW, Murphey CR, Giles WR.

A mathematical model of a rabbit sinoatrial node cell

Am J Physiol. 1994 Mar;266(3 Pt 1):C832-52

Dhamoon A. S., Jalife J.

The inward rectifier current (ik1) controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis

Heart Rhythm 2005;2:316-324

DiFrancesco, D., and D. Noble.

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

Phil. Trans. R Soc. Lond. B307:353-398,(1985)

DiFrancesco D.

Funny channels in the control of cardiac rhythm and mode of action of selective blockers.

Pharmacol Res. 2006 May;53(5):399-406.

DiFrancesco D.

The role of the funny current in pacemaker activity.

Circ Res. 2010 Feb 19;106(3):434-46.

DiFrancesco D.

Letter - Considerations on the size of currents required for pacemaking

J Mol Cell Cardiol. 2010

DiFrancesco D, Noble D.

Point/Counterpoint -The funny current has a major pacemaking role in the sinus node.

Heart Rhythm. 2012 Feb;9(2):299-301.

Dokos S, Celler B, and Lovell N.

Ion currents underlying sinoatrial node pacemaker activity: a new single cell mathematical model.

J Theor Biol 181: 245–272, 1996.

Fill M, Copello A.J.

Ryanodine Receptor Calcium Release Channels

Physiol Rev January 10, 2002 vol. 82 no. 4 893-922

Garny A, Kohl P & Noble D

Cellular Open Resource (COR): a public CELLML based environment for modelling biological function

International Journal of Bifurcation and Chaos Volume 13: 3579-3590 (2003b)

Grandi E.

Computational analysis of excitability in cardiac myocytes

PhD Thesis, Unibo, 2007

Himeno Y, Toyoda F, Satoh H, Amano A, Cha CY, Matsuura H, Noma A.

Minor contribution of cytosolic Ca²⁺ transients to the pacemaker rhythm in guinea pig sinoatrial node cells

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011 Jan;300(1):H251-61.

Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B.

Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*

J Physiol. 1952 Apr;116(4):424-48

Honjo H, Boyett MR, Kodama I, Toyama J.

Correlation between electrical activity and the size of rabbit sino-atrial node cells.

J Physiol. 1996 Nov 1;496 (Pt 3):795-808.

Irisawa H, Brown HF, Giles W.

Cardiac pacemaking in the sinoatrial node.

Physiol Rev. 1993 Jan;73(1):197-227.

Kurata Y., Hisatome I., Imanishi S. and Shibamoto T.

Dynamical description of sinoatrial node pacemaking: improved mathematical model for primary pacemaker cell

Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol 283 (5): H2074-H2101 (2002).

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 Oct;271(4 Pt 2):H1666-96.

Lakatta EG, Maltsev VA, Bogdanov KY, Stern MD, Vinogradova TM.

Cyclic variation of intracellular calcium: a critical factor for cardiac pacemaker cell dominance.

Circ Res. 2003 Feb 21;92(3):e45-50.

Lakatta EG, DiFrancesco D.

Point/Counterpoint - What keeps us ticking: a funny current, a calcium clock, or both?

J Mol Cell Cardiol. 2009 Aug;47(2):157-70.

Lei M., Honjo H., Kodama I. and Boyett M.R.

Characterisation of the transient outward K⁺ current in rabbit sinoatrial node cells

Cardiovasc Res (2000) 46 (3): 433-441

Li J, Qu J, Nathan RD.

Ionic basis of ryanodine's negative chronotropic effect on pacemaker cells isolated from the sinoatrial node

Am J Physiol. 1997 Nov;273(5 Pt 2):H2481-9

Maltsev VA, Lakatta EG.

Synergism of coupled subsarcolemmal Ca²⁺ clocks and sarcolemmal voltage clocks confers robust and flexible pacemaker function in a novel pacemaker cell model.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009 Mar;296(3):H594-615.

Maltsev VA, Lakatta EG.

Letter - Funny current provides a relatively modest contribution to spontaneous beating rate regulation of human and rabbit sinoatrial node cells.

J Mol Cell Cardiol. 2010 Apr;48(4):804-6.

Marbán E.

Cardiac channelopathies

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

Monfredi O, Dobrzynski H, Mondal T, Boyett MR, Morris GM.

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

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

Nerbonne J. M.

Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium

Journal of physiology, 2000, 525.2, 285-298

Noble D., and S. J. Noble.

A model of sino-atrial node electrical activity based on a modification of the DiFrancesco-Noble (1984) equations.

Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. B222:295-304. (1984)

Noble D., DiFrancesco D., Denyer J.

Ionic Mechanism in Normal and Abnormal Cardiac Pacemaker Activity

Neuronal and cellular oscillators, Jacklet E., 1989

Ogden David, Stanfield Peter

Patch clamp techniques for single channel and whole-cell recording (Chapter4)

Park DS, Fishman GI.

The cardiac conduction system

Circulation. 2011 Mar 1;123(8):904-15.

Rigg L, Heath BM, Cui Y, Terrar DA.

Localisation and functional significance of ryanodine receptors during beta-adrenoceptor stimulation in the guinea-pig sino-atrial node.

Cardiovasc Res. 2000 Nov;48(2):254-64

Robertson SP, Johnson JD, Potter JD.

The time-course of Ca^{2+} exchange with calmodulin, troponin, parvalbumin, and myosin in response to transient increases in Ca^{2+}

Biophys J. 1981 Jun;34(3):559-69.

Robinson HP, Kawai N.

Injection of digitally synthesized synaptic conductance transients to measure the integrative properties of neurons

J Neurosci Methods. 1993 Sep;49(3):157-65.

Robinson HP

Analog circuits for injecting time-varying linear and non-linear (NMDA-type) conductances into neurons

J Physiol 518.P, 9–10P. (1999).

RTXI website e Userguide (disponibile sul sito)

<http://www.rtxi.org/>

Rudy Y, Silva JR.

Computational biology in the study of cardiac ion channels and cell electrophysiology.

Q Rev Biophys. 2006 Feb;39(1):57-116. Epub 2006 Jul 19.

Satoh H.

Electrophysiological actions of ryanodine on single rabbit sinoatrial nodal cells

Gen Pharmacol. 1997 Jan;28(1):31-8

Scott S

Stimulation simulations of young yet cultured beating hearts

PhD Thesis, State University of New York at Buffalo (1979)

Severi S, Fantini M, Charawi LA, DiFrancesco D.

An updated computational model of rabbit sinoatrial action potential to investigate the mechanisms of heart rate modulation.

J Physiol. 2012 Sep 15;590(Pt 18):4483-99.

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

A mathematical treatment of integrated Ca dynamics within the ventricular myocyte

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

Sharp AA, Abbott LF, Marder E.

Artificial electrical synapses in oscillatory networks.

J Neurophysiol. 1992 Jun;67(6):1691-4.

Sharp AA, O'Neil MB, Abbott LF, Marder E.

Dynamic clamp: computer-generated conductances in real neurons

J Neurophysiol. 1993 Mar;69(3):992-5.

Sharp AA, O'Neil MB, Abbott LF, Marder E.

The dynamic clamp: artificial conductances in biological neurons

Trends Neurosci. 1993 Oct;16(10):389-94.

Silverthorn D.U.

Fisiologia – Un approccio integrato

Casa editrice Ambrosiana, Quarta Edizione (2007, traduzione italiana)

Stern MD, Song LS, Cheng H, Sham JS, Yang HT, Boheler KR, Ríos E.

Local control models of cardiac excitation-contraction coupling.

A possible role for allosteric interactions between ryanodine receptors.

J Gen Physiol. 1999 Mar;113(3):469-89.

Tan RC, Joyner RW

Electrotonic influences on action potentials from isolated ventricular Cells

Circ Res. 1990 Nov;67(5):1071-81

Tan RC, Osaka T, Joyner RW

Experimental model of effects on normal tissue of injury current from ischemic region

Circ Res. 1991 Oct;69(4):965-74.

Verkerk AO, van Ginneken AC, Wilders R.

Pacemaker activity of the human sinoatrial node: role of the hyperpolarization-activated current, I_f.

Int J Cardiol. 2009 Mar 6;132(3):318-36. Epub 2009 Jan 31.

Verkerk AO, Wilders R.

Relative importance of funny current in human versus rabbit sinoatrial node.

J Mol Cell Cardiol. 2010 Apr;48(4):799-801;

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

From Galvani to patch clamp: the development of electrophysiology

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

Vinogradova Tatiana M , Maltsev Victor A , Bogdanov Konstantin Y ,Lyashkov Alexey E , Lakatta Edward G

Rhythmic Ca²⁺ Oscillations Drive Sinoatrial Nodal Cell Pacemaker Function to Make the Heart Tick

Annals of the New York Academy of Sciences Volume 1047

Pages 138 – 156 Published Online: 9 Jan 2006

Virág L, Jost N, Papp R, Koncz I, Kristóf A, Kohajda Z, Harmati G, Carbonell-Pascual B, Ferrero JM Jr, Papp JG, Nánási PP, and Varró A

Analysis of the contribution of Ito to repolarization in canine ventricular myocardium

Br J Pharmacol. 2011 September; 164(1): 93–105.

Wang Z., Fermini B., Nattel S.

Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K⁺ current similar to Kv1.5 cloned channel currents

Circulation Research 1993: 73 , 1061-1076

Wikipedia website

<http://en.wikipedia.org/>

Wilders R, Jongsma HJ, and van Ginneken ACG.

Pacemaker activity of the rabbit sinoatrial node: a comparison of mathematical models.

Biophys J 60: 1202–1216, 1991.

Ronald Wilders, Arie O. Verkerk, E. Etienne Verheijck, Antoni C.G. van Ginneken, Rajiv Kumar, Mary B. Wagner, David A. Golod, William N. Goolsby, Ronald W. Joyner, and Habo J. Jongsma

Model clamp: a computer tool to probe action potential transfer between cardiac cells

Engineering in Medicine and Biology Society, 2001. Proceedings of the 23rd Annual International Conference of the IEEE

Wilders R.

Dynamic clamp: a powerful tool in cardiac electrophysiology.

J Physiol. 2006 Oct 15;576(Pt 2):349-59.

Wilders R.

25 years of SA nodal cell modeling.

Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2007;2007:152-5.

Wilders R.

Computer modelling of the sinoatrial node.

Med Biol Eng Comput. 2007 Feb;45(2):189-207.

**Zhang H, Holden AV, Kodama I, Honjo H, Lei M, Varghese T,
Boyett MR.**

Mathematical models of action potentials in the periphery and center of the rabbit sinoatrial node.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000 Jul;279(1):H397-421.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il professor Severi per avermi affidato un interessante argomento di tesi e per la grande disponibilità dimostrata nel seguirmi durante il suo svolgimento. Ringrazio inoltre Chiara per avermi aiutato durante ogni passo del lavoro.

Un profondo ringraziamento va ai miei genitori e alla mia famiglia in generale, per avermi sempre sostenuto e per avermi dato la possibilità di vivere al meglio questo periodo della mia vita.

Grazie a Francesco e Marco, che mi conoscono da una vita e nonostante questo sono abbastanza folli da rimanermi vicino.

Grazie a Luca e Alessio, per avermi fatto ridere anche (e soprattutto) quando non ce n'era motivo.

Grazie a Lucia e Luigi, che fra tutte le persone che hanno intrapreso questo percorso con me, sono quelle che con me lo hanno anche concluso.

Enrico Ravagli