

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITA' DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

Titolo della Tesi

**Analisi Computazionale della Morfologia del Potenziale
d'Azione in un Cardiomiocita Atriale Umano in Risposta a
Variazioni di Calcio Extracellulare**

Tesi in

Bioingegneria Molecolare e Cellulare LM

Relatore:

Prof. Stefano Severi

Presentata da :

Francesca Gulla'

Correlatore:

Dott.sa Elisa Passini

Sessione I

Anno Accademico 2012/2013

SOMMARIO

SOMMARIO	1
INTRODUZIONE	9
CAPITOLO 1	12
LA FISIOLOGIA DEL POTENZIALE D'AZIONE CARDIACO	12
1.1 Il Muscolo Cardiaco	12
1.2 Genesi del potenziale di azione	14
1.3 Basi ioniche della depolarizzazione rapida.....	15
1.3.1 Fase 0 : Genesi della depolarizzazione rapida.....	16
1.3.2 Fase 1: Genesi della ripolarizzazione precoce.....	18
1.3.3 Fase 2: Genesi del plateau.....	18
1.3.4 Fase 3: Genesi della ripolarizzazione	19
1.3.5 Fase 4: Ripristino concentrazioni ioniche.....	20
1.4 Basi ioniche delle risposte lente	20
1.5 Differenze dell'AP nelle varie regioni del cuore.....	21
1.6 Proprietà del potenziale di azione	25
1.6.1 La Soglia	25
1.6.2 L'Eccitabilità.....	25
1.6.3 Le Depolarizzazioni successive	26
1.6.4 Il Rientro	27
CAPITOLO 2	29
MODELLISTICA MATEMATICA DEL POTENZIALE DI AZIONE ATRIALE	29
2.1 Importanza dei modelli matematici	29
2.2 Modelli matematici dell'elettrofisiologia cardiaca.....	30
2.3 Principali caratteristiche dei modelli atriali	33
CAPITOLO 3	38
IL PROBLEMA DEL CALCIO	38

3.1 Introduzione al problema.....	38
CAPITOLO 4.....	42
<i>ANALISI DEL POTENZIALE DI AZIONE IN UN MODELLO di miocita ATRIALE UMANO: IL MODELLO KOIVUMAKI.....</i>	42
4.1 Introduzione al modello.....	42
4.1.1 Struttura cellulare del modello.....	42
4.1.2 Diffusione del calcio intracellulare.....	44
4.1.3 Correnti ioniche del Sarcolemma.....	45
4.2 Correnti ioniche e caratteristiche del potenziale di azione.....	47
4.3 Durata del potenziale di azione al variare della frequenza	49
4.4 Durata del potenziale di azione al variare della concentrazione di calcio extracellulare	50
CAPITOLO 5.....	53
<i>METODI & RISULTATI.....</i>	53
5.1 In che modo la concentrazione di calcio influenza la durata del potenziale di azione?	53
5.2 Modifiche al modello di koivumaki.....	55
5.2.1 La Driving Force.....	56
5.2.2 Inattivazione $[Ca^{2+}]_o$ -dipendente	59
5.2.3 La Corrente di Background.....	64
5.2.4 La permeabilità.....	66
5.2.5 La costante di tempo di attivazione	71
5.3:Risultati finali	74
<i>CONCLUSIONI</i>	78
<i>APPENDICE A: CODICE MATLAB.....</i>	80
<i>APPENDICE B : MODIFICA DEL MODELLO DI KOIVUMAKI CON E_{Ca_app}.....</i>	106
<i>BIBLIOGRAFIA.....</i>	112
<i>RINGRAZIAMENTI</i>	119

INDICE DELLE FIGURE

<i>Figura 1: Schema dell'accoppiamento eccitazione/contrazione in un miocita. In basso sono mostrati gli andamenti temporali del potenziale d'azione, del transiente di Ca^{2+} e della contrazione (Bers, 2001).</i>	14
<i>Figura 2: Le cinque fasi del potenziale d'azione cardiaco</i>	15
<i>Figura 3: Canali e correnti ioniche di un potenziale di azione (Berne, 2010).</i>	15
<i>Figura 4: Potenziali di azione nelle differenti zone del cuore</i>	21
<i>Figura 5: Potenziale di azione nei diversi strati del tessuto ventricolare</i>	22
<i>Figura 6: Potenziale di azione nei diversi strati del tessuto ventricolare</i>	23
<i>Figura 7: Potenziale d'azione riprodotto dal modello in una simulazione ad 1 Hz e dinamica del calcio.</i>	24
<i>Figura 8: Circuito elettrico relativo alla membrana cellulare utilizzato da Hodgkin e Huxley. $R_{na} = 1/g_{na}$; $R_k = 1/g_k$; $R_l = 1/g_l$. R_{na} e R_k variano col tempo e col potenziale di membrana, gli altri componenti rimangono costanti. (Hodgkin., 1952a)</i>	30
<i>Figura 9: Modello DiFrancesco-noble (Di Francesco, Noble., 1985).</i>	32
<i>Figura 10: A) Schema della membrana cellulare; B) schema del calcio nei differenti compartimenti; C/D) Risultato dell'AP e della rispettiva concentrazione intracellulare di calcio nei 5 modelli (Mathias, 2013).</i>	33
<i>Figura 11: La stabilità a lungo termine dei modelli atriali: APD_{50}, APD_{90}, e ampiezza del potenziale di azione dopo 20 minuti di stimolazione ad 1 Hz (Mathias, 2013)</i>	36
<i>Figura 12: Effetti delle concentrazioni di calcio sul potenziale di azione cardiaco: a) registrazioni sovrapposte del potenziale di azione ventricolare sottoposto a progressivi aumenti della concentrazione del calcio in una cavia animale; b) registrazioni sovrapposte del potenziale di azione atriale sottoposto a concentrazioni di calcio di 1.2 e 2.0 mM in cellule umane. (Cerbai, 2009)</i>	39
<i>Figura 13: Meccanismo $APD-[Ca]_o$</i>	40
<i>Figura 14: Modello umano di miocita atriale: A) Panoramica schematica del modello; B) Struttura e geometria. (Koivumäki, 2011).</i>	43
<i>Figura 15: Caratteristiche della corrente del calcio I_{CaL}; A) in contrasto con la formulazione originale di Nygren (linea nera) la costante di tempo è stata aumentata nel range -40/-10 mV (linea blu); questo approccio era già usato in precedenza in un modello ventricolare (linea rossa). B) Lo stato stazionario della curva del calcio dipendente dall'inattivazione del gate è visto come una funzione del calcio nello spazio giunzionale. C) la corrente di calcio (linea nera) e la stessa in</i>	

<i>assenza di rilascio di calcio dal reticolo sarcoplasmatico (linea rossa) D) corrente I_{CaL} registrata in simulazioni di voltage clamp(sopra) e la corrispondente curva i-v che mette in relazione ogni valore di potenziale con il corrispondente picco di corrente (Koivumäki, 2011)</i>	<i>46</i>
<i>Figura 16: Il potenziale d'azione del modello koivumaki (a) e le relative correnti sottostanti (Koivumäki, 2011).....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 17: Dipendenza della durata del potenziale d'azione dalla frequenza di stimolazione (Koivumäki, 2011).....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 18: Dipendenza della durata del potenziale di azione dall'incremento di calcio (la linea rossa mostra una dipendenza inversamente proporzionale per simulazioni brevi, la nera una dipendenza direttamente proporzionale per simulazioni lunghe).....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 19: Schema dell'effetto di un aumento di calcio extracellulare sulle correnti e concentrazioni intracellulari nel modello di Koivumaki</i>	<i>54</i>
<i>Figura 20: Confronto AP: modello koivumaki originale (sinistra) e modello con Driving Force modificata (destra).....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 21: Relazione tra APD e $[Ca^{2+}]_o$ nel modello koivumaki originale (in blu) e quello con driving force modificata (viola).....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 22: I_{CaL} a confronto: modello koivumaki originale (sinistra) modello con Driving Force modificata (destra).....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 23: Stato stazionario della variabile relativa all'inattivazione calcio dipendente della corrente I_{CaL}.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 24: Modifica di $f_{ca,inf}$ al variare di shift e pendenza</i>	<i>61</i>
<i>Figura 25: Confronto della $f_{ca,inf}$: in blu la formulazione originale, in nero la formulazione modificata</i>	<i>62</i>
<i>Figura 26: Confronto AP con modifica $f_{ca,inf}$: modello ghk (sinistra) e modello GHK con la $f_{ca,inf}$ modificata (destra).....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 27: Confronto APD vs $[Ca^{2+}]_o$: la curva in blu rappresenta il modello GHK con la $f_{ca,inf}$ originale, in rosa il modello GHK con la funzione modificata.....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 28: La corrente di background: a sinistra la corrente originale, a destra la corrente ridotta del 20%</i>	<i>65</i>
<i>Figura 29: Confronto AP: a sinistra il potenziale di azione calcolato nel modello GHK utilizzando la corrente di background originale e la corrente I_{CaL} modificata a destra il potenziale calcolato nel modello ghk con la corrente di background diminuita del 20% e la corrente I_{CaL} modificata.</i>	<i>65</i>
<i>Figura 30: Dipendenza APD vs $[Ca^{2+}]_o$ con le modifiche di I_{Cab} e I_{CaL}.....</i>	<i>66</i>

<i>Figura 31:Analisi di sensibilita': confronto APD a diversi valori di permeabilità normalizzati al valore di 1.8 mM</i>	67
<i>Figura 32: APD con permeabilita' aumentata di 9 volte</i>	68
<i>Figura 33:I_{CaL} in seguito alla modifica della permeabilita'</i>	68
<i>Figura 34:Protocollo in V-Clamp</i>	69
<i>Figura 35: : Curva I-V della I_{CaL}: a sinistra la corrente calcolata del modello di Koivumaki con picco in -12 pA/pF a destra il modello con la modifica sulla permeabilità con picco in -90 pA/pF</i>	70
<i>Figura 36: Confronto apd utilizzando diversi valori per il parametro τ: in nero la curva con valore basale 0.006 in ROSSO 0.008 in BLU 0.01</i>	72
<i>Figura 37: PROTOCOLLO V-CLAMP: confronto I_{CaL} tra il modello originale ed il modello ultimato</i>	73
<i>Figura 38: Il potenziale di azione: a sinistra il modello originale di koivumaki, a destra il modello modificato</i>	75
<i>Figura 39: Durata del potenziale d'azione al variare della concentrazione di calcio extracellulare per il modello originale (nero) e quello modificato (blu)</i>	76
<i>Figura 40: AP KOIVUMAKI MODIFICATO</i>	107
<i>Figura 41: Confronto APD: la curva in blu mostra la dipendenza del modello modificato in cui la Driving Force risulta invariata,la curva in nero mostra il modello originale di Koivumaki</i>	107
<i>Figura 42: PROTOCOLLO V-CLAMP : modello modificato con la Driving Force</i>	108
<i>Figura 43: APD Koivumaki modificato</i>	109
<i>Figura 44:Protocollo V-clamp del modello di koivumaki modificato senza Driving Force</i>	109

INDICE DELLE TABELLE

<i>Tabella 1: Proprietà dei differenti modelli atriali (Mathias, 2013)</i>	35
<i>Tabella 2: Valori sperimentali di controllo (Mathias, 2013) (Bosh, 1999) , (Christ, 2008) (Workman, 2011)]</i>	35
<i>Tabella 3: Parametri fisiologici (Koivumäki, 2011)</i>	44
<i>Tabella 4: Parametri del calcio buffer (Koivumäki, 2011)</i>	45
<i>Tabella 6 :Confronto delle caratteristiche del potenziale di azione</i>	48
<i>Tabella 7: Picchi della corrente ionica I_{CaL} utilizzati nei modelli a confronto</i>	70

*“ Una teoria può essere provata da un esperimento, ma
nessun percorso guida dall’esperimento
alla nascita di una teoria”
Albert Einstein*

INTRODUZIONE

Il presente lavoro di tesi si inserisce nel contesto dell'elettrofisiologia cardiaca computazionale, ovvero lo studio dei meccanismi fisiologici alla base del comportamento elettrico delle cellule cardiache utilizzando modelli matematici di potenziale d'azione, per una migliore comprensione dei processi biologici.

La modellistica matematica e la simulazione numerica sono, infatti, strumenti di grande utilità per predire ed interpretare meccanismi ionici alla base del funzionamento fisiologico delle cellule cardiache, permettendo di riprodurre e analizzare in simulazione anche quelle condizioni che sperimentalmente non sono misurabili, e superando così le difficoltà legate alla scarsa disponibilità di dati sperimentali, in particolar modo umani.

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di analizzare la risposta del potenziale di azione, in particolare le sue modifiche in termini di durata, in risposta a variazioni del calcio extracellulare, in un modello tra i più recenti di cardiomiocita atriale umano (Koivumäki, 2011).

Sulla base dei dati sperimentali presenti in letteratura, infatti, è noto che tale durata è inversamente legata alla concentrazione di calcio extracellulare, ma questa relazione non è sempre ben riprodotta nei modelli correntemente utilizzati, come appunto quello sopra citato.

È stato quindi necessario apportare delle modifiche alla formulazione del modello, in particolare nell'espressione delle correnti ioniche di calcio, per poter riprodurre al meglio l'effetto delle variazioni di calcio extracellulare sul potenziale d'azione, molto importante dal punto di vista aritmogenico. Infatti, sia l'allungamento sia l'accorciamento del potenziale d'azione, sono associati ad un aumento del rischio aritmico per il paziente, ed è importante conoscere l'intensità di tali variazioni e poterne prevederne l'effetto in simulazione.

Il modello così modificato potrà quindi essere utilizzato per simulare contesti clinici nei quali si può verificare la variazione di elettroliti extracellulari, con possibili conseguenze sull'elettrofisiologia del paziente. Un esempio può essere costituito dalla terapia dialitica, dove le concentrazioni di calcio e potassio si modificano nell'arco di poche ore, ed è importante avere una valutazione dell'effetto che tali variazioni possono comportare a livello del sistema cardiovascolare.

Dopo una breve introduzione sulla fisiologia del cuore e una rapida descrizione dell'evoluzione dei modelli di potenziale d'azione umano, in particolare atriali, l'elaborato si pone alcuni scopi principali: a) studiare in dettaglio le diverse fasi del potenziale di azione cardiaco atriale; b) analizzare il problema dell'effetto sul potenziale d'azione delle variazioni nella concentrazione di calcio, problema trascurato dalla maggior parte dei modelli cardiaci più utilizzati; c) studiare ed

implementare il modello matematico di cardiomiocita atriale di Koivumaki et al., 2011 in ambiente Matlab; d) analizzare in simulazione le correnti e le concentrazioni che determinano il comportamento elettrofisiologico di tale modello, per metterne in luce eventuali limiti. In particolare, è emersa una discordanza sull'andamento della durata del potenziale di azione in risposta a variazioni di calcio extracellulare, contraria ai risultati presenti in letteratura; e) studiare i principali meccanismi responsabili di questa dipendenza dal calcio, in particolare la corrente ionica del calcio I_{CaL} e la corrente di background I_{Cab} , e modificarne le formulazioni in modo da riprodurre la dipendenza osservata sperimentalmente, preservando comunque la funzionalità fisiologica della cellula atriale.

CAPITOLO 1

LA FISIOLOGIA DEL POTENZIALE D'AZIONE CARDIACO

1.1 IL MUSCOLO CARDIACO

Il cuore è un organo cavo che, negli esseri umani, si trova al centro della cavità toracica; è l'organo centrale dell'apparato circolatorio e funge da pompa capace di produrre una pressione sufficiente a permettere la circolazione del sangue. Il cuore è costituito da un tessuto muscolare caratteristico, il muscolo cardiaco o Miocardio, ed è rivestito da una membrana interna, detta Endocardio e da una protettiva, esterna Pericardio. Il cuore è diviso in quattro cavità: gli atri (destro e sinistro) posti superiormente e i ventricoli (destro e sinistro) posti inferiormente. L'atrio e il ventricolo destro sono in continuità tra loro formando il cuore destro (che pompa il sangue venoso, povero di ossigeno ai polmoni), così come comunicano le due cavità sinistre, formando il cuore sinistro (che pompa il sangue arterioso, ossigenato agli organi).

Il muscolo cardiaco è un muscolo striato che riflette un'organizzazione analoga di filamenti di actina e miosina, che sono responsabili della sua contrazione: la sua funzionalità meccanica è strettamente legata a quella elettrica, basata sull'origine e sulla trasmissione del potenziale di azione, un evento di breve durata con cui il potenziale elettrico di membrana delle cellule aumenta rapidamente e poi subito scende, seguendo una traiettoria caratteristica: questo causa il rilascio di calcio Ca^{2+} dal reticolo sarcoplasmatico, attivando così la contrazione per mezzo del complesso troponina-tropomiosina.

Dal muscolo cardiaco possono essere registrati due tipi di potenziali di azione: il primo tipo, la risposta rapida, si registra dalle fibre del miocardio atriale e ventricolare e dalle fibre specializzate di conduzione (le fibre di Purkinje); l'altro tipo, la risposta lenta, si registra nel nodo seno atriale, il pacemaker naturale del cuore, e nel nodo atrio ventricolare, il tessuto specializzato per la conduzione dell'impulso cardiaco dagli atri ai ventricoli.

Le varie fasi del potenziale di azione cardiaco sono associate a variazioni della conduttanza della membrana cellulare agli ioni Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e di conseguenza al diverso movimento di questi ioni attraverso la membrana; la quantità netta di ioni che diffonde attraverso una membrana

dipende, oltre che dalla permeabilità della membrana a quello ione, anche dalla sua differenza di concentrazione e dalla differenza del potenziale elettrico ai capi della membrana.

Come in tutte le altre cellule dell'organismo, la concentrazione di K^+ all'interno della cellula muscolare cardiaca è notevolmente superiore a quella extracellulare, mentre accade il contrario per gli ioni Na^+ e Ca^{2+} . La membrana cellulare a riposo è molto più permeabile al K^+ piuttosto che al Na^+ e Ca^{2+} : questo quindi tenderà a diffondere dall'interno all'esterno della cellula, seguendo la direzione del suo gradiente di concentrazione.

Ogni flusso di K^+ avviene attraverso canali specifici; le membrane delle cellule cardiache contengono diversi tipi di canali del potassio: alcuni sono regolati dal potenziale di membrana, altri da segnali chimici.

Gli ioni K^+ carichi positivamente, sono attratti all'interno della cellula dal potenziale negativo che si stabilisce, mentre la differenza di concentrazione tenderebbe a muovere gli ioni in senso opposto: si hanno così due forze opposte che agiscono sugli ioni K^+ , facendoli muovere attraverso la membrana cellulare: una chimica ed una elettrostatica. Quando il sistema raggiunge l'equilibrio, le due forze descritte saranno uguali e dall'equazione di Nernst si può ricavare il potenziale di equilibrio del potassio, che è di circa -95 mV, valore molto vicino al potenziale di riposo delle cellule cardiache quindi, il potenziale che tende a spingere il potassio all'esterno della cellula a riposo è piccolo. In generale l'equazione di Nernst si presenta:

$$E_l = \frac{RT}{nF} \ln \frac{[l]_i}{[l]_o}$$

Dove

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

$n=$ è il numero di elettroni trasferito

$F= 96485,309 C mol^{-1}$ è la costante di Faraday

$T=$ è la temperatura assoluta in kelvin

$[l]_i=$ è la concentrazione dello ione intracellulare

$[l]_o=$ è la concentrazione dello ione extracellulare

Il valore di potenziale misurato è leggermente meno negativo di quello del potassio, in quanto la membrana cellulare è leggermente permeabile anche ad altri ioni, in particolare al sodio: infatti, il bilancio delle forze che agiscono sul Na^+ è opposto al bilancio delle forze che agiscono sul K^+ , e la concentrazione intracellulare del Na^+ è notevolmente più bassa di quella extracellulare, per cui il suo potenziale di equilibrio, sempre calcolato dall'equazione di Nernst, è di circa 60 mV.

All'equilibrio, quindi, sia la forza elettrostatica sia quella chimica tenderebbero a fare entrare il sodio all'interno della cellula. L'ingresso di sodio attraverso la membrana cellulare è però moderato, in quanto la membrana a riposo è poco permeabile a questo ione: questa corrente è però sufficiente ad alzare leggermente il potenziale di membrana (V_m) all'interno della membrana leggermente meno negativo del potenziale di equilibrio del K^+ .

1.2 GENESI DEL POTENZIALE DI AZIONE

Una delle caratteristiche fondamentali della cellula cardiaca, come detto precedentemente, è la capacità di generare un potenziale d'azione (AP) se stimolata elettricamente; in Figura 1 è mostrato il tipico andamento temporale dell'AP di un cardiomiocita ventricolare, insieme al corrispondente transiente di calcio intracellulare e quindi la forza sviluppata:

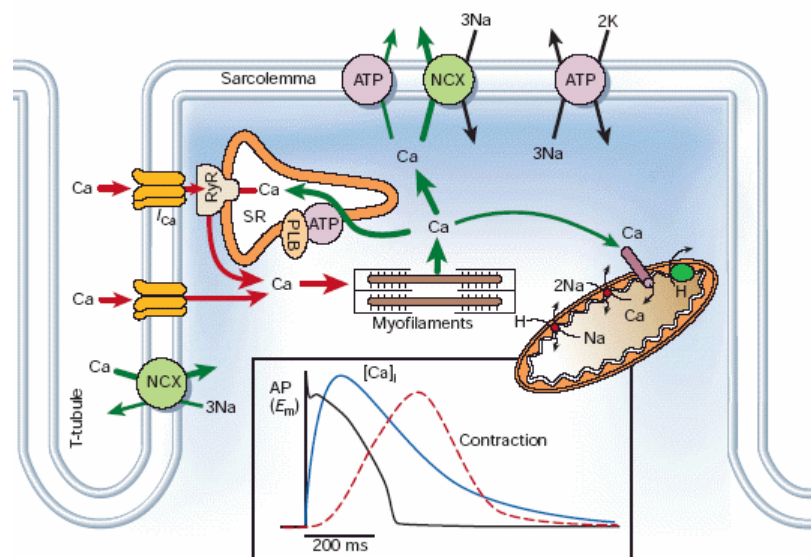


Figura 1: Schema dell'accoppiamento eccitazione/contrazione in un miocita. In basso sono mostrati gli andamenti temporali del potenziale d'azione, del transiente di Ca^{2+} e della contrazione (Bers, 2001).

L'AP è una depolarizzazione transitoria della membrana della cellula, che nelle cellule cardiache ha una durata di circa 200 ms e può essere suddiviso in più fasi, associate a variazioni della conduttanza della membrana cellulare principalmente agli ioni Na^+ , K^+ e Ca^{2+} .

Le fasi principali del potenziale di azione sono 5 : la fase 0 di depolarizzazione rapida, dovuta quasi esclusivamente all'ingressi di ioni Na^+ , la fase 1 della ripolarizzazione precoce dovuta ad una corrente transitoria in uscita Ito, la fase 2 del plateau associata principalmente allo ione calcio, la quale è largamente responsabile del prolungato potenziale di azione, la fase 3 detta di

ripolarizzazione, che riporta il potenziale di membrana al suo valore di riposo ed infine la fase 4 in cui si ha il ripristino delle concentrazioni ioniche ai valori di riposo. Le cinque fasi sono rappresentate in Figura 2.

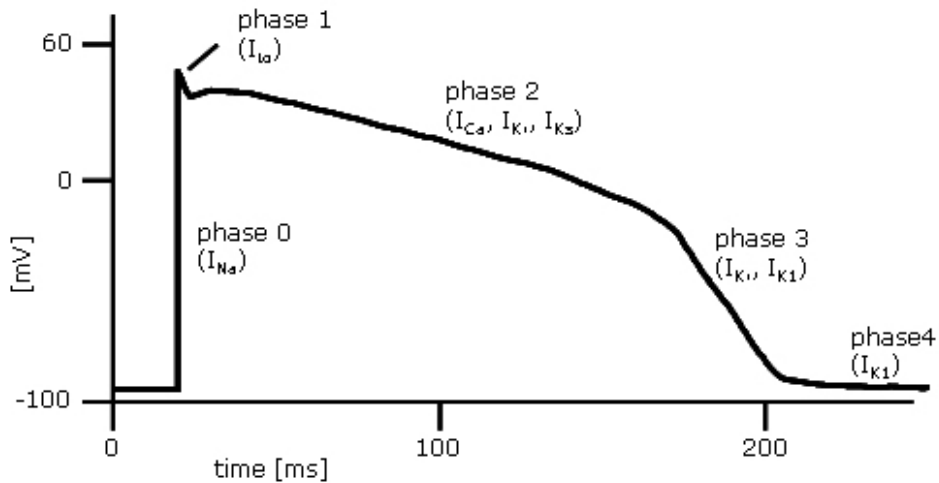


Figura 2: Le cinque fasi del potenziale d'azione cardiaco

1.3 BASI IONICHE DELLA DEPOLARIZZAZIONE RAPIDA

Analizziamo di seguito le varie fasi del potenziale di azione nella cellula cardiaca, proponendo i principali canali e le correnti che generano il potenziale:

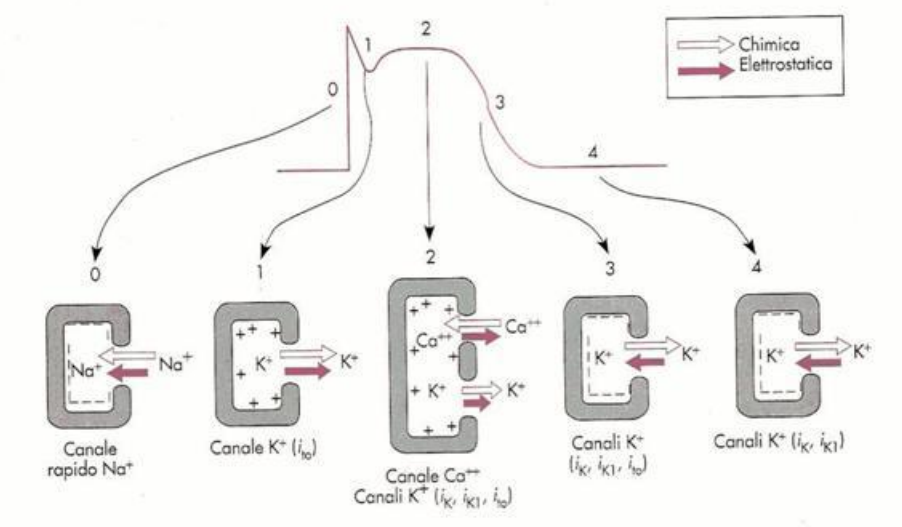


Figura 3: Canali e correnti ioniche di un potenziale di azione (Berne, 2010)

1.3.1 FASE 0 : GENESI DELLA DEPOLARIZZAZIONE RAPIDA

Qualsiasi avvenimento che causi un innalzamento del potenziale di riposo della membrana portandolo ad un valore critico, definito soglia, provocherà un potenziale d'azione propagato. La depolarizzazione rapida che ha luogo durante la fase 0 è dovuta quasi esclusivamente all'ingresso rapido di Na^+ , in seguito ad un veloce aumento della conduttanza della membrana allo ione stesso: l'ampiezza della variazione di potenziale durante questa fase varia con il logaritmo della concentrazione extracellulare del sodio.

In particolare quindi, quando il potenziale di riposo della membrana V_m viene portato al suo valore di soglia (circa -65 mV) lo ione Na^+ inizia ad entrare nella cellula attraverso specifici canali rapidi. Il modo con cui questo ione si muove attraverso questi canali rapidi, suggerisce che il flusso sia controllato da due tipi di "barriere", o meglio **gate: m**, che rende pervio il canale quando V_m diventa meno negativo e quindi è chiamata anche **barriera di attivazione** e **h**, che tende a chiudere il canale quando V_m diventa negativo ed è chiamata **barriera di inattivazione**.

Nelle cellule a riposo, con un valore di V_m di circa -90 mV , le barriere **m** sono chiuse e le barriere **h** aperte: quindi, sia la forza chimica sia quella elettrostatica agiscono insieme per spingere il sodio dentro la cellula, il flusso di ioni attraverso la membrana è quasi nullo.

La forza elettrostatica è nello specifico una differenza di potenziale di 90 mV entrante nella cellula mentre la forza chimica, dovuta alla differenza di concentrazione di sodio tra esterno ed interno della cellula, per l'equazione di Nernst può essere rappresentata come equivalente ad un potenziale di 60 mV , anch'esso entrante nella cellula: da ciò consegue che in una cellula a riposo la forza elettrochimica totale che favorisce l'ingresso di sodio è di 150 mV , ma le barriere **m** sono chiuse e la permeabilità della membrana cellulare a riposo per lo stesso ione è molto bassa, ottenendo come risultato un movimento di sodio pressoché nullo all'interno della cellula.

Ogni processo che tende a portare V_m ad un livello meno negativo apre le barriere **m** attivando i canali rapidi del Na^+ , ma siccome il potenziale a cui queste barriere si aprono varia da canale a canale nella membrana cellulare, man mano che V_m diventa meno negativo si apre un numero sempre maggiore di barriere: questo processo di apertura di barriere **m** favorisce l'ingresso di Na^+ nella cellula ad opera delle forze elettrostatiche e chimiche descritte in precedenza, che a sua volta tende a neutralizzare alcune delle cariche

negative presenti, provocando una riduzione ulteriore di V_m che diventa meno negativo; quest'ultimo processo tende a far aprire un numero maggiore di barriere m , incrementando così ulteriormente l'ingresso di corrente del sodio, dando così vita ad un fenomeno di feedback positivo. Come V_m si avvicina al valore di soglia di circa -65 mV, le restanti barriere m dei canali rapidi del Na^+ si aprono rapidamente fino a quando praticamente tutte queste barriere risultano aperte.

La rapida apertura delle barriere m dei canali rapidi del sodio è responsabile dell'improvviso aumento della conduttanza dello ione stesso, e l'ingresso rapido del Na^+ rende conto della rapida variazione di V_m durante questa fase; sebbene la quantità di Na^+ che entra nella cellula durante un potenziale d'azione modifichi V_m di oltre 100 mV, tale quantità è troppo piccola per modificare in modo apprezzabile la concentrazione intracellulare di questo ione, pertanto nel corso del potenziale d'azione la forza chimica rimane praticamente costante e si modifica solo la forza elettrostatica. Con l'ingresso di sodio la carica negativa dell'interno della cellula viene neutralizzata, V_m diventa progressivamente meno negativo fino a raggiungere il valore zero: a questo valore di V_m si annulla la forza elettrostatica che spinge il sodio dentro la cellula, ma fino a quando i canali rapidi del sodio rimarranno aperti, questi ioni continueranno ad entrare a causa dell'elevato gradiente di concentrazione ancora esistente.

Il continuo fluire di correnti di Na^+ dirette verso l'interno della cellula fanno sì che l'interno stesso diventi carico positivamente rispetto all'esterno, realizzando una inversione della polarità di membrana che costituisce il cosiddetto overshoot del potenziale d'azione cardiaco e che tende ad opporsi all'ingresso di ioni Na^+ , processo che comunque continua fino a quando il gradiente chimico diretto verso l'interno è superiore al gradiente elettrostatico diretto verso l'esterno, anche se con velocità ridotta.

La fase 0 termina quando le barriere h si chiudono, inattivando di conseguenza i canali rapidi per il sodio, e rimanendo chiuse fino a quando la cellula non si è parzialmente ripolarizzata in una fase successiva: in questo intervallo la cellula è nel periodo refrattario assoluto e non è in grado di rispondere ad ulteriori eccitazioni. Il periodo refrattario serve ad impedire l'eccitazione continua della cellula, che porterebbe il miocardio in condizioni di tetanizzazione, e a una riduzione della funzionalità cardiaca..

1.3.2 FASE 1: GENESI DELLA RIPOLARIZZAZIONE PRECOCE

La fase 0 del potenziale di azione è immediatamente seguita da un breve periodo di parziale ripolarizzazione, detto fase 1: qui si ha una corrente transitoria diretta verso l'esterno, dovuta in particolare al K^+ e chiamata I_{to} ; l'attivazione dei canali del potassio in questa fase comporta una breve fuoriuscita di questi ioni in quanto l'interno della cellula è carico positivamente e la concentrazione interna del potassio supera quella esterna, provocando così una breve ripolarizzazione.

1.3.3 FASE 2: GENESI DEL PLATEAU

Durante il plateau del potenziale d'azione, il Ca^{2+} entra nella cellula attraverso i canali del calcio che si attivano e disattivano molto più lentamente dei canali rapidi del sodio, e questo ingresso di cariche positive portate dal Ca^{2+} è controbilanciata dall'uscita di una uguale quantità di cariche positive portate dal potassio attraverso i canali che conducono le correnti I_{to} , I_k ed I_{k1} : in particolare, I_{to} corrente responsabile della fase 1 che non viene completamente inattivata fino a quando non termina la fase 2, mentre le altre correnti saranno analizzate in seguito.

I canali del calcio sono regolati dal voltaggio e si attivano quando, durante la fase di ascesa del potenziale d'azione, V_m diventa meno negativo. Questi canali sono definiti L-Type cioè canali lenti perché i processi di attivazione, inattivazione e recupero (cioè l'uscita dallo stato di inattivazione ed il conseguente recupero della possibilità di attivarsi a fronte di uno stimolo elettrico adeguato) sono più lenti rispetto ai canali T-type, che però non si trovano in tutti i tipi cellulari. Per questo motivo, la corrispondente corrente è solitamente chiamata I_{CaL} .

L'apertura dei canali del calcio si riflette in un aumento della conduttanza della membrana allo ione stesso, che inizia in seguito alla fase ascendente del potenziale d'azione; all'inizio del potenziale d'azione stesso la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} è notevolmente inferiore a quella extracellulare, di conseguenza un aumento della conduttanza provoca l'ingresso dello ione nella cellula per tutta la fase di plateau, favorendo l'accoppiamento eccitazione-contrazione.

Durante il plateau del potenziale d'azione le forze chimiche e quelle elettrostatiche favoriscono l'uscita del potassio dalla cellula, con un contemporaneo valore di V_m positivo che porta ad una rapida riduzione della conduttanza della membrana a questo ione. A questa si unisce una riduzione del valore della conduttanza per il potassio per valori positivi di V_m è chiamata rettificazione in

ingresso, che è una caratteristica della corrente I_{k1} ; le relazioni corrente - voltaggio dei canali del K^+ che conducono questa corrente sono state determinate mediante esperimenti di voltage clamping su cellule cardiache, registrando un potenziale di equilibrio di Nernst per il K^+ di -70 mV, valore che riflette il rapporto tra le concentrazioni intra/extra cellulare. Un altro fattore che contribuisce a rendere bassa la conduttanza di membrana al potassio durante la fase di plateau è la rettificazione ritardata, caratteristica di altri canali del potassio e che contribuiscono a formare la corrente I_k ; questi canali sono attivati per quei voltaggi che in genere prevalgono verso la fine della fase 0, anche se con una cinetica molto lenta, per chiudersi durante la fase 4 di ripristino delle concentrazioni ioniche. L'attivazione di questi canali tende quindi ad incrementare la conduttanza della membrana al K^+ . Il plateau del potenziale persiste fino a quando l'efflusso di cariche trasferite dal potassio è bilanciato dall'ingresso di cariche trasferite dal calcio.

1.3.4 FASE 3: GENESI DELLA RIPOLARIZZAZIONE

Il processo della ripolarizzazione finale ha inizio al termine della fase 2, quando la fuoriuscita di potassio dalla cellula cardiaca comincia a superare l'ingresso di Ca^{2+} : alla fine del plateau almeno tre correnti in uscita del potassio, già nominate in precedenza, contribuiscono al ripristino del potenziale di riposo della cellula cardiaca. La corrente transitoria in uscita I_{to} e le correnti rettificanti ritardate I_k concorrono ad iniziare la ripolarizzazione, quindi sono importanti per determinare la durata del plateau: esperimenti elettrofisiologici hanno dimostrato che durante tale fase la corrente in uscita del potassio è superiore nelle cellule atriali che in quelle ventricolari, per cui la durata è maggiore nei miociti del ventricolo.

La corrente del K^+ rettificata in ingresso I_{k1} non contribuisce in modo sostanziale all'inizio del processo di ripolarizzazione in quanto la conduttanza di questi canali è molto piccola per i valori di V_m che prevalgono durante il plateau, viceversa questi canali I_{k1} contribuiscono in modo importante alla velocità della ripolarizzazione dopo che è stata raggiunta la fase 3. Con l'efflusso netto di cationi, V_m tende a diventare più negativo in questa fase e la conduttanza dei canali che trasferiscono la corrente I_{k1} aumenta progressivamente.

1.3.5 FASE 4: RIPRISTINO CONCENTRAZIONI IONICHE

L'eccesso di Na^+ entrato nella cellula rapidamente durante la fase 0 e più lentamente per il resto del ciclo cardiaco viene eliminato dalla pompa Na^+/K^+ ATPasi, che espelle tre ioni Na^+ in cambio di due ioni K^+ , usciti soprattutto durante le fasi 2 e 3. Gran parte degli ioni Ca^{2+} entrati nella cellula durante la fase 2 vengono eliminati dallo scambiatore $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$, che scambia tre ioni sodio con uno calcio.

1.4 BASI IONICHE DELLE RISPOSTE LENTE

A differenza delle risposte rapide, nelle risposte lente la fase ascendente è molto più lenta, la ripolarizzazione precoce è assente, il plateau è meno prolungato e meno piatto e la fase di transizione dal plateau stesso alla ripolarizzazione finale meno distinta. Quando nelle cellule a risposta rapida i canali del Na^+ sono bloccati da specifici antagonisti, in condizioni appropriate queste stesse cellule possono generare risposte lente; alcune cellule del cuore, in particolare le cellule dei nodi seno atriale ed atrio ventricolare, sono di norma fibre a risposta lenta, nelle quali la depolarizzazione è dovuta soprattutto all'ingresso di Ca^{2+} attraverso i canali omonimi, e la ripolarizzazione è conseguente all'inattivazione di questi canali ed all'aumento della conduttanza al K^+ attraverso i canali I_{k1} ed I_k .

1.5 DIFFERENZE DELL'AP NELLE VARIE REGIONI DEL CUORE

Il potenziale d'azione ha una forma diversa da una regione all'altra del cuore. Queste differenze nascono dal fatto che le correnti di depolarizzazione e ripolarizzazione sono dovute a una diversa espressione dei canali ionici nelle cellule che costituiscono i diversi tessuti del cuore (Figura 4).

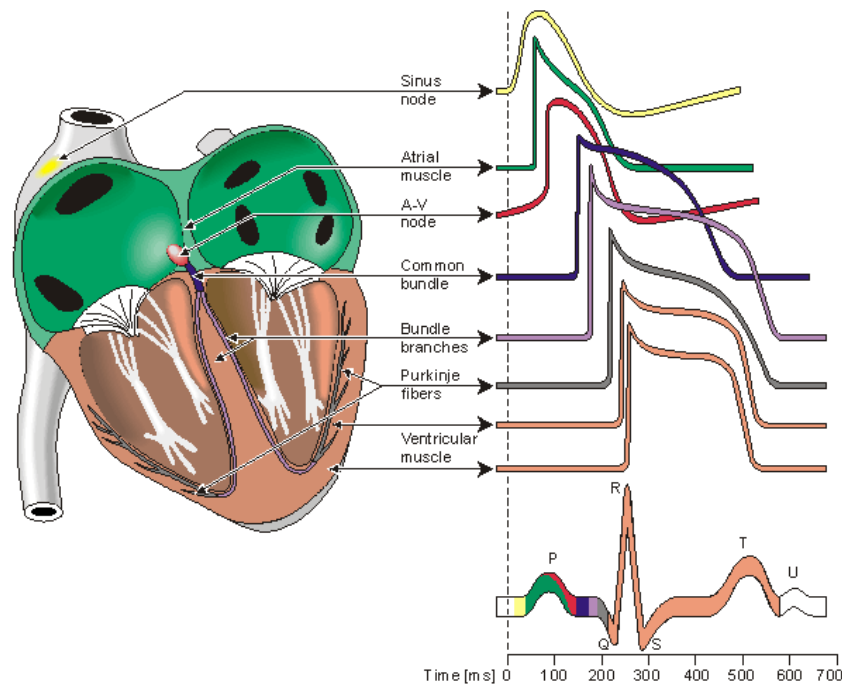


Figura 4: Potenziali di azione nelle differenti zone del cuore

Nel nodo seno atriale (SAN) il potenziale è di breve durata ed ha un lento upstroke; negli atri il potenziale è più breve rispetto a quello che si ha nelle fibre di Purkinje, la salita è rapida, così come la ripolarizzazione ed il plateau. Nelle cellule del sistema His-Purkinje il potenziale d'azione è molto ampio, sale rapidamente e dura a lungo (300 ms). Il potenziale d'azione ventricolare, infine, è simile a quello delle fibre del Purkinje, ma di minore ampiezza e durata, anche se superiore rispetto a quella degli atri.

Inoltre, le durate dei potenziali d'azione differiscono nei diversi strati della parete ventricolare (Figura 5). In particolare l'AP è più lungo nel mid-miocardio, un po' più breve nell'endocardio e ancora più breve nell'epicardio (Figura 5). L'eterogeneità nella durata della ripolarizzazione ventricolare nei diversi strati del miocardio è principalmente dovuta al differente contributo di due correnti di potassio: I_{to} e I_{ks} .

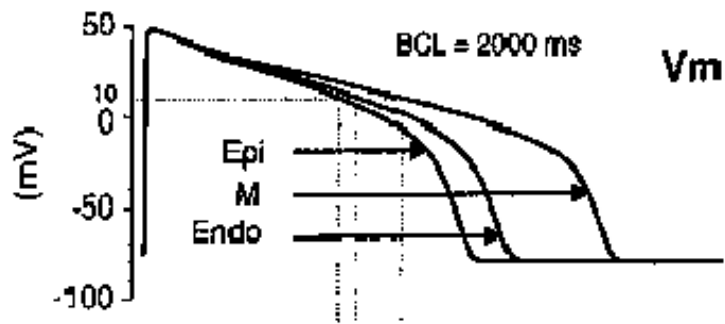


Figura 5: Potenziale di azione nei diversi strati del tessuto ventricolare

La morfologia e la durata del potenziale d'azione sono quindi aspetti caratteristici delle cellule e sono influenzati dall'interazione di molti processi cellulari fondamentali (Katz, 1992)

In Figura 6 è riportato l'andamento del potenziale d'azione tipico di un miocita atriale e le principali correnti che contribuiscono alla sua genesi.

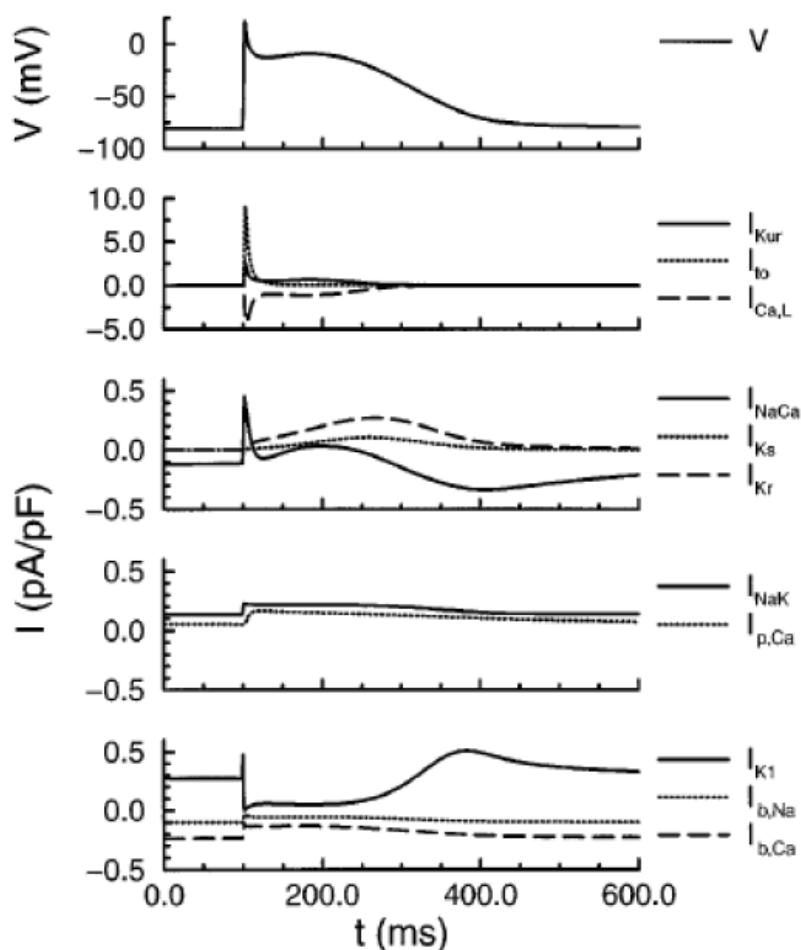


Figura 6: Potenziale di azione nei diversi strati del tessuto ventricolare

In condizioni normali la corrente di Na^+ , I_{Na} , si attiva rapidamente producendo il picco dell'AP e poi si inattiva; la corrente di Ca^{2+} , I_{CaL} , si inattiva un po' più lentamente e non completamente consentendo alla corrente di Ca^{2+} di sostenere la fase di plateau. Inoltre l'ingresso di ioni Ca^{2+} attraverso il canale L-Type innesca il rilascio di calcio da parte del reticolo sarcoplasmatico (SR). Le correnti di K^+ sono coinvolte nella fase di ripolarizzazione della membrana; infatti la I_{K1} mantiene e stabilizza il potenziale di riposo, la I_{to} contribuisce alla prima diminuzione del picco dell'AP che precede la fase di plateau, mentre le componenti di rettifica date da I_{kr} e I_{k} contribuiscono alla ripolarizzazione della cellula. In figura 7 è mostrata la dinamica del calcio.

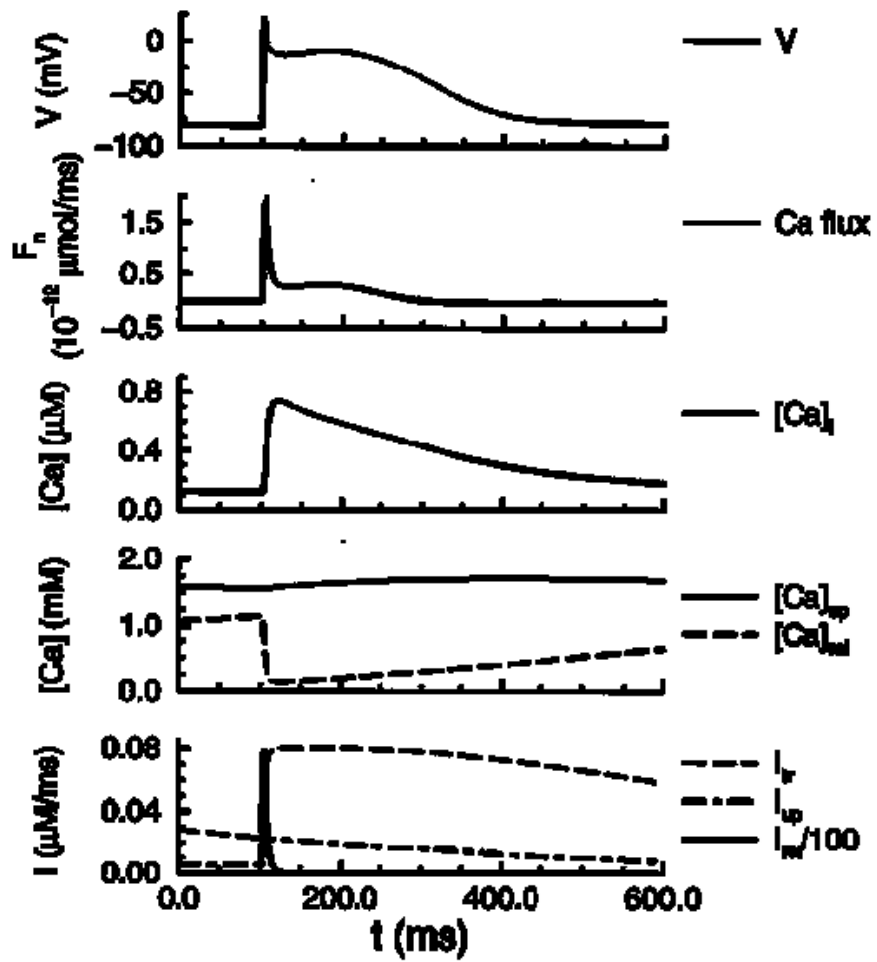


Figura 7: Potenziale d'azione riprodotto dal modello in una simulazione ad 1 Hz e dinamica del calcio.

1.6 PROPRIETÀ DEL POTENZIALE DI AZIONE

1.6.1 LA SOGLIA

La propagazione del potenziale d'azione è di tipo rigenerativo, cioè una volta che una regione del cuore è depolarizzata, essa è capace di scatenare un potenziale d'azione nelle vicine cellule a riposo. Affinché uno stimolo sia però in grado di innescare una risposta rigenerativa, la depolarizzazione deve raggiungere una certa soglia. Infatti, piccole depolarizzazioni sottosoglia causano soltanto risposte locali, in quanto consentono l'apertura di una modesta quantità di canali voltaggio dipendenti, non sufficiente a generare correnti abbastanza ampie da attivare le cellule vicine. In ogni modo, una volta raggiunta la soglia, la seguente depolarizzazione non dipende dall'entità dello stimolo depolarizzante iniziale. Le piccole depolarizzazioni sotto soglia possono avere importanti effetti sull'eccitabilità, in quanto una parziale depolarizzazione rallenta l'impulso di conduzione inattivando i canali del sodio.

1.6.2 L'ECCITABILITÀ

Il potenziale d'azione può essere registrato sperimentalmente eccitando la membrana con un impulso di corrente e misurando le conseguenti variazioni di potenziale. Le fibre a risposta rapida e lenta mostrano notevoli differenze di eccitabilità: una cellula cardiaca che si sia depolarizzata per generare un potenziale d'azione a risposta rapida non sarà più eccitabile fino a che non si sia ripolarizzata parzialmente, e l'intervallo compreso tra l'inizio del potenziale d'azione ed il momento in cui la cellula è nuovamente in grado di condurre un altro potenziale d'azione è chiamato *periodo refrattario assoluto*. Nelle risposte rapide questo periodo va dall'inizio della fase 0 ad un punto della fase 3 in cui V_m ha raggiunto circa -50 mV, valore al quale alcune delle barriere m ed h di molti canali rapidi del Na^+ si sono di nuovo ristabilite; la piena eccitabilità non viene comunque ristabilita fino a quando la fibra cardiaca non si è completamente ripolarizzata. Tra la fase 3 e la fase 4 esiste anche un intervallo di tempo nel quale può essere evocato un potenziale d'azione, ma solo applicando uno stimolo che sia più intenso di quello capace di suscitare una risposta durante la fase 4: tale periodo è detto *periodo refrattario relativo*. Quando una risposta

rapida viene evocata durante il periodo refrattario relativo di una precedente eccitazione, le sue caratteristiche variano con il valore del potenziale di membrana che è presente al momento della stimolazione; se la fibra viene invece stimolata in momenti successivi, sempre durante il periodo refrattario relativo, l'ampiezza della risposta e la velocità di salita della depolarizzazione iniziale del potenziale d'azione aumentano progressivamente. E' probabile che il numero dei canali rapidi del Na^+ che hanno recuperato dopo l'inattivazione aumenti progressivamente con il procedere della ripolarizzazione durante la fase 3. A causa della maggiore ampiezza della fase ascendente della risposta evocata, la velocità di propagazione dell'impulso cardiaco aumenta, e l'aumento è maggiore quanto più tardivamente viene stimolata la fibra durante il suo periodo refrattario relativo. Quando la fibra si è completamente ripolarizzata, si ripristina anche la sua completa eccitabilità e la risposta sarà costante qualunque sia il momento della fase 4 nel quale viene applicato lo stimolo. Il periodo refrattario relativo delle fibre a risposta lenta si protrae frequentemente oltre la fase 3, ed anche dopo che la cellula si è completamente ripolarizzata è difficile per un certo periodo di tempo evocare una risposta propagata: questa caratteristica è detta refrattarietà post-ripolarizzazione. I potenziali d'azione indotti nelle fibre a risposta lenta in una fase precoce del loro periodo refrattario relativo sono più piccoli ed hanno una fase di ascesa meno ripida, e l'ampiezza e la pendenza della fase ascendente incrementano progressivamente se i potenziali d'azione sono evocati più tardivamente. Inoltre nelle fibre a risposta lenta il recupero della piena eccitabilità è più lento che nelle fibre a risposta rapida, ed i potenziali indotti in una fase più precoce del periodo refrattario relativo sono condotti ad una velocità inferiore a quella con cui sono condotti i potenziali evocati in una fase più tardiva.

1.6.3 LE DEPOLARIZZAZIONI SUCCESSIVE

Le after-depolarization sono anormali depolarizzazioni di miociti cardiaci che possono interrompere la fase 2, 3 o 4 del potenziale di azione cardiaco nel sistema di conduzione elettrica del cuore: da qui il nome, che letteralmente si può tradurre con "depolarizzazioni tardive". Nessuna dipende da uno stimolo esterno, ma possono comparire per cause patologiche come un sovraccarico nel cuore di calcio. Se sono piccole, causano piccole oscillazioni del potenziale di membrana, se sono ampie possono generare potenziali d'azione propagati, chiamati trigger response, i quali possono portare anche ad aritmie cardiache mortali. Le after-depolarization dipendono dal precedente AP che fa da trigger e l'aritmia che risulta mantiene una relazione con esso.

Esistono due tipi di after-depolarization:

- **Early after-depolarizations (EAD):** insorgono durante la fase di plateau e di ripolarizzazione del potenziale d'azione (fasi 2 e 3), quando varie correnti entranti (calcio e sodio) e uscenti (potassio) contribuiscono a determinare il corso del potenziale.
Le EAD sono per lo più indotte da diminuzione della conduttanza dei canali del potassio, per questo l'ipocaliemia e la bradicardia, che appunto riducono le correnti del potassio, favoriscono la loro genesi;
- **Delayed after-depolarizations (DAD):** insorgono durante la diastole elettrica, cioè dopo che la cellula è stata ripolarizzata (fase 4), in condizioni di sovraccarico cellulare di calcio. Esse conseguono all'attivazione di correnti depolarizzanti da parte di anomale oscillazioni della concentrazione intracellulare di calcio, generalmente promosse dal precedente AP (1 trigger), e vengono favorite dalla tachicardia.

1.6.4 IL RIENTRO

In particolari condizioni, un impulso cardiaco può eccitare la stessa regione attraverso la quale era passato in precedenza: questo fenomeno è noto come rientro e può essere di tipo ordinato, nel quale l'impulso attraversa una via anatomica ben stabilita, e di tipo casuale dove tale via cambia in continuazione. La genesi di un circuito di rientro richiede un dissincronismo nell'attivazione, tale per cui all'interno di uno stesso ciclo cardiaco coesistano zone ancora attivate e zone che hanno già superato il periodo refrattario e possono, quindi, venire riattivate dalle prime. Tale condizione è favorita da una riduzione della velocità di conduzione, accorciamento del periodo refrattario e presenza di conduzione unidirezionale. Inoltre la genesi dei circuiti di rientro è favorita dalla disomogeneità della conduzione e della ripolarizzazione del miocardio. Tale disomogeneità può aver base anatomica ed essere permanente, oppure anche soltanto temporanea. In ogni caso, il rientro è il più comune meccanismo alla base delle tachicardie.

CAPITOLO 2

MODELLISTICA MATEMATICA DEL POTENZIALE DI AZIONE ATRIALE

2.1 IMPORTANZA DEI MODELLI MATEMATICI

Un modello, dal latino *modulus* (diminutivo di *modus*, misura), è una rappresentazione di un oggetto o di un fenomeno, che corrisponde alla cosa modellata per il fatto di riprodurre alcune caratteristiche o comportamenti fondamentali; in modo tale che questi aspetti possano essere mostrati, studiati, conosciuti laddove l'oggetto modellato non sia direttamente accessibile o completamente non noto.

La costruzione di modelli concettuali è una parte essenziale della nostra interazione con il mondo e costituisce la base dell'indagine scientifica. La costruzione di un modello scientifico o tecnico, per quanto possa essere geneticamente orientata o guidata in partenza da una teoria metafisica, è sempre il risultato di un contesto della prova rigoroso, predisposto in modo tale da non essere minimamente influenzato dalle aspettative e dall'interpretazione soggettiva degli osservatori (Israel, 1986).

Un modello matematico è un modello costruito usando il linguaggio e gli strumenti della matematica. Come tutti i modelli usati nella scienza, il suo scopo è quello di rappresentare il più incisivamente un determinato oggetto.

Nell'ambito dell'elettrofisiologia cardiaca, ovvero l'analisi del comportamento elettrico del cuore, l'utilizzo di modelli matematici per riprodurre i meccanismi alla base della generazione del potenziale d'azione è fondamentale, in quanto la possibilità di esperimenti ed indagini dirette sul cuore umano è di gran lunga limitata.

Grazie dunque allo sviluppo di questi ultimi è possibile:

- Predire l'evoluzione di un sistema biologico, in funzioni di stimoli diversi in situazioni non verificabili sperimentalmente;
- Formulare e validare quantitativamente ipotesi biologiche;
- Ricostruire segnali (potenziali di azione, segnali pseudo-elettrocardiografici);

Modellistica matematica e simulazione numerica sono quindi strumenti che hanno ampliato le conoscenze e le possibilità di analisi del comportamento delle cellule cardiache, per comprendere i meccanismi coinvolti nell'eccitabilità.

2.2 MODELLI MATEMATICI DELL'ELETTROFISIOLOGIA CARDIACA

Il primo modello volto a riprodurre la dinamica delle correnti ioniche nelle cellule eccitabili fu sviluppato da Alan Lloyd Hodgkin e Andrew Fielding Huxley nel 1949. Tale modello, dedotto da numerose osservazioni sperimentali attuate su assoni giganti di calamaro, nasce per interpretare le misure ottenute in "voltage clamp". Il *voltage clamp* è una tecnica utilizzata per determinare l'apertura e la chiusura dei canali ionici, ovvero una misura diretta della corrente che passa istante per istante attraverso la membrana, mantenendo costante il potenziale applicato ai capi della membrana cellulare.

In particolare, essi hanno effettuato una serie di misure dell'andamento nel tempo delle correnti ioniche di sodio e potassio al variare del potenziale di membrana, potendo così risalire all'andamento nel tempo delle conduttanze per il sodio e il potassio.

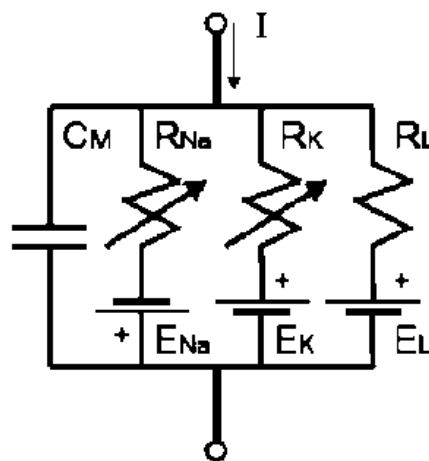


Figura 8: Circuito elettrico relativo alla membrana cellulare utilizzato da Hodgkin e Huxley. $R_{Na} = 1/g_{Na}$; $R_k = 1/g_k$; $R_l = 1/g_l$. R_{Na} e R_k variano col tempo e col potenziale di membrana, gli altri componenti rimangono costanti. (Hodgkin., 1952a)

La loro tecnica di modellazione supponeva che la permeabilità della membrana fosse regolata da meccanismi di passaggio degli ioni in base ai quali entità distinte (gates) regolavano in modo distinto i flussi di Na^+ e K^+ .

Per riprodurre gli andamenti trovati sperimentalmente nell'assone gigante di calamaro, in un fondamentale lavoro pubblicato nel 1952, Hodgkin e Huxley (Hodgkin., 1952a), (Hodgkin, 1952b), (Hodgkin, 1952c) (Hodgkin. H. , 1952d) ,hanno proposto le espressioni seguenti per le suddette conduttanze:

$$g_K = \bar{g}_K n^4$$

$$g_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h$$

dove g_K e g_{Na} sono delle costanti, mentre $n(t)$, $m(t)$ e $h(t)$ sono delle *variabili adimensionali* rappresentative della cinetica molecolare di ipotetiche sostanze in grado di far variare la conducibilità della membrana ai diversi ioni. In particolare, n è chiamato fattore di attivazione della conduttanza g_K , m e h sono chiamati, rispettivamente, fattore di attivazione e di inattivazione della conduttanza g_{Na} .

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

A partire dal modello di Hodgkin e Huxley, con gli anni si sono evoluti numerosi modelli biologici, tra i quali anche quelli di cellule cardiache. Il primo di questi risale al 1960, con Fitz Hugh-Noble; lo scopo di questo modello era sostanzialmente quello di riprodurre il plateau dell'AP cardiaco nelle fibre di Purkinje, risultato effettivamente raggiunto, anche se non erano in grado di riprodurre il flusso entrante di calcio ed il rilascio di quest'ultimo dal reticolo. I primi esperimenti di voltage-clamp in cardiomiocita, infatti, riuscirono soltanto nel 1964 (Deck, 1964) e portarono alla scoperta delle correnti di calcio.

Aspetti importanti sugli spostamenti del calcio intracellulare furono introdotti in seguito nel modello della cellula di Purkinje del 1985 di DiFrancesco-Noble (Di Francesco, Noble., 1985) ed in quello del Luo-Rudy del 1994 (Rudy, 1994). Gli aspetti più importanti di questi modelli furono l'introduzione del compartimento intracellulare relativo al reticolo sarcoplasmatico, gli scambiatori e le pompe ioniche.

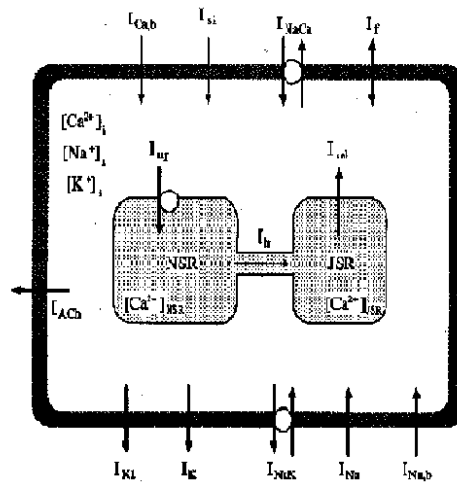


Figura 9:Modello Di Francesco-Noble (Di Francesco, Noble ., 1985)

Dal 1990 sono stati pubblicati alcuni modelli di miociti atriali basati su dati ricavati da cellule animali, tra i quali ricordiamo quello di Rasmusson et al. (Rasmusson, 1990), quello di Earm e Noble (Earm, 1990) e quello di Hilgermann e Noble (Hilgermann, 1987). I primi hanno presentato un modello di cellula atriale pacemaker basati su dati ricavati da animale (rana,toro). I secondi, invece, si sono proposti di dare una rappresentazione della relazione tra correnti di calcio e il rilascio del calcio, mentre i terzi hanno presentato un modello di cellule dell'atrio del topo.

Recentemente però si è spostato l'interesse dai modelli generali, a modelli più dettagliati relativi a singolo miociti atriali di una determinata specie ed in particolare dell'uomo.

Per le cellule atriali umane esistono due modelli principali, entrambi pubblicati nel 1998: il modello di Courtemanche (Courtemanche, 1998) e quello di Nygren (Nygren, 1998). Modelli più recenti, basati su nuovi studi sperimentali, che però non si discostano molto dai precedenti, sono:

- il modello di Maleckar (Maleckar, 2008), che consiste sostanzialmente in una riformulazione del modello di Nygren, migliorando le descrizioni delle correnti ioniche che sono alla base della ripolarizzazione dell'AP;
- il modello di Grandi (Grandi, 2011), ottenuto per differenza a partire dal modello precedentemente pubblicato dagli stessi autori per il ventricolo umano, in particolare concentrato sulla gestione del calcio intracellulare;
- il modello di Koivumäki (Koivumäki, 2011), il primo ad includere una caratterizzazione spazio-temporale del reticolo sarcoplasmatico durante rilascio e assorbimento di calcio.

Un confronto dei modelli atriali elencati viene proposto in Figura 10, dove è possibile vedere le differenze sia in termini di struttura che di potenziale d'azione. In seguito invece verranno considerate le caratteristiche più importanti per ogni modello.

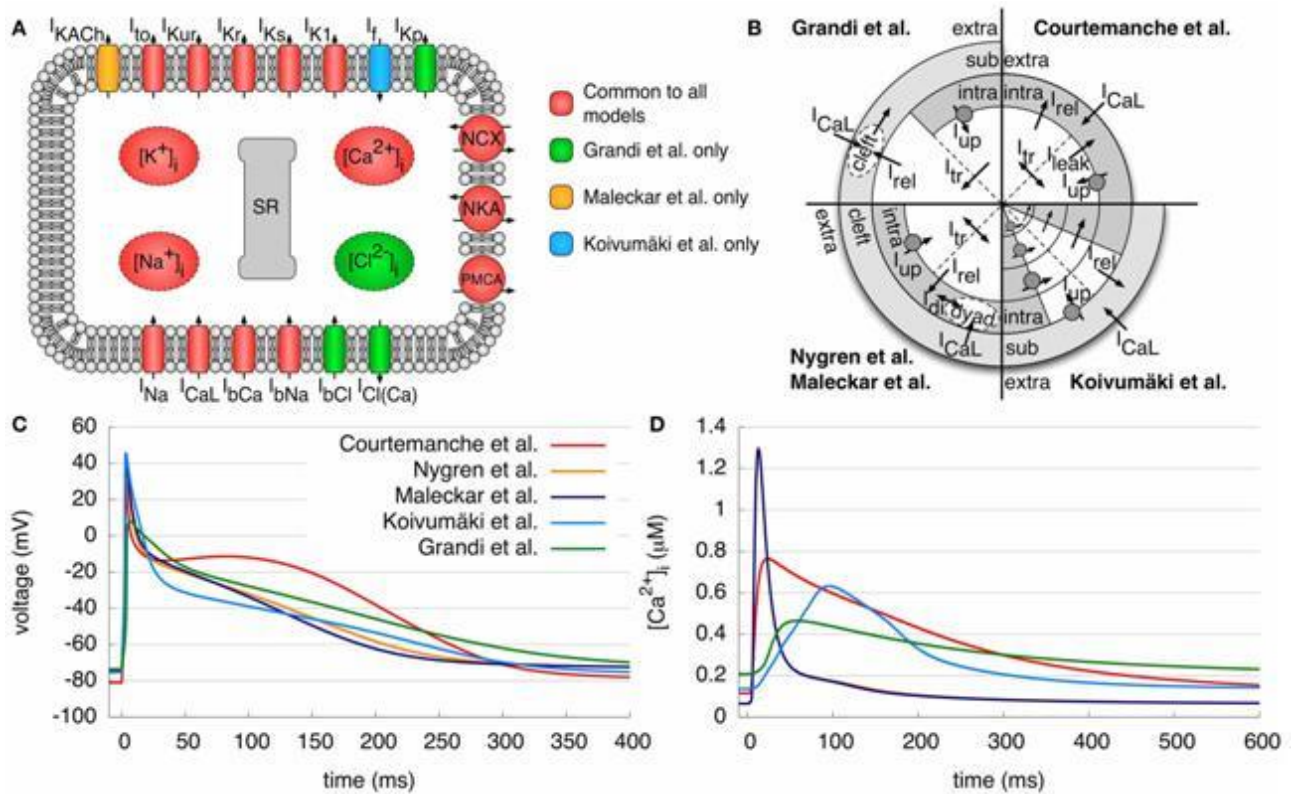


Figura 10: A) Schema della membrana cellulare; B) schema del calcio nei differenti compartimenti; C/D) Risultato dell'AP e della rispettiva concentrazione intracellulare di calcio nei 5 modelli (Mathias, 2013)

2.3 PRINCIPALI CARATTERISTICHE DEI MODELLI ATRIALI

Il modello di Courtemache si basa sul modello ventricolare delle cellule di guinea pig e di topo di Luo and Rudy (Rudy, 1994). Il reticolo sarcoplasmatico è diviso in due compartimenti, uno per l'assorbimento ed uno per il rilascio di calcio. La corrente I_{up} pompa il calcio nel reticolo sarcoplasmatico ed una corrente di dispersione I_{leak} consente il flusso nello spazio intracellulare. La corrente di trasferimento I_{tr} trasporta il calcio al compartimento di rilascio dove i contenitori di calcio vengono svuotati nello spazio intracellulare dalla corrente di rilascio I_{rel} .

L'originale applicazione del modello di Courtemache era quella di investigare il tasso di dipendenza del potenziale di azione e la sua risposta all'inibizione della I_{CaL} e dello scambiatore sodio-calcio.

Il modello di Nygren è basato sui dati ottenuti dalla tecnica del voltage-clamp registrati da un singolo miocita isolato, ed è stato sviluppato in particolare per studiare le differenze della corrente di ripolarizzazione atriale tra i miociti del coniglio e quelli dell'uomo.. Tale modello utilizza il circuito elettrico equivalente formulato da H&H unito ad un sistema di compartimenti. Le dimensioni della cellula umana sono state ipotizzate pari a quelle del topo riportate nel modello di Lindblad (Lindblad, 1996) (parte del modello è basato su questo) e la capacità totale di membrana è stata impostata a 50 pF. Gli autori hanno notato delle differenze sostanziali soprattutto nelle correnti ripolarizzanti, quali I_{sus} e I_{CaL} , le quali hanno un ruolo importante nel determinare la durata del potenziale d'azione. Come risultato finale il transiente di calcio ha un'ampiezza maggiore ed è molto più corto (300ms) rispetto al modello di Courtemache. Inoltre il potenziale di azione del modello di Nygren ha una forma più triangolare.

Il modello di Maleckar, basato sul modello di Nygren, riformula le correnti di ripolarizzazione I_{kur} e I_{to} , usando dati sperimentali più recenti. Il flusso elettricamente neutro del sodio è stato rimosso, ed è stata aggiunta una corrente I_{kach} (acetilcolina-activated K^+) per simulare gli effetti della stimolazione vagale. Il potenziale di azione ed il transiente di calcio sono molto simili a quelli di Nygren. Lo scopo di questo modello è di fornire una descrizione più accurata della ripolarizzazione dell'AP atriale umano al variare della frequenza, e di studiare gli effetti dell'accoppiamento dei miociti con i fibroblasti.

Proprio a partire dal modello di Maleckar è stato sviluppato il modello di Koivumaki et al. pubblicato nel 2011. Si tratta di un modello atriale di un miocita umano adulto, dettagliato spazialmente e fisiologicamente, incentrato sulla dettagliata gestione del calcio Ca^{2+} rilasciato e assorbito dal reticolo sarcoplasmatico.

Il modello più recente è quello di Grandi (Grandi, 2011), pubblicato sempre nel 2011. Come abbiamo già detto, è stato ottenuto per confronto dal corrispondente modello umano ventricolare con dati atriali, ed, eredita molte caratteristiche dal modello di coniglio di Shannon (Shannon T. R., 2004), sviluppato sempre dallo stesso gruppo di ricerca.

In contrasto con gli altri modelli atriali, vengono prese in considerazione anche la concentrazione di cloro, con due relative correnti; una corrente di background ed una corrente $I_{Cl(Ca)}$, attivata dal calcio. Inoltre viene inclusa una corrente I_{kp} . Per I_{to} e I_{kur} sono state utilizzate delle formulazioni simili al modello di Maleckar. La corrente intracellulare del calcio è identica a quella già utilizzata dal modello ventricolare di Shannon. Il transiente di calcio mostra un lento innalzamento, una ampiezza ridotta e un lento decadimento verso una più alta concentrazione diastolica. Questo modello fu originariamente sviluppato per analizzare le differenze tra l'atrio e il ventricolo umano con una maggiore attenzione verso il comportamento del calcio.

Nelle tabella seguenti sono riportate le proprietà del transiente di calcio e dell'AP per i differenti modelli atriali, da confrontarsi con i relativi dati sperimentali disponibili .

Tabella 1: Proprietà dei differenti modelli atriali (Mathias, 2013)

Proprietà AP	C	N	M	K	G
Ampiezza (mV)	110,11	116,14	119,14	120,77	81,38
RMP(mV)	-81,04	-74,15	-73,82	-76,13	-73,53
APD ₅₀ (ms)	165,16	29,55	29,77	20,98	125,30
APD ₉₀ (ms)	294,83	220,34	197,09	259,58	330,13
dV/dt _{max} (V/s)	186,58	149,77	160,66	168,54	92,50
[Ca ²⁺] _i μm	0,115	0,065	0,065	0,136	0,208
CaT ampiezza	0,649	1,235	1,227	0,496	0,257

Tabella 2: Valori sperimentali di controllo (Mathias, 2013) (Bosh, 1999) , (Christ, 2008) (Workman, 2011)]

Proprietà AP	Bosh et al.,	Workman et al.,	Christ et al.,
Ampiezza (mV)	116±3		
RMP(mV)	-76,3±2,2	-76,9±2,1	-75,0±0.4
APD ₉₀ (ms)	255±45	209±22	344
dV/dt _{max} (V/s)		203±11	

L'ampiezza del potenziale d'azione dei modelli di Courtemache, Nygren, Maleckar e Koivumaki si trova nello stesso range di misure effettuate da Bosh et al. (Bosh, 1999). Solo il modello di Grandi ha un ampiezza molto più piccola circa di 30-40 mV rispetto agli altri modelli. Il potenziale di riposo della membrana dei modelli di Nygren, Koivumaki, Grandi e Maleckar è simile ai valori mostrati da Bosch, mentre il modello di Courtemache è circa di 5 mV inferiore.

A causa della morfologia del potenziale di azione del modello di Courtemache, di tipo "spike-and-dome", la durata del potenziale d'azione, calcolata al 50% della ripolarizzazione (APD₅₀) risulta maggiore rispetto agli altri modelli. Il modello di Nygren e Maleckar invece presentano un APD₅₀ simile a causa del largo picco in ampiezza e ad un plateau meno esteso. Il modello Grandi, invece, ha un APD₅₀ molto più lungo degli altri nonostante la sua morfologia triangolare. Per

quanto riguarda l' APD_{90} , invece, il modello di Grandi si adatta meglio alle misure effettuate da Christ et al. (Christ, 2008), mentre gli altri modelli presentano un APD_{90} leggermente inferiore.

Le proprietà del transiente di calcio sono state comparate partendo da misure effettuate da Voigt (Voigt, 2009).

I modelli Courtemanche e Koivumäki presentano la stessa concentrazione di calcio intracellulare in fase diastolica (119.7nM) mentre il modello di Nygren e Maleckar hanno un valore inferiore e il modello di Grandi superiore. L'ampiezza del transiente di calcio, invece, è riprodotta meglio da Grandi e Koivumäki, che proprio sulla dinamica del calcio hanno basato gran parte del loro lavoro.

Valutando la stabilità dell'APD nel tempo, considerando stimolazioni ad 1 Hz, si vede che i modelli Nygren, Maleckar, e Grandi raggiungono lo stato stazionario in circa 10 minuti di simulazione, mentre è richiesto più tempo per il modello Koivumäki. Inoltre, il modello Courtemanche rimane stabile per simulazioni per circa 20 minuti di simulazione, ma per simulazioni più lunghe presenta un fenomeno di deriva delle concentrazioni intracellulari di Na^+ e K^+ , che raggiungono valori non fisiologici.

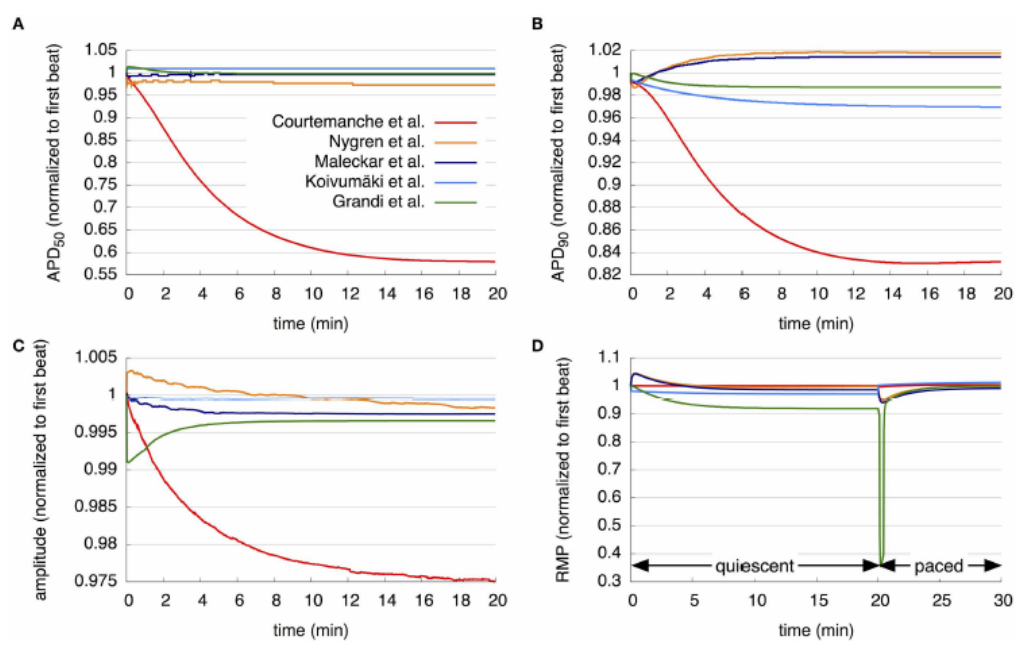


Figura 11: La stabilità a lungo termine dei modelli atriali: APD_{50} , APD_{90} , e ampiezza del potenziale di azione dopo 20 minuti di stimolazione ad 1 Hz (Mathias, 2013)

CAPITOLO 3

IL PROBLEMA DEL CALCIO

3.1 INTRODUZIONE AL PROBLEMA

Il Ca^{2+} ha un ruolo di fondamentale importanza nelle cellule cardiache, sia dal punto di vista elettrico che per l'accoppiamento eccitazione-contrazione e quindi per la loro funzionalità meccanica.

Infatti, dal momento che la corrente di Ca^{2+} interviene soprattutto nella fase di plateau, quella più strettamente collegata alla durata del potenziale d'azione, è quindi fortemente connessa allo sviluppo di aritmie potenzialmente letali per il paziente.

Nei modelli matematici di potenziale d'azione, il Ca^{2+} è presente in più compartimenti, in particolare nello spazio extracellulare, nel citoplasma, nella giunzione e all'interno del reticolo, che svolge proprio la funzione di serbatoio di Ca^{2+} , fondamentale per la contrazione.

Il Ca^{2+} extracellulare è di solito fissato ad un valore costante, pari a 1.8-2 mM: questo valore è legato alle concentrazioni che vengono utilizzate negli esperimenti di elettrofisiologia *in vitro*, ed è in realtà lontano da quello che è il valore fisiologico nel sangue, ovvero circa 1-1.3 mM (Gosling, 1986) (Tietz, 1995).

In letteratura sono presenti analisi sulle differenze di concentrazione di calcio *in vivo*, *in vitro* ed *in silico*: tali analisi hanno confermato la differenza tra la soluzione extracellulare standard e quella del sangue in condizioni fisiologiche (Cerbai, 2009), probabilmente legata al fatto che quando sono state definite le prime soluzioni standard per gli esperimenti *in vitro*, l'importanza delle correnti di Ca^{2+} non era ancora nota, e quindi il Ca^{2+} non era ritenuto uno ione importante dal punto di vista elettrofisiologico. In seguito, nessuno si è mai preoccupato di modificare le soluzioni, e il valore di 1.8-2 mM è diventato lo standard.

È ovviamente corretto simulare l'attività elettrica delle cellule cardiache imponendo la stessa concentrazione extracellulare utilizzata in protocolli sperimentali se il fine ultimo è il confronto con dati sperimentali *in vitro*. Al contrario risulta essere incorretto usare lo stesso valore di concentrazione quando l'analisi *in vivo* risulta essere l'obiettivo finale della simulazione.

Questo diventa particolarmente importante quando si considerano condizioni cliniche in cui la concentrazione di Ca^{2+} nel sangue, quindi extracellulare, si modifica nel tempo. Cambiare questa concentrazione, infatti, ha conseguenze importanti sul potenziale d'azione, e spesso i modelli

costruiti ad hoc sul valore di 1.8-2 mM non sono in grado di riprodurre bene il comportamento delle cellule cardiache per valori di Ca^{2+} inferiori.

Infatti, dati sperimentali acquisiti su cardiomiociti atriali umani e su cardiomiociti sia atriali che ventricolari animali, hanno dimostrato la presenza di una relazione inversa tra la durata del potenziale di azione (APD) e la concentrazione di Ca^{2+} extracellulare per cui al diminuire del Ca^{2+} corrisponde un aumento di APD (Figura 12).

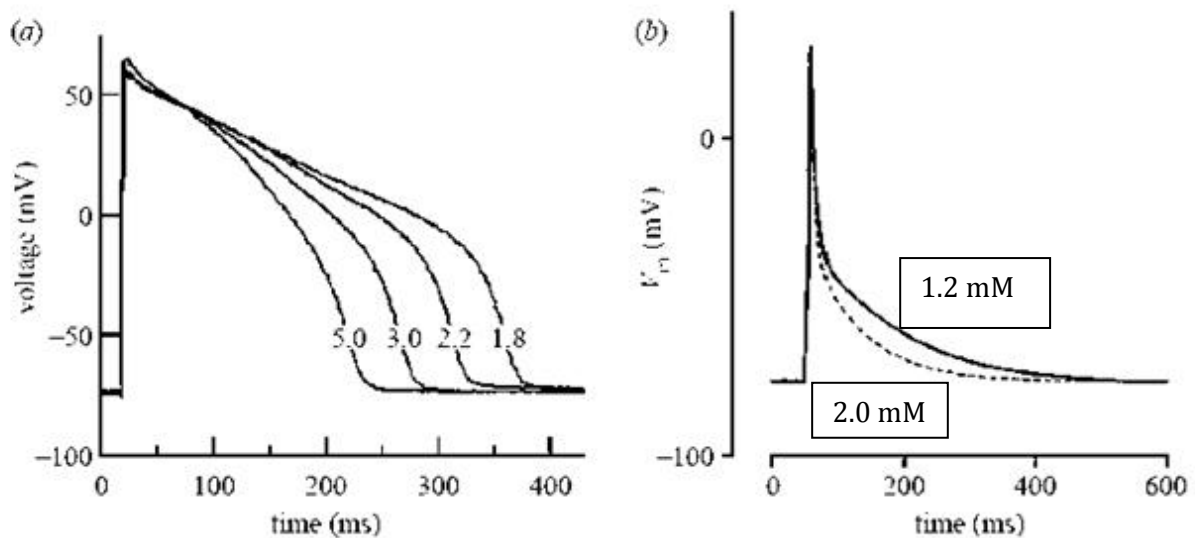


Figura 12: Effetti delle concentrazioni di calcio sul potenziale di azione cardiaco: a) registrazioni sovrapposte del potenziale di azione ventricolare sottoposto a progressivi aumenti della concentrazione del calcio in una cavia animale; b) registrazioni sovrapposte del potenziale di azione atriale sottoposto a concentrazioni di calcio di 1.2 e 2.0 mM in cellule umane. (Cerbai, 2009)

In realtà, però, molti dei modelli matematici di potenziale d'azione cardiaco, sia atriale che ventricolare, correntemente utilizzati non sono in grado di riprodurre tale relazione: anzi, in questi modelli spesso ad un aumento di Ca^{2+} extracellulare corrisponde un allungamento del potenziale d'azione, in netto contrasto con le evidenze sperimentali.

Cerchiamo di analizzare nel dettaglio i meccanismi ionici coinvolti in questo fenomeno: la corrente ionica del calcio I_{CaL} risulta essere il fattore maggiormente interessato dalle variazioni extracellulari di calcio, e come abbiamo detto è anche una corrente che influenza in modo significativo la durata del potenziale d'azione.

Se consideriamo ad esempio un aumento di Ca^{2+} extracellulare, gli effetti principali sulla corrente I_{CaL} saranno due, contrastanti (Figura 13):

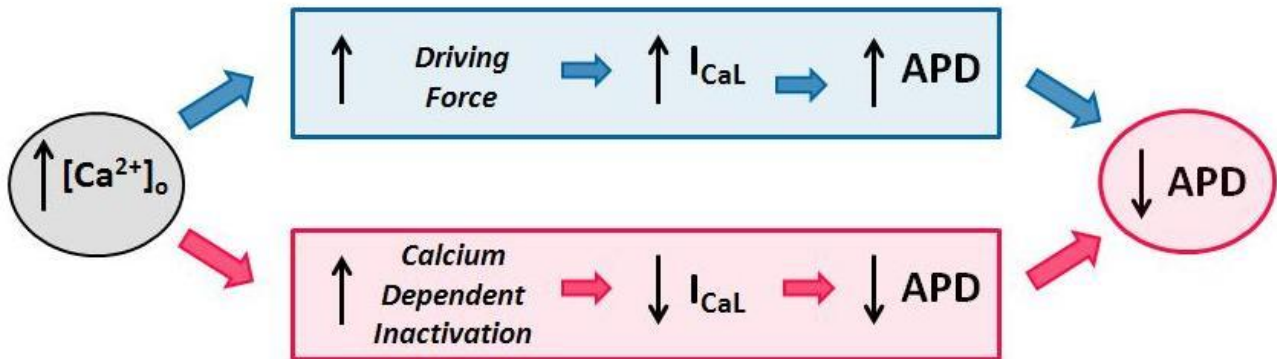


Figura 13: Meccanismo APD-[Ca]_o

- 1) Un aumento della Driving Force, ovvero la differenza tra il potenziale di membrana e il potenziale di equilibrio del Ca^{2+} strettamente legato alla differenza di concentrazione tra i compartimenti intra ed extra-cellulare. L'aumento di driving force si rifletterà in un sostanziale aumento di corrente, e tenderà quindi ad allungare il potenziale d'azione.
- 2) Un aumento del meccanismo a feedback negativo della corrente I_{CaL} , cioè l'inattivazione Ca^{2+} -dipendente: infatti, ad un maggiore corrente corrisponderà un maggiore ingresso di Ca^{2+} nella cellula, e questo tenderà a ridurre la corrente stessa, inattivandola più in fretta.

Dal momento che gli esperimenti mostrano che la somma di questi due effetti deve portare a un'acomplessiva diminuzione della durata del potenziale d'azione, sarà il secondo a giocare il ruolo prevalente.

Il fatto che i modelli matematici correntemente utilizzati non siano in grado di riprodurre correttamente la dipendenza inversa tra durata del potenziale e Ca^{2+} extracellulare, induce quindi a pensare che l'inattivazione Ca^{2+} -dipendente, sia in generale sottostimata in tali modelli, e che sia necessario aumentarne l'importanza per riprodurre i dati sperimentali.

Sulla base di questa ipotesi di lavoro nei successivi capitoli abbiamo modificato un modello di cardiomiocita atriale umano (Koivumäki, 2011) , con l'obiettivo di riprodurre la corretta dipendenza APD-[Ca]_o agendo sulle correnti ioniche del calcio ed in particolare aumentando l'inattivazione calcio dipendente.

CAPITOLO 4

ANALISI DEL POTENZIALE DI AZIONE IN UN MODELLO DI MIOCITA ATRIALE UMANO: IL MODELLO KOIVUMAKI

4.1 INTRODUZIONE AL MODELLO

Gli studi elettrofisiologici sino ad oggi svolti sul cuore umano presentano forti lacune per quanto riguarda l'analisi del ruolo fondamentale del calcio e della sua dinamica, in particolare a livello atriale, per la modulazione dell'accoppiamento eccitazione-contrazione.

Il modello di Koivumaki et al. nasce quindi con il principale obiettivo di migliorare un modello atriale già esistente (il modello Maleckar, già introdotto nel Capitolo 2, concentrandosi in particolare sulla dinamica del calcio: il nuovo modello è quindi quello di una cellula atriale umana adulta, ben dettagliata sia spazialmente che fisiologicamente, con una formulazione del tutto nuova del Ca^{2+} rilasciato e assorbito dal reticolo sarcoplasmatico: in particolare, lo scopo di questo studio è stato proprio quello di chiarire in che misura il Ca^{2+} regola la forma del potenziale di azione (AP), l'eccitabilità della cellula e la dipendenza dei meccanismi elettrofisiologici.

Il modello matematico proposto è basato su un set di equazioni differenziali implementate in un ambiente specifico per il calcolo numerico: Matlab.

4.1.1 STRUTTURA CELLULARE DEL MODELLO

Le componenti dinamiche del modello cellulare sono le variabili di stato che regolano le correnti della membrana e le concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} , K^+ , Na^+ . La cellula è stata modellata come un cilindro di lunghezza di 122.051 μm ed un raggio di 6.02 μm con una capacità di 50 pF (Nygren, 1998).

Lo spazio intracellulare è diviso in più compartimenti: la "giunzione" (junctional space), cioè una piccola regione (0.02 μm) al di sotto della membrana cellulare, dove sono concentrati in particolare i canali ionici, il citoplasma (cytosol) che rappresenta il resto della cellula e il reticolo sarcoplasmatico, che contiene la riserva di Ca^{2+} rilasciato durante il potenziale d'azione. Il citoplasma ed il reticolo sarcoplasmatico sono ulteriormente divisi in 4 compartimenti profondi di 1.625 μm (Michailova, 2002), (Kockskamper, 2001). I recettori della rianodina nel primo

compartimento interagiscono con il compartimento giunzionale, mentre negli altri 3 compartimenti interagiscono con i corrispondenti compartimenti di citoplasma.

Il volume del reticolo sarcoplasmatico è circa il 2.25% del volume della massa citoplasmatica in ogni compartimento (Frank, 1975). Una rappresentazione schematica del modello Koivumäki è proposta in Figura 14, mentre i principali parametri del modello sono indicati in Tabella 3.

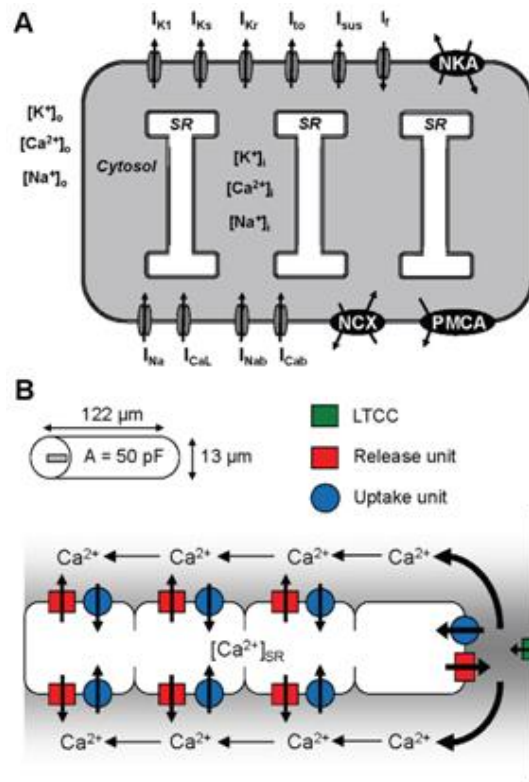


Figura 14:Modello umano di miocita atriale: A) Panoramica schematica del modello; B) Struttura e geometria. (Koivumäki, 2011)

Tabella 3: Parametri fisiologici (Koivumäki, 2011)

Parametri	Definizione	Valore
F	Costante Faraday	96478 C/mol
R	Costante gas	8314 mJ/(mol K)
T	Temperatura	306.15 K
Na ⁺	Concentrazione sodio	130 mM
Ca ²⁺	Concentrazione calcio	1.8 mM
K ⁺	Concentrazione potassio	5.4 mM
Cm	Capacità membrana	0.05 nF
r _{ijunct}	Raggio del bulk citosol	6.5 mm
l _{cell}	Lunghezza cellula	122.051 mm
V _{ss}	Volume del subspace	4.9923261025 nL

4.1.2 DIFFUSIONE DEL CALCIO INTRACELLULARE

La diffusione di Ca²⁺ nel citoplasma e nel reticolo sarcoplasmatico è stata modellata con la legge di diffusione di Fick. La quantità di buffer del calcio è stata posta sulla base di dati sperimentali (Hove-Madsen, 2004). La diffusione tra citoplasma e giunzione è stata modellata con un'equazione analitica di diffusione (Shannon T. R., 2004). Il volume accessibile per la diffusione del calcio nel citoplasma e nel reticolo è stata posta circa al 50% del volume totale del compartimento (Michailova, 2002). Anche l'area accessibile per la diffusione di calcio tra la giunzione e la massa del citoplasma è stata imposta al 50% dell'area totale tra i due compartimenti. In passato è stato dimostrato che l'effettivo coefficiente di diffusione per il calcio nel reticolo è di 8-9 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (Swietach, 2008). I principali parametri relativi alla diffusione e al buffering del Ca²⁺ sono elencati in Tabella 4.

Tabella 4: Parametri del calcio buffer (Koivumäki, 2011)

Parametro	Definizione	Valore
D_{Ca}	Coefficiente di diffusione per Ca^{2+}	780 mm/s
D_{CaBm}	Coefficiente di diffusione per Ca^{2+} -buffer	25 mm/s
D_{CaSR}	Coefficiente di diffusione per Ca^{2+} in SR	44 mm/s
[BCa]	Arbitrary cytosol Ca^{2+} buffer	0.024 mM
[SLlow]	Phospholipid concentration (low-affinity sites)	165 mM
[SLhigh]	Phospholipid concentration (high-affinity sites)	13 mM
K_{dBCa}	Costante di dissociazione per il calcio	0.00238 mM
K_{dSLlow}	Costante di dissociazione low	1.1 mM
$K_{dSLhigh}$	Costante di dissociazione high	0,0013 mM

4.1.3 CORRENTI IONICHE DEL SARCOLEMMMA

Le correnti ioniche del sarcolemma sono formulate principalmente come nel modello pubblicato sul potenziale di azione di Nygren (Nygren, 1998), in particolare:

- la corrente I_{to} , corrente transiente uscente in fase 1;
- le correnti I_{KS} e I_{Kr} , correnti rettificate ritardate lenta e rapida;
- la corrente I_{SUS} la quale sostiene la fuoriuscita di potassio;
- la corrente di potassio I_{K1} tempo indipendente;
- la corrente iperpolarizzante I_f ;
- la corrente del sodio rapida I_{Na} ,
- la corrente I_{CaL} entrante del calcio lenta;
- le correnti di background del sodio I_{Nab} e del calcio I_{Cab}
- la pompa sodio-potassio (INCX) e lo scambiatore sodio calcio (INaCa).

La corrente I_{CaL} ha la seguente formulazione :

$$I_{CaL} = g_{CaL} * d * f_{ca} * f_1 * f_2 * (V - E_{Ca,app})$$

In particolare, vediamo che in ogni istante la corrente totale di Ca^{2+} è data dal prodotto di:

- g_{CaL} : conduttanza massima, quella che corrisponderebbe all'apertura totale dei canali

- d: variabile di attivazione (sempre compresa tra 0 e 1)
- f_1 , f_2 e f_{Ca} : variabili di inattivazione (sempre comprese tra 0 e 1), in particolare 2 V-dipendenti e una invece Ca^{2+} dipendente, per riprodurre i due tipi di inattivazione di questa corrente, ovvero VDI (Voltage Dependent Inactivation) e CDI (Calcium Dependent Inactivation)
- Driving force, data dalla differenza tra il potenziale di membrana e il potenziale di equilibrio per il Ca^{2+}

La formula è stata adattata rispetto a quella dei modelli precedenti, in modo da avere una corrente maggiore nel range di potenziale compreso tra -40 mV e -10 mV, e ridurre quindi la possibilità di sviluppo di EAD, dovute alla riattivazione di I_{CaL} .

La formula per il calcolo del valore di regime dell'inattivazione calcio dipendente è la seguente:

$$f_{ca,inf} = 1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{0.001}{Ca_{ss}^{2+}}\right)^2}$$

La costante di tempo è stata adottata da (Ten Tusscher, 2006). La conduttanza del canale, g_{CaL} è stata posta circa a 25.3125 nS per riprodurre un picco di corrente di -12 pA/pF. (Nygren, 1998), (Nattel, 1997) (Ouadid, 1995). Le caratteristiche della corrente I_{CaL} sono riassunte nella Figura 15.

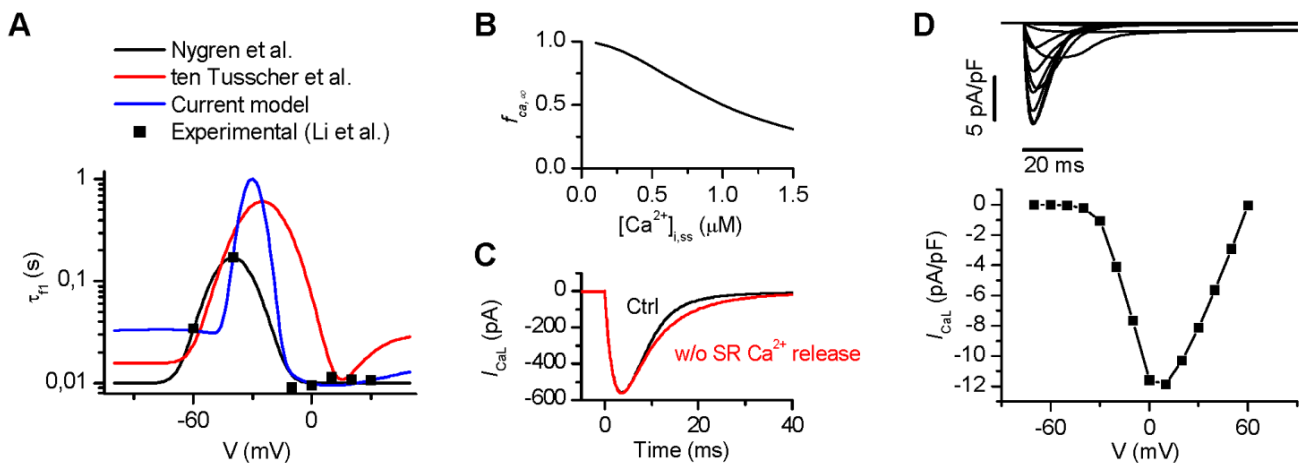


Figura 15: Caratteristiche della corrente del calcio I_{CaL} ; A) in contrasto con la formulazione originale di Nygren (linea nera) la costante di tempo è stata aumentata nel range -40/-10 mV (linea blu); questo approccio era già usato in precedenza in un modello ventricolare (linea rossa). B) Lo stato stazionario della curva del calcio dipendente dall'inattivazione del gate è visto come una funzione del calcio nello spazio giunzionale. C) la corrente di calcio (linea nera) e la stessa in assenza di rilascio di calcio dal reticolo sarcoplasmatico (linea rossa) D) corrente I_{CaL} registrata in simulazioni di voltage clamp (sopra) e la corrispondente curva i-v che mette in relazione ogni valore di potenziale con il corrispondente picco di corrente (Koivumäki, 2011)

4.2 CORRENTI IONICHE E CARATTERISTICHE DEL POTENZIALE DI AZIONE

In Figura 16 è rappresentato il potenziale d'azione riprodotto dal modello Koivumäki, con le relative correnti sottostanti, considerando una stimolazione a 1Hz.

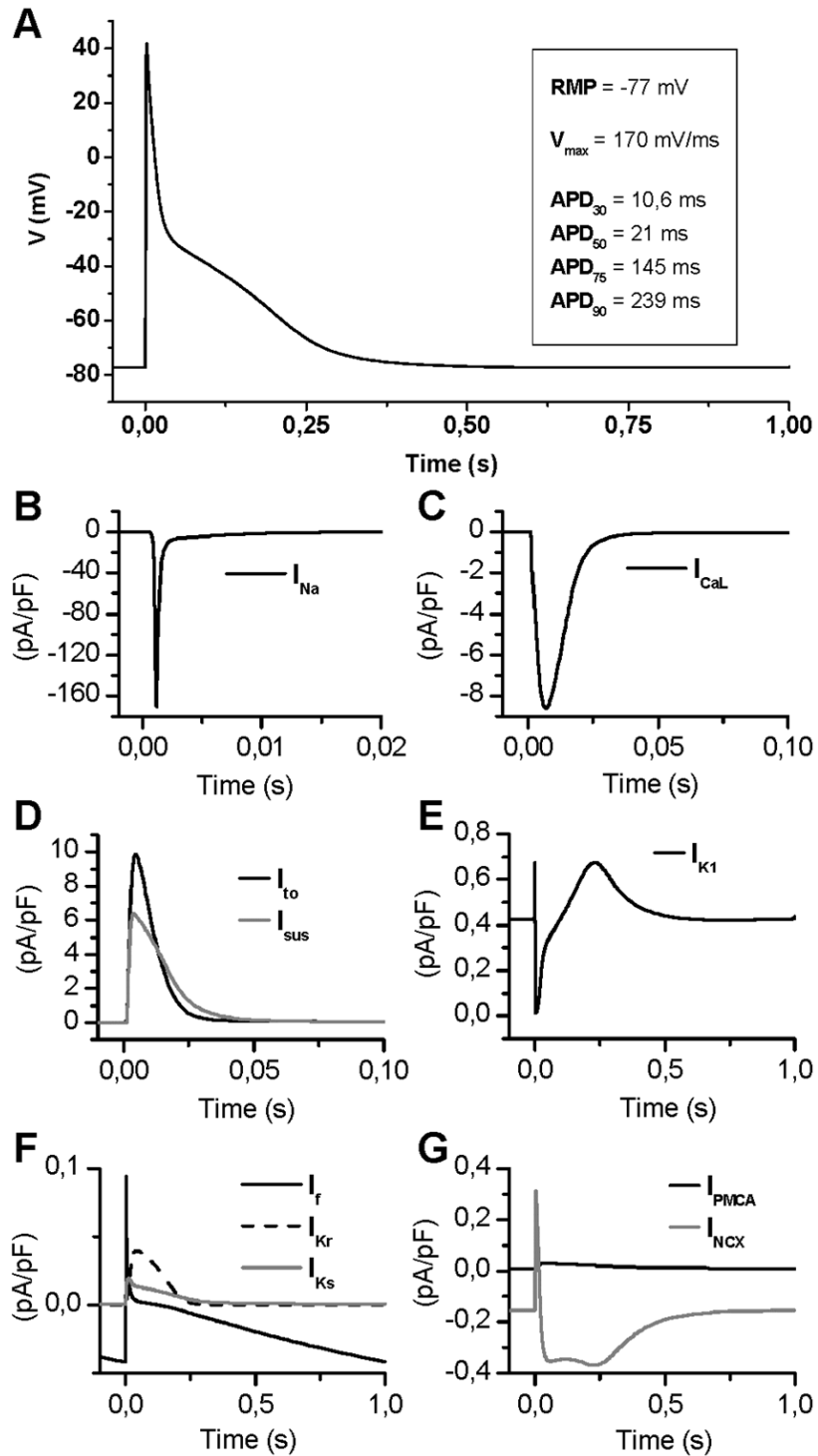


Figura 16: Il potenziale d'azione del modello koivumäki (a) e le relative correnti sottostanti (Koivumäki, 2011).

Le correnti che intervengono maggiormente nella fase iniziale del potenziale di azione, e quindi depolarizzanti, sono le correnti I_{Na} e I_{CaL} mentre il ruolo dello scambiatore I_{NCX} diventa importante nella fase finale. Le correnti I_{to} e I_{SUS} sono correnti ripolarizzanti nella parte iniziale del potenziale di azione cioè tendono a riportare il potenziale di membrana verso il suo valore di riposo. La ripolarizzazione finale, poi, è legata alle correnti del potassio, ovvero I_{k1}, I_{ks}, I_{kr} . Anche se vi è una presenza significativa di I_f nei miociti atriali, questa non contribuisce significativamente al potenziale di azione perché si attiva a tensioni al di sotto di -80 mV.

Il potenziale d'azione del modello è quindi in pieno accordo con i valori sperimentali per quanto riguarda il potenziale di membrana a riposo (-77 mV), la velocità di salita dell'AP (170 mV/ms), l'ampiezza dell'AP (119 mV) e la durata $APD_{30} = 11ms$ e $APD_{90} = 239 ms$, come evidenziato dalla Tabella 6.

Tabella 5 :Confronto delle caratteristiche del potenziale di azione

Parametri	vCA	vCANass	vCaNasslk	Valori sperimentali
V_{diast} (mV)	-77.0	-76.0	-75.3	-79.9 ± 1.3; T = 36°C -75 ± 1 ; T = 35°C -68 ± 8 ; T = 37°C
V_{syst} (mV)	41.7	41.6	41.7	35 ± 2.8; T = 36°C 53 ± 2; T = 37°C
V_{ampl} (mV)	118.8	117.7	117.0	98 ± 5 ; T = 36°C 118.33 ± 3.00; T = 36°C 130 ± 2; T = 37°C
dV/dt_{max} (mV/ms)	170	169	168	167 ± 26 ; T = 36°C 231.9 ± 13.6 ; T = 36°C 172 ± 60 ; T = 31°C
APD_{30} (ms)	10.6	10.8	10.8	13 ± 16 ; T = 31°C 13.9 ± 3.7 ; T = 23°C; 0.5 Hz
APD_{50} (ms)	21.0	20.8	20.8	7.65 ± 1.12 ; T = 36°C 62 ± 91 ; T = 31°C 25 ± 3 ; T = 37°C
APD_{75} (ms)	145.4	148.4	136.0	141 ± 12 ; T = 37°C
APD_{90} (ms)	239.4	244.4	246.8	204 ± 11 ; T = 36°C 237 ± 18 ; T = 37°C 255 ± 45 ; T = 35°C

4.3 DURATA DEL POTENZIALE DI AZIONE AL VARIARE DELLA FREQUENZA

Aumentando la frequenza di stimolazione si provoca una immediata e successivamente graduale diminuzione della durata del potenziale. Risultati sperimentali indicano che questo adattamento coincide con cambiamenti funzionali dei canali L-type a seguito di un sovradosaggio del calcio (Yue, 1997), (Daoud, 1997); questo è visto come uno dei meccanismi che sottolinea i cambiamenti dell'APD (Courtemanche, 1998).

Studi svolti a livello dei miociti ventricolari hanno dimostrato che uno dei fattori più importanti durante la stimolazione veloce risulta essere l'accumulo di sodio nel citoplasma (Grandi., 2009) (Han, 2002). Per studiare meglio il fenomeno nei cardiomiociti atriali Koivumäki et al., hanno simulato condizioni sperimentali in un range fisiologico di frequenze.

La Figura 17 mostra i cambiamenti del modello, in particolare in termini di APD, al variare della durata del ciclo cardiaco (BCL), che corrisponde all'inverso della frequenza di stimolazione.

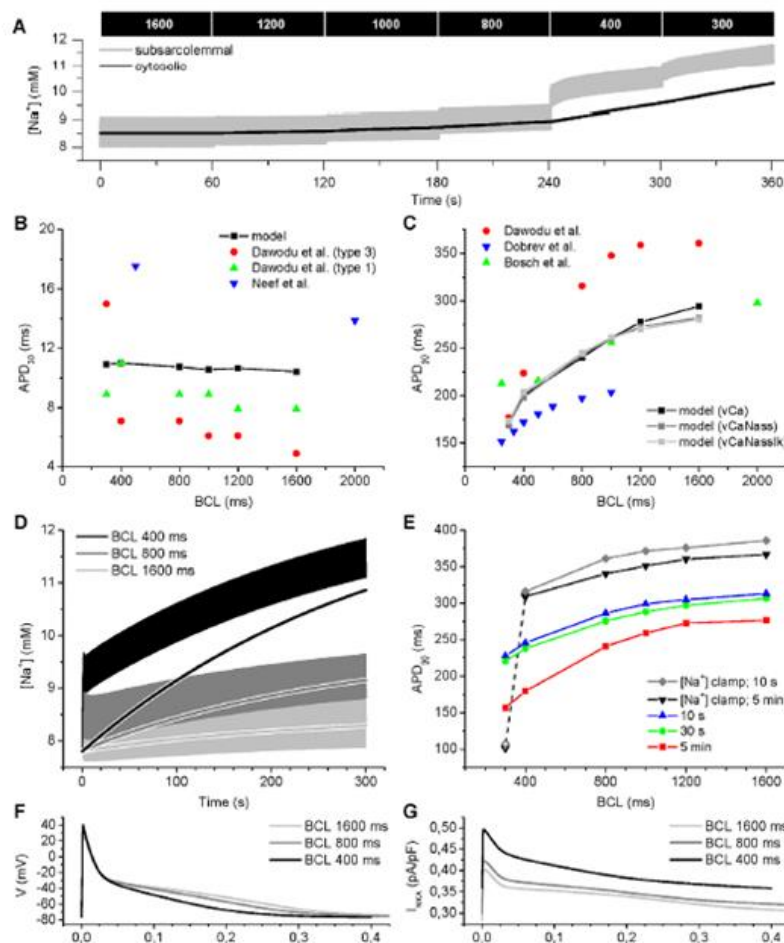


Figura 17: Dipendenza della durata del potenziale d'azione dalla frequenza di stimolazione (Koivumäki, 2011)

4.4 DURATA DEL POTENZIALE DI AZIONE AL VARIARE DELLA CONCENTRAZIONE DI CALCIO EXTRACELLULARE

Studi sperimentali presenti in letteratura hanno evidenziato come la concentrazione di calcio extracellulare influenzi l'attività elettrica cardiaca: come regola generale, elevate concentrazioni di calcio accorciano il potenziale di azione, mentre piccole concentrazioni lo allungano; in definitiva, quindi, la durata del potenziale di azione è inversamente proporzionale all'incremento della concentrazione di calcio.

Come molti tra i modelli sia atriali che ventricolari pubblicati, anche il modello Koivumaki non è in grado di riprodurre correttamente questa dipendenza, e anzi tende a rispondere con un allungamento del potenziale d'azione al crescere del calcio extracellulare.

Un'analisi preliminare ci ha appunto permesso di quantificare questa dipendenza: i risultati di Figura 18 mostrano come per simulazioni di breve durata (circa 5s, 1Hz), il modello mostri un'APD decrescente con il calcio extracellulare, e quindi un risultato in accordo con i dati sperimentali. Simulando un periodo di tempo maggiore, invece, fino al raggiungimento dello stato stazionario, questa dipendenza si inverte e il risultato diventa quindi in disaccordo con i dati sperimentali.

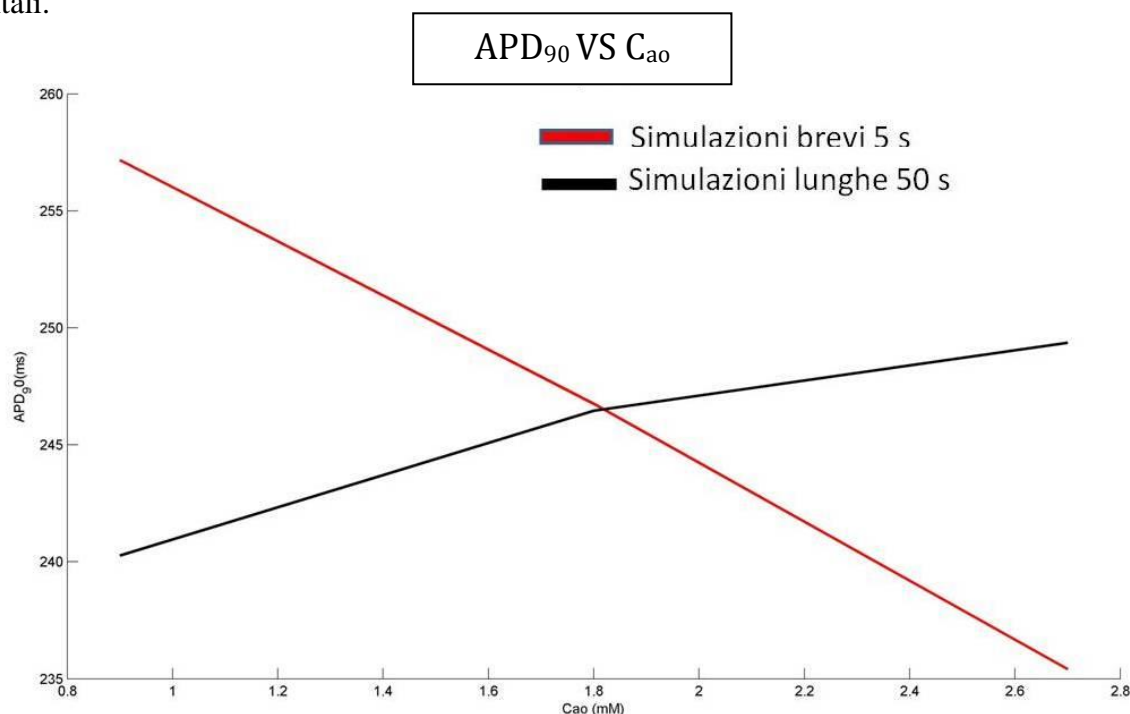


Figura 18: Dipendenza della durata del potenziale di azione dall'incremento di calcio (la line rossa mostra una dipendenza inversamente proporzionale per simulazioni brevi, la nera una dipendenza direttamente proporzionale per simulazioni lunghe)

Questa risulta quindi essere una delle limitazioni fondamentali del modello di Koivumaki. Il presente lavoro di tesi si è quindi posto l'obiettivo di analizzare i meccanismi alla base di questo comportamento e modificare la formulazione della corrente di Ca^{2+} di questo modello, per riuscire a riprodurre un andamento dell'APD in risposta a variazioni di Ca^{2+} extracellulare in accordo con i dati sperimentali.

CAPITOLO 5

METODI & RISULTATI

Nel capitolo precedente è stato sottolineato come nel modello atriale di Koivumaki la dipendenza della durata del potenziale d'azione (APD) dalla concentrazione del calcio extracellulare segua una dipendenza diretta, in disaccordo con i dati sperimentali presenti in letteratura. Questa limitazione del modello ha quindi costituito il punto di partenza di questo lavoro di tesi, volto a modificare il modello per riprodurre la corretta relazione tra APD e $[Ca^{2+}]_o$.

Tutte le simulazioni sono state eseguite in ambiente Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA): il modello è stato implementato come un set di equazioni differenziali ordinarie, risolte utilizzando un solutore numerico della OdeSuite di Matlab (ode15s). Il modello è stato stimolato con un treno di impulsi di corrente di ampiezza -960 pA con frequenza 1Hz, per un periodo variabile tra 150 e 500 s, per permettere alla cellula il raggiungimento di uno stato di equilibrio, monitorando le variazioni delle concentrazioni intracellulari di Na^+ e K^+ .

5.1 IN CHE MODO LA CONCENTRAZIONE DI CALCIO INFLUENZA LA DURATA DEL POTENZIALE DI AZIONE?

Per capire in dettaglio il percorso che è stato seguito, in Figura 19 è riportato uno schema rappresentativo di tutti i meccanismi ionici implicati nella dipendenza della durata del potenziale d'azione dal Ca^{2+} extracellulare. In particolare, sono stati considerati sia gli effetti a breve termine che quelli con una dinamica più lenta, che quindi iniziano ad avere effetto solo quando si considerano simulazioni più lunghe, per cercare di spiegare le differenze di comportamento nel modello tra simulazioni brevi (5 s) e lunghe (150-500 s).

Sono state considerate concentrazioni di Ca^{2+} extracellulare in un range significativo dal punto di vista fisiologico, ovvero 0.9-2.7 mM.

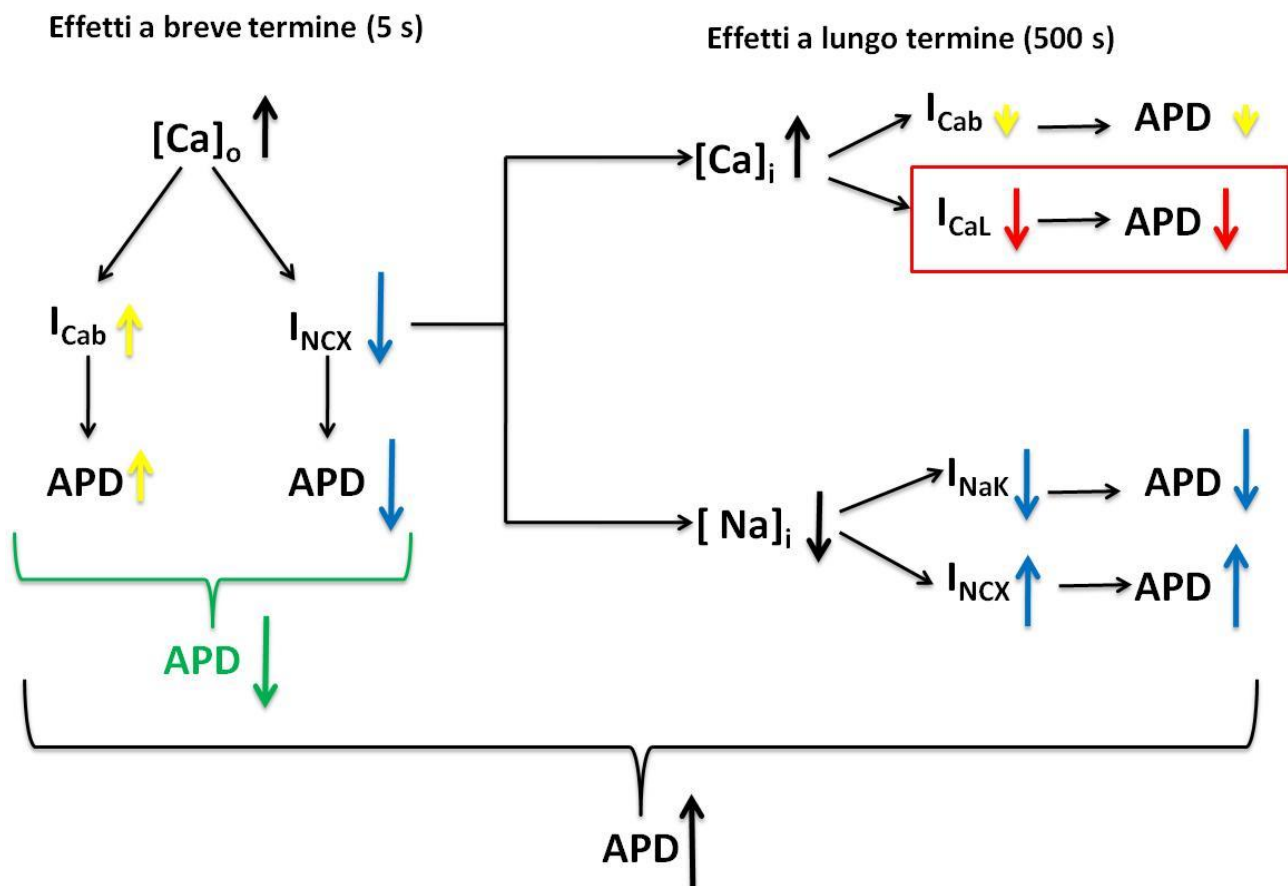


Figura 19: Schema dell'effetto di un aumento di calcio extracellulare sulle correnti e concentrazioni intracellulari nel modello di Koivumaki

Come si può notare in figura, a breve termine un aumento della concentrazione del calcio extracellulare si riflette su due principali correnti: la corrente di background, la quale tende a far entrare il calcio nella cellula, determinando un aumento della durata del potenziale, e lo scambiatore sodio-calcio (NCX), il quale rimuove dalla cellula uno ione Ca^{2+} in cambio di 3 ioni Na^+ , il cui ridotto funzionamento tende ad abbassare la durata del potenziale. Questi due meccanismi sono quindi contrastanti, e dal momento che l'effetto totale è quello di una diminuzione di APD, è chiaro come sia lo scambiatore a giocare il ruolo più importante.

Per simulazioni più lunghe, ovvero nelle quali la cellula viene stimolata fino a raggiungere uno stato stazionario (150-500 s), vengono coinvolti più meccanismi ionici: in particolare, le concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} e Na^+ si modificano rispetto al valore di partenza. Il Ca^{2+} intracellulare, infatti, tenderà ad aumentare: questo aumento, che da un lato riduce leggermente la corrente di background (diminuisce infatti il gradiente di concentrazione tra esterno e interno della cellula), dall'altro tenderà a diminuire la corrente di I_{CaL} , a causa dell'inattivazione Ca^{2+} -dipendente molto rapida: entrambe queste variazioni tendono a ridurre la durata del potenziale d'azione. Il Na^+ intracellulare, invece, tenderà a diminuire, con effetti sulla pompa Na^+/K^+ e sullo scambiatore stesso, attivando un

meccanismo di feedback negativo che tenderà a rialzare il sodio, rendendo quasi trascurabili gli effetti complessivi sul potenziale d'azione.

Riepilogando questi collegamenti, è stato possibile concludere che la dipendenza diretta tra APD e $[Ca^{2+}]_o$ del modello è dovuta principalmente ad una inadeguata inattivazione della corrente del Ca^{2+} , in quanto unico contributo che tende a diminuire il potenziale quando il Ca^{2+} aumenta.

Un'altra importante componente in gioco che influenza le correnti e le concentrazioni è senza dubbio la Driving Force: il flusso netto di carica attraverso un qualsiasi canale ionico, infatti, dipende dalla differenza tra il potenziale di membrana ed il potenziale di equilibrio elettrochimico, strettamente legato alle concentrazioni intra ed extracellulari. All'aumentare del $[Ca^{2+}]_o$ la Driving Force aumenta, ed è proprio questo che comporta un aumento delle correnti di Ca^{2+} , che tenderanno ad essere più ampie e quindi ad allungare il potenziale d'azione. Proprio per questo, si ribadisce ancora una volta l'importanza del meccanismo di inattivazione Ca^{2+} -dipendente, che agisce invece come un feedback negativo, diminuendo la corrente entrante di Ca^{2+} quando il $[Ca^{2+}]_o$ aumenta.

5.2 MODIFICHE AL MODELLO DI KOIVUMAKI

Sulla base delle considerazioni precedentemente fatte, il punto di partenza di questo studio è stato quello di analizzare in dettaglio la formulazione della corrente I_{CaL} nel modello di Koivumaki:

$$I_{CaL} = g_{CaL} * d * f_{ca} * f_1 * f_2 * (V - E_{Ca,app})$$

Dove:

g_{CaL} = conduttanza (25,3125 nS)

$(V - E_{Ca,app})$ = driving force

V = potenziale di membrana

d = gate di attivazione

f_1, f_2 = gate di inattivazione V-dipendenti

f_{ca} = gate di inattivazione Ca^{2+} -dipendente

La cinetica della corrente del calcio è descritta dunque da una g_{CaL} che rappresenta la conduttanza massima dei canali, ovvero la conduttanza totale che si avrebbe nel caso in cui tutti i canali fossero aperti, moltiplicata a tutte le variabili di gating che, comprese tra 0 e 1, rappresentano la frazione di canali attivati/inattivati, e determinano quindi l'ampiezza totale della corrente. La forza motrice, o Driving Force, è data dalla differenza tra il potenziale di membrana e il potenziale di equilibrio per

lo ione Ca^{2+} (ECa), che viene definito “apparente” in quanto, rispetto alla formulazione derivata direttamente dall’equazione di Nernst, tiene conto della presenza di alcune cariche che possono trovarsi in prossimità del canale e quindi schermare le reali concentrazioni intra ed extra-cellulari.

5.2.1 LA DRIVING FORCE

La prima cosa che è emersa analizzando proprio la driving force, è stata la presenza di potenziale di equilibrio per il Ca^{2+} costante (nel modello Koivumaki è infatti fisso a -60mV), e che quindi non dipende realmente dalle concentrazioni di tale ione nei compartimenti intra ed extra-cellulare. Questo fatto, che da un lato contribuisce a tenere sotto controllo l’incremento di driving force che si avrebbe altrimenti all’aumentare del Ca^{2+} extracellulare, dall’altro non è rappresentativo di quello che avviene nella realtà, dove il potenziale di equilibrio dipende appunto dalle concentrazioni ioniche.

Questa prima limitazione è stata dunque risolta introducendo una nuova formulazione per la Driving Force, già utilizzata in altri modelli, e basata sulla formula di Goldman-Hodgkin-Katz (GHK). Questa equazione descrive il flusso ionico trasportato dagli ioni attraverso la membrana cellulare in funzione del potenziale di membrana e delle concentrazioni ioniche presenti all’interno e all’esterno della cellula (Bers, 2001). Poiché sia il voltaggio sia i gradienti di concentrazione influenzano il movimento di ioni, questo processo altro non è che una versione semplificata dell’elettrodifusione descritta da Nernst: l’equazione GHK può essere meglio definita come una soluzione dell’equazione di Nernst:

$$DF = \frac{VF^2}{RT} \left[\frac{\alpha [C_{ass}] e^{\frac{2VF}{RT}} - \beta [C_{ao}]}{e^{\frac{2VF}{RT}} - 1} \right]$$

Dove:

V= Potenziale di membrana

F= Costante di Faraday

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

T= è la temperatura assoluta in Kelvin

I parametri α e β che compaiono nell’equazione non sono definiti in modo specifico, bensì dipendono dal contesto ed assumono valori diversi a seconda del modello considerato. Nel nostro caso abbiamo scelto di utilizzare $\alpha= 1$ e $\beta=0.341$ basandoci sui valori utilizzati in altri modelli di cardiomiocita. (O’Hara, 2011), (Grandi, 2011).

Come previsto, l'inserimento della nuova formulazione per la Driving Force ha contribuito a peggiorare la dipendenza del potenziale d'azione dal Ca^{2+} , come mostrato nelle Figure 20 e 21, ma ci è sembrata una modifica necessaria per migliorare la consistenza del modello.

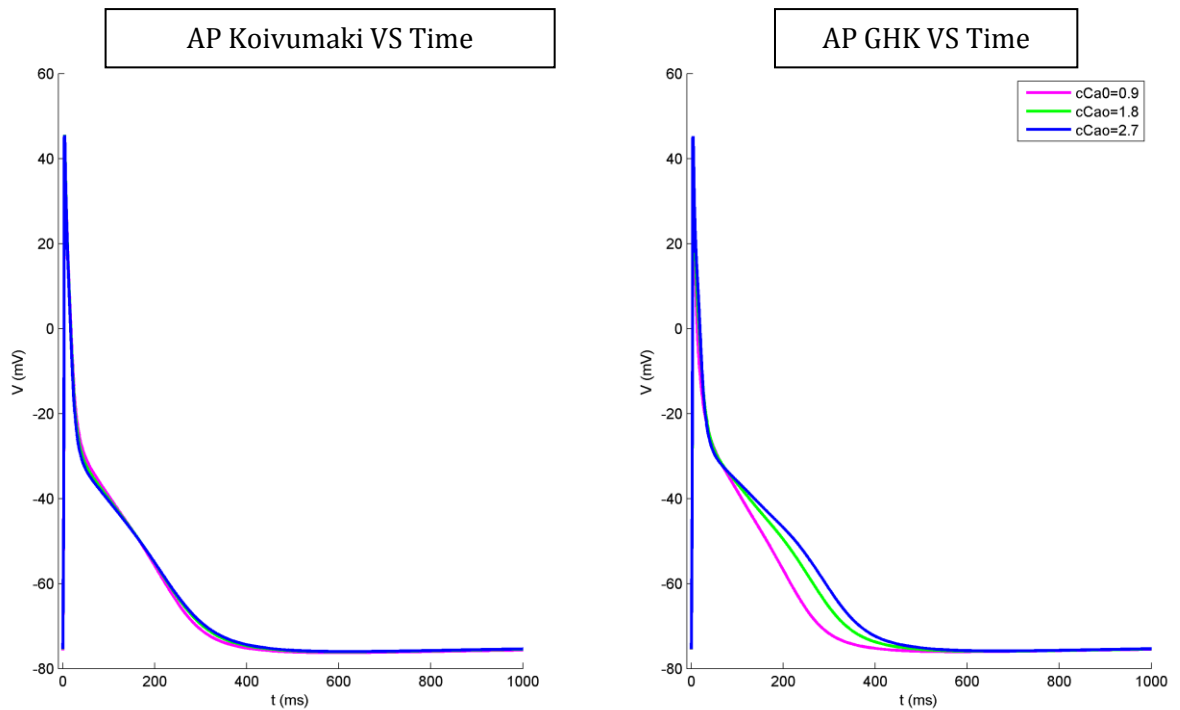


Figura 20: Confronto AP: modello koivumaki originale (sinistra) e modello con Driving Force modificata (destra)

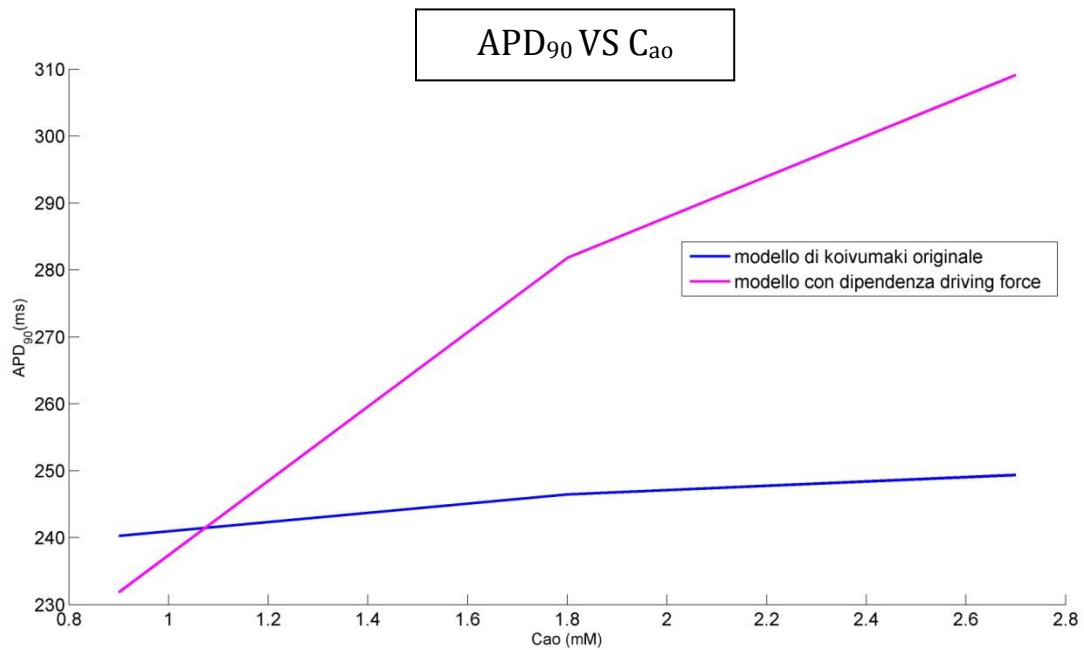


Figura 21: Relazione tra APD e $[Ca^{2+}]_o$ nel modello koivumaki originale (in blu) e quello con driving force modificata (viola)

Il nuovo punto di partenza, quindi, presenta una dipendenza diretta molto più forte tra APD e $[Ca^{2+}]_o$, e sarà quindi necessario aumentare notevolmente l'inattivazione Ca^{2+} -dipendente per riuscire a contrastare a sufficienza l'effetto della nuova driving force. Tuttavia, se si osservano le correnti I_{CaL} , si vede anche un risultato positivo (Figura 22): nel modello originale, infatti, la corrente mostra una variazione pressochè nulla al variare del $[Ca^{2+}]_o$, mentre nel modello con Driving Force modificata l'effetto delle variazioni di $[Ca^{2+}]_o$ è molto evidente, soprattutto in termini di corrente di picco: il modello modificato, dunque, risulta più realistico. Ad ogni modo è bene sottolineare che è stato modificato ed implementato anche il modello originale di Koivumaki lasciando invariata la driving force, e agendo principalmente su altri parametri: i risultati si trovano in APPENDICE B.

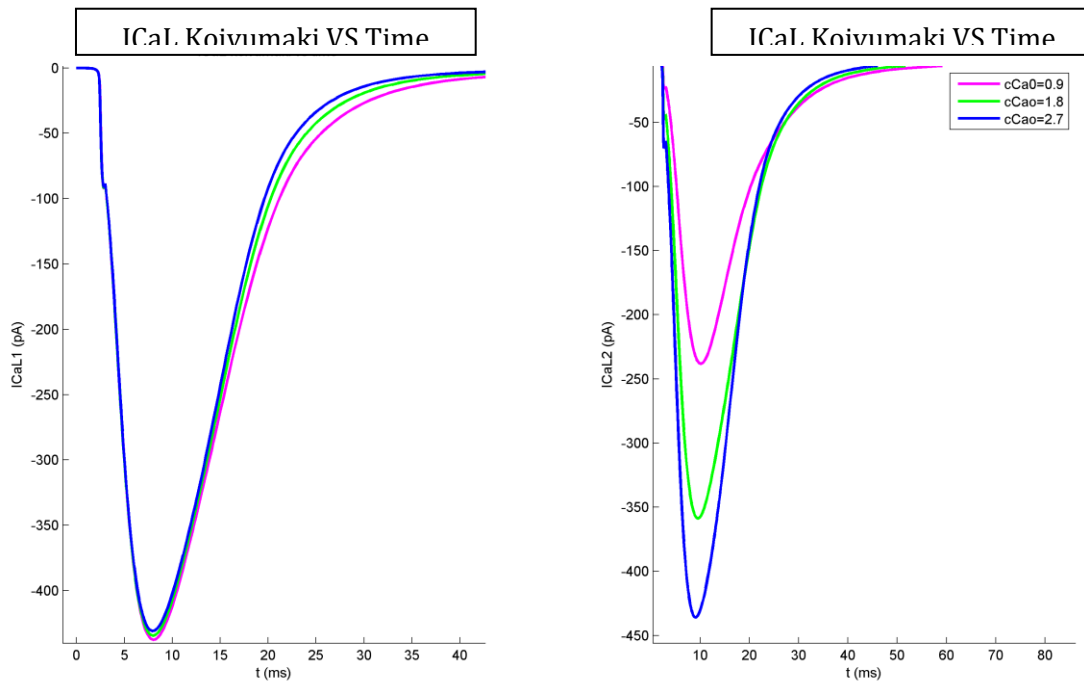


Figura 22: I_{CaL} a confronto: modello koivumaki originale (sinistra) modello con Driving Force modificata (destra)

5.2.2 INATTIVAZIONE $[Ca^{2+}]_O$ -DIPENDENTE

Il passo successivo è stato quindi quello di analizzare nel dettaglio la componente di inattivazione Ca^{2+} -dipendente della I_{CaL} , per capire come potesse essere resa più efficace. Per comodità indichiamo da questo momento in poi il modello modificato con la Driving Force :modello GHK.

Riprendiamo allora la formulazione della I_{CaL} :

$$I_{CaL} = 4 * p_{ca} * d * fca * f1 * f2 * \frac{VF^2}{RT} \left[\frac{\alpha [Cass] e^{\frac{2VF}{RT}} - \beta [CaO]}{e^{\frac{2VF}{RT}} - 1} \right]$$

Si noti che la conduttanza g_{CaL} è stata sostituita dalla permabilità p_{Ca} , che rappresenta sempre la tendenza della membrana ad essere attraversata da ioni Ca^{2+} , ma è espressa in una diversa unità di misura, per coerenza con la nuova formulazione di Driving Force. Nella formulazione di Koivumaki, in particolare, l'inattivazione Ca^{2+} -dipendente è rappresentata dalla variabile di stato fca , governata dalla seguente equazione differenziale:

$$\frac{dfca}{dt} = \frac{f_{ca,inf} - fca}{\tau_{ca}}$$

dove $f_{ca,inf}$ rappresenta il valore di stato stazionario per la variabile, e τ_{Ca} la sua costante di tempo. La $f_{ca,inf}$ è chiaramente dipendente dalla concentrazione di calcio intracellulare, o meglio $[Ca]_{ss}$ che rappresenta la concentrazione nel compartimento giunzionale, dove sono concentrati i canali ionici di tipo L-type. Nel modello di Koivumaki et al., la $f_{ca,inf}$ è data dalla seguente formula, e il suo andamento al variare del $[Ca^{2+}]_{ss}$ è mostrato in Figura 23:

$$f_{ca,inf} = 1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{0.001}{Ca_{ss}^{2+}} \right)^2}$$

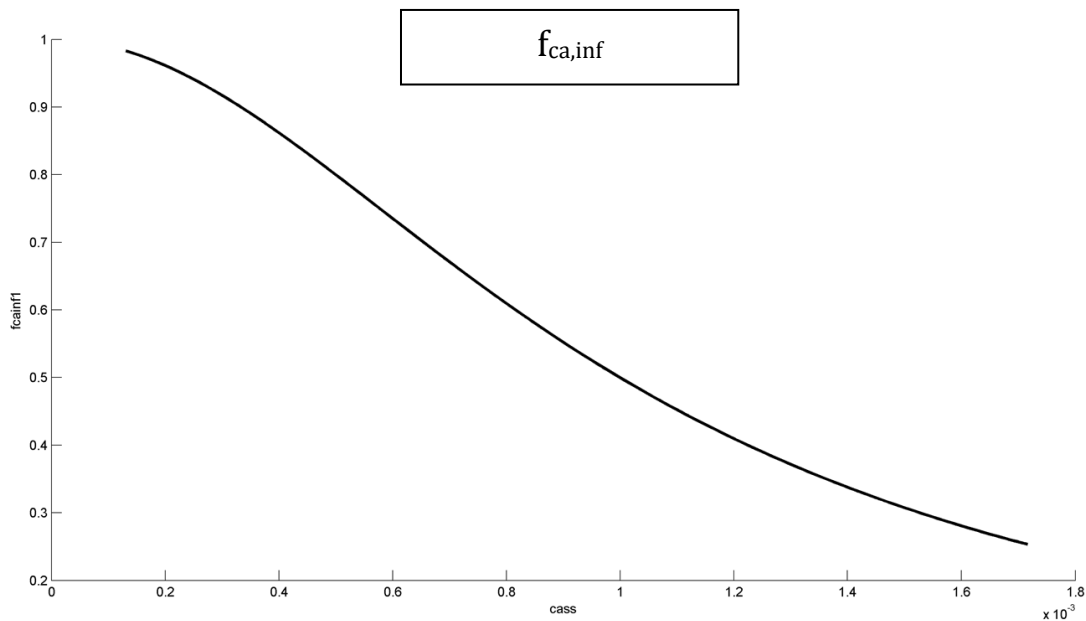


Figura 23: Stato stazionario della variabile relativa all'inattivazione calcio dipendente della corrente I_{CaL}

In generale, le curve di inattivazione hanno una forma sinusoidale, con valori compresi tra 0 ad 1: in particolare assumono valore 1 quando non c'è inattivazione, e valore 0 quando la corrente è del tutto inattivata. La curva mostrata in Figura 23, come possiamo vedere non arriva completamente a 0, bensì si ferma circa a 0.2, quindi la corrente I_{CaL} non sarà mai completamente inattivata da questo meccanismo.

In particolare, si consideri che sotto potenziale d'azione il $[Ca^{2+}]_{ss}$ varia tra 500nM e 1200nM: in tale range, la $f_{ca,inf}$ passa da circa 0.4 a circa 0.8, quindi non viene sfruttata al meglio tutta l'inattivazione. Inoltre, in tale range la sigmoide ha una pendenza relativamente bassa, quindi risulta poco sensibile a eventuali variazioni di Ca^{2+} .

Le modifiche alla formulazione di f_{ca} si sono sviluppate seguendo dunque due obiettivi: da un lato, cercare di aumentare la sensibilità di $f_{ca,inf}$ nel range di calcio considerato, quindi rendere la curva "più ripida" nell'intervallo corrispondente al transiente di Ca^{2+} , e dall'altro aumentare il livello di inattivazione, quindi portare la curva più vicina a zero per valori di Ca^{2+} molto elevati. La formulazione è stata modificata agendo sui parametri della corrispondente sigmoide, ovvero l'esponente, che incide sulla pendenza, e il valore di potenziale di shift, che permette di traslare la curva rispetto al Ca^{2+} .

Sono stati studiati diversi valori per entrambi i parametri, tenendo sempre in considerazione gli obiettivi proposti. In Figura 24 sono riportate alcune delle prove effettuate, ponendo a confronto la formulazione modificata con quella originale (in viola).

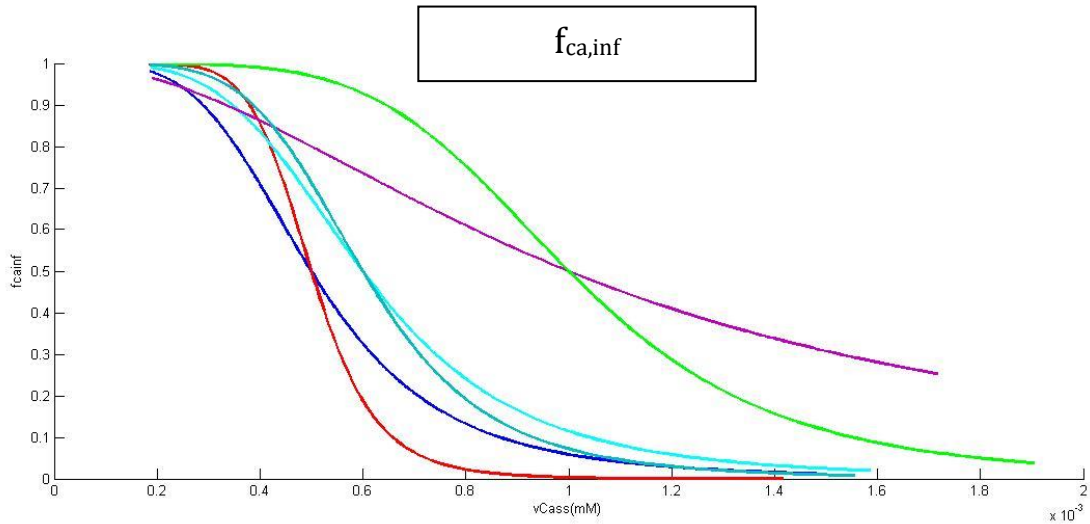


Figura 24: Modifica di $f_{ca,inf}$ al variare di shift e pendenza

Per ogni valore di shift ed esponente considerato sono stati valutati forma e durata del potenziale d'azione ed in particolare la dipendenza dal calcio extracellulare. La formulazione che si è rivelata più adatta agli obiettivi proposti, è stata quella che ha previsto un'elevata ripidità della curva (esponente 5), e un leggero shift verso sinistra rispetto all'originale, ovvero:

$$f_{ca,inf} = 1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{0.0006}{Ca_{ss}^{2+}}\right)^5}$$

Ponendo a confronto le due curve possiamo vedere come la funzione modificata si comporti decisamente meglio nel range di interesse:

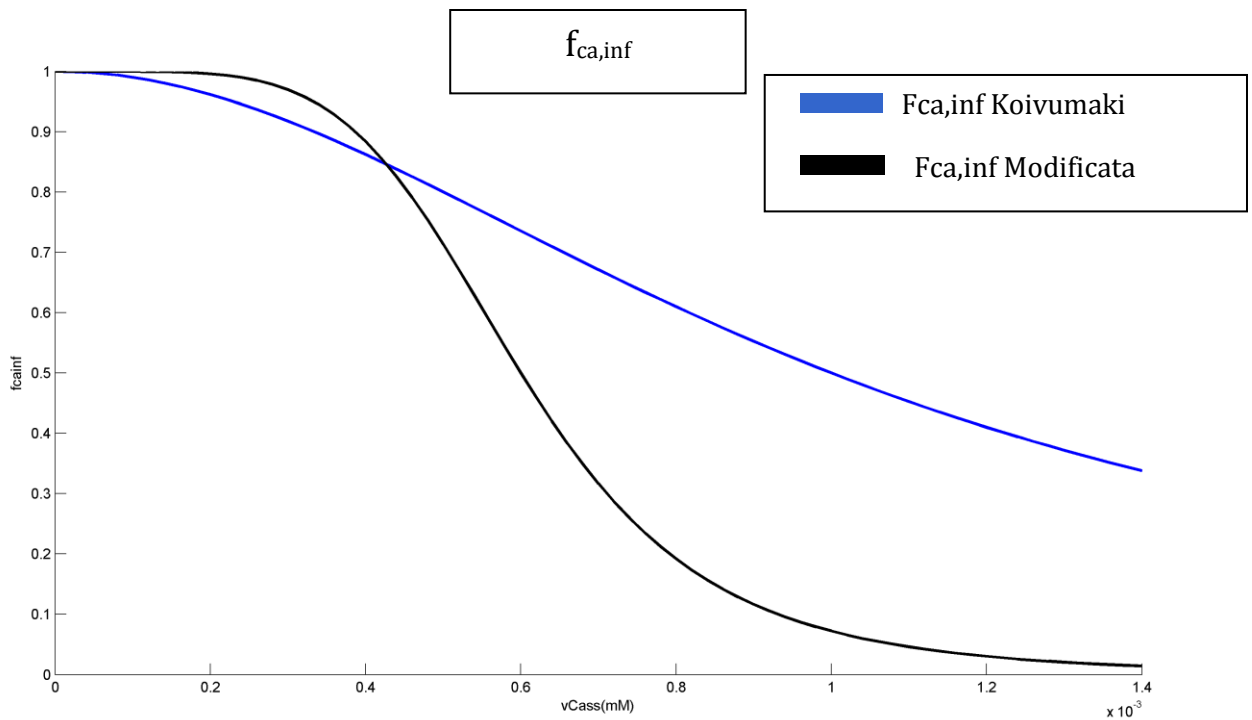


Figura 25: Confronto della $f_{ca,inf}$: in blu la formulazione originale, in nero la formulazione modificata

I risultati ottenuti sostituendo la nuova formulazione nel modello di cardiomiocita atriale, sono riportati in Figura 26 ed in Figura 27.

In generale la dipendenza dell'APD dal calcio si è modificata nella direzione giusta: come si può notare in Figura 27 la pendenza della curva è notevolmente diminuita. Infatti, all'aumentare del $[Ca^{2+}]$ il potenziale tende a ripolarizzare più velocemente (Figura 26), tuttavia ciò non è sufficiente a riprodurre la dipendenza inversa desiderata. Inoltre, l'incremento dell'inattivazione produce una significativa diminuzione di I_{CaL} che comporta un generale abbassamento della durata del potenziale d'azione.

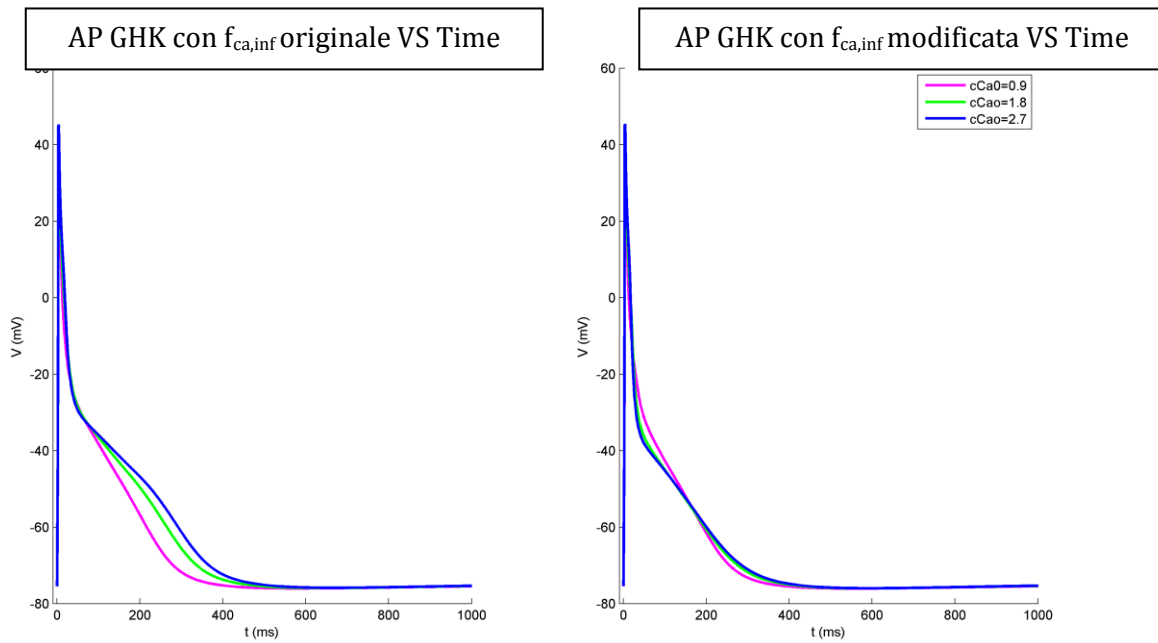


Figura 26: Confronto AP con modifica $f_{ca,inf}$: modello ghk (sinistra) e modello GHK con la $f_{ca,inf}$ modificata (destra)

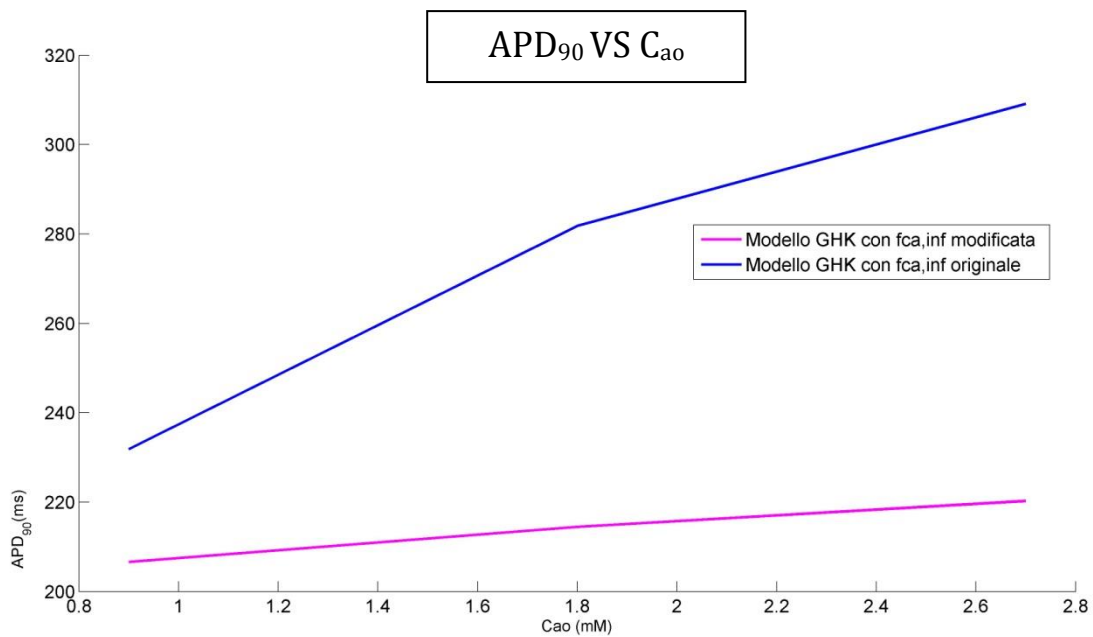


Figura 27: Confronto APD vs $[Ca^{2+}]_o$: la curva in blu rappresenta il modello GHK con la $f_{ca,inf}$ originale, in rosa il modello GHK con la funzione modificata

5.2.3 LA CORRENTE DI BACKGROUND

Durante l'analisi fatta precedentemente sui diversi fattori che influenzano la dipendenza della durata del potenziale dal calcio, era emerso il ruolo della corrente di background che, data la sua dipendenza diretta dalla Driving Force, ha un effetto importante sull'aumento del potenziale d'azione al variare del $[Ca^{2+}]$. Quest'ultima corrente, come tutte le correnti di background, è priva di fondamenti sperimentali, e spesso viene utilizzata per bilanciare il comportamento generale della cellula: non esiste quindi la certezza della sua esistenza da un punto di vista fisiologico, anzi molti elettrofisiologi sono scettici in merito; alcuni modelli la utilizzano, in altri è assente, in altri è presente in percentuali minori. Nel modello atriale di Koivumaki la corrente di background ha la seguente espressione:

$$I_{Cab} = g_{Cab} * (V_m - E_{Ca})$$

Dove:

$g_{Cab} = 0.0952$ nS è la conduttanza

V_m = è il potenziale di membrana

E_{Ca} = è il potenziale di equilibrio per il Ca^{2+} , espresso dall'equazione di Nernst

In virtù del fatto che la sua esistenza ad oggi è ancora incerta da un punto di vista fisiologico e dato il fatto che questa agisce in modo decisamente negativo sulla dipendenza APD- $[Ca]_o$, il suo valore è stato ridotto di circa il 20% (Figura 28).

$$I_{Cab} = 0.8 * [g_{Cab} * (V_m - E_{Ca})]$$

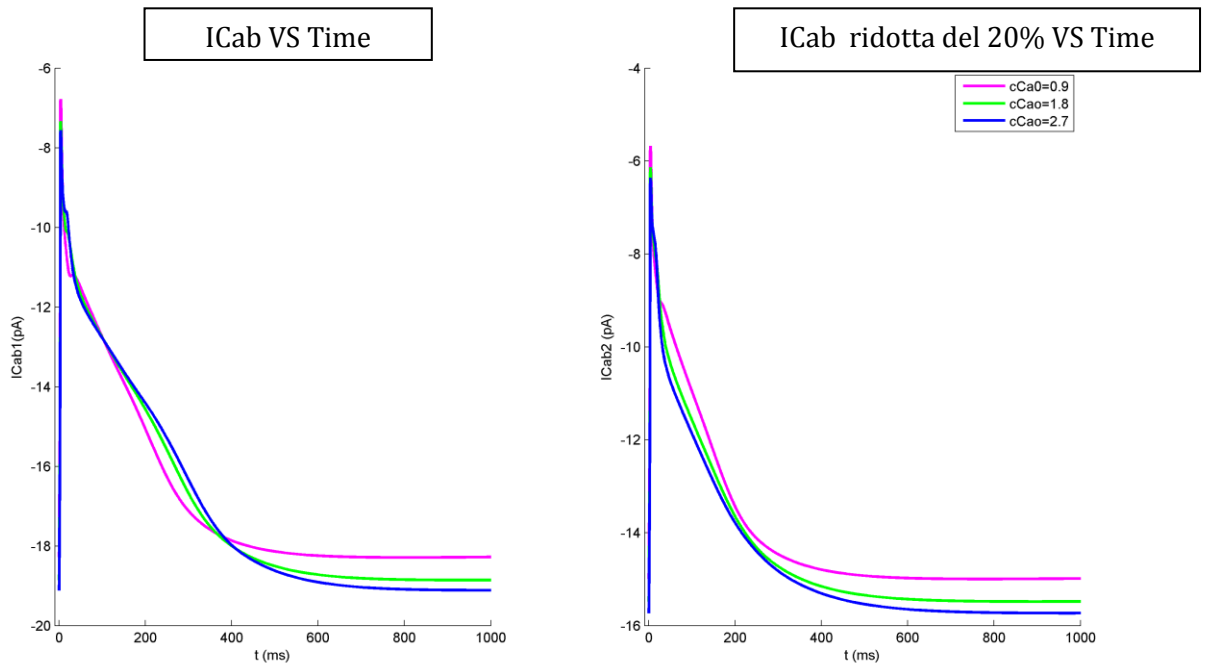


Figura 28: La corrente di background: a sinistra la corrente originale, a destra la corrente ridotta del 20%

Unendo questa modifica alle altre due precedenti, ovvero Driving Force e $f_{Ca,inf}$ siamo riusciti a riprodurre la dipendenza desiderata tra APD e $[Ca^{2+}]_o$ (Figure 29 e 30).

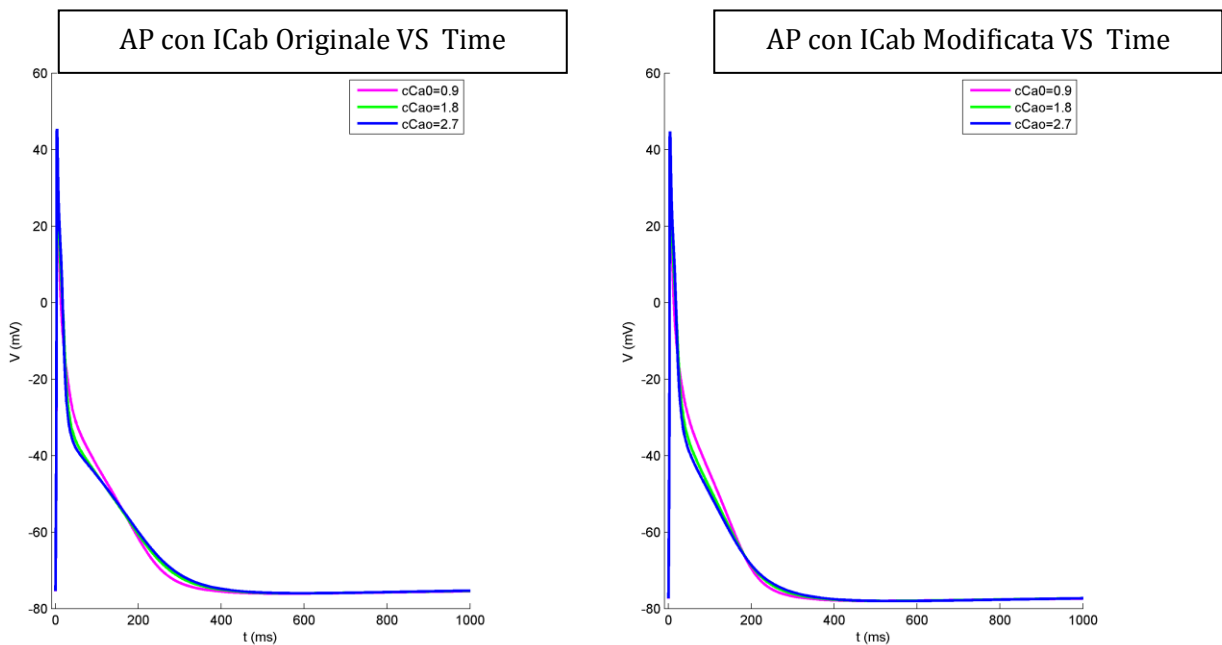


Figura 29: Confronto AP: a sinistra il potenziale di azione calcolato nel modello GHK utilizzando la corrente di background originale e la corrente I_{CaL} modificata a destra il potenziale calcolato nel modello ghk con la corrente di background diminuita del 20% e la corrente I_{CaL} modificata.

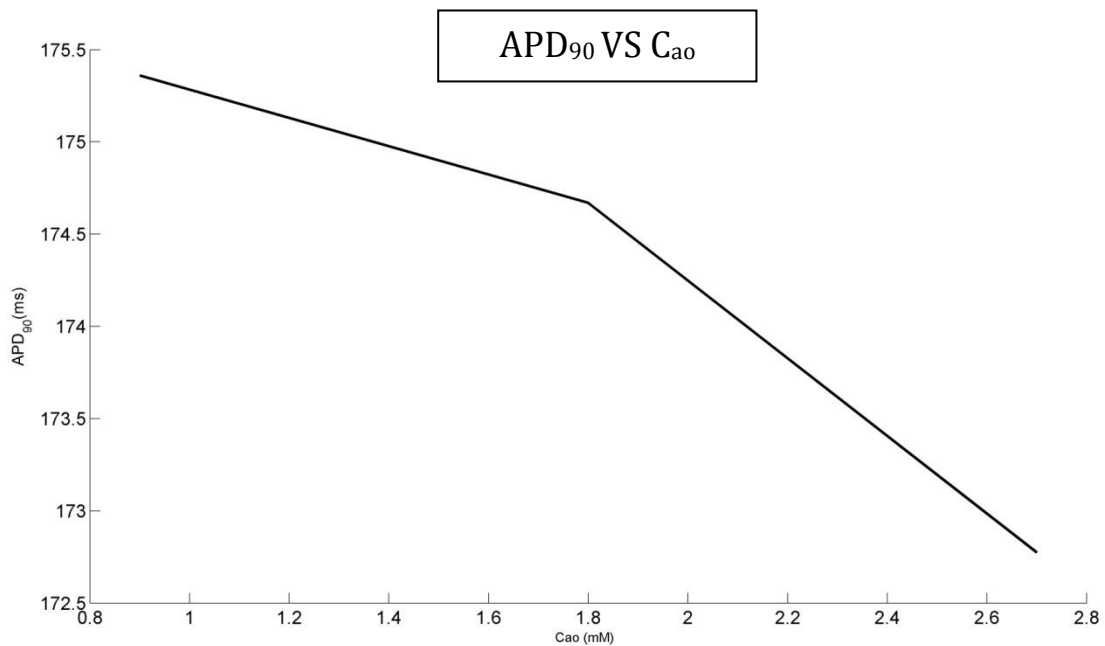


Figura 30: Dipendenza APD vs $[Ca^{2+}]_o$ con le modifiche di I_{Cab} e I_{CaL}

5.2.4 LA PERMEABILITÀ

Le modifiche applicate al modello Koivumaki fino a questo momento sono riuscite a migliorarne il comportamento rispetto alle variazioni di Ca^{2+} ; tuttavia, entrambe le modifiche hanno contribuito ad una generale diminuzione del potenziale d'azione, che si è quindi portato ben al di sotto dei valori sperimentali (compresi tra 200 e 250ms) in condizioni di controllo ($[Ca^{2+}]_o=1.8mM$). Il nuovo valore risulta infatti circa 174 ms.

Infatti, la I_{CaL} del modello così modificato risulta notevolmente ridotta rispetto a quella originale, e dal momento che è proprio questa corrente a contribuire in modo sostanziale alla durata del potenziale, è inevitabile che questo ne risenta. Per questo motivo, il passo successivo è stato quello di intervenire su altri parametri della formulazione della I_{CaL} , per cercare di allungare il potenziale d'azione: primo fra tutti la permeabilità

Il valore della permeabilità usato nell'equazione della corrente ionica è stato preso dal modello di Grandi et al., (Grandi, 2011) fissato ad un valore di $p_{ca} = 2.7 \cdot 10^{-4}$ (cm/s), e si è visto che aumentando questo valore era possibile riportare la durata del potenziale d'azione al valore di controllo del modello Koivumaki originale. In particolare, sono stati considerati gli effetti di un coefficiente moltiplicativo compreso tra 1 e 10, tenendo sotto controllo non solo la durata del potenziale d'azione ma anche l'effetto di queste variazioni sulla curva $APD-[Ca]_o$.

Come si vede in Figura 31, le variazioni di permeabilità giocano un ruolo importante sulla pendenza di questa curva: aumentare la permeabilità, infatti, contribuisce a migliorare significativamente la dipendenza inversa della durata del potenziale d'azione dal calcio extracellulare.

Si noti che i valori delle durate sono stati tutti normalizzati rispetto al valore di controllo, per rendere possibile il confronto delle sole pendenze indipendentemente dai valori assoluti. In generale, all'aumentare della permeabilità, corrisponde un aumento della durata.

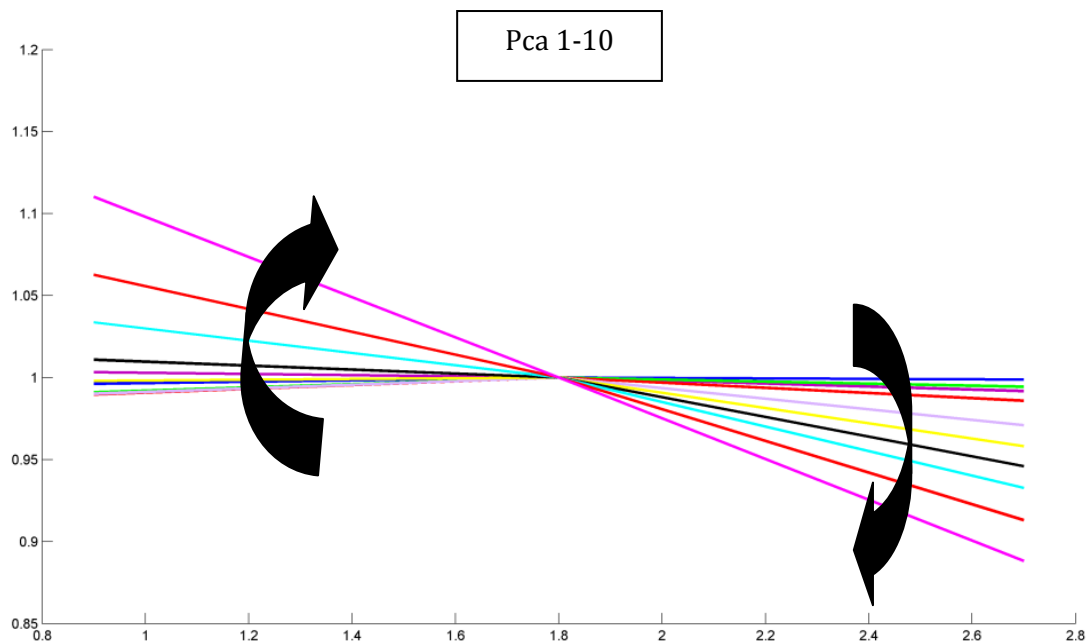


Figura 31: Analisi di sensibilita': confronto APD a diversi valori di permeabilità normalizzati al valore di 1.8 mM

Il risultato migliore, cioè che ha permesso di riprodurre una pendenza in linea con i dati sperimentali senza alterare in modo significativo il comportamento cellulare e la durata del potenziale in condizioni di controllo, è stato quello ottenuto aumentando la permeabilità di 9 volte rispetto al valore originale: da una durata di potenziale di 174.6 ms con $[Ca]_o=1.8$ mM siamo adesso tornati ad un valore di circa 245 ms, mantenendo una variazione superiore e 40 ms al variare della concentrazione di $[Ca]_o$ tra 0.9 e 2.7 mM.

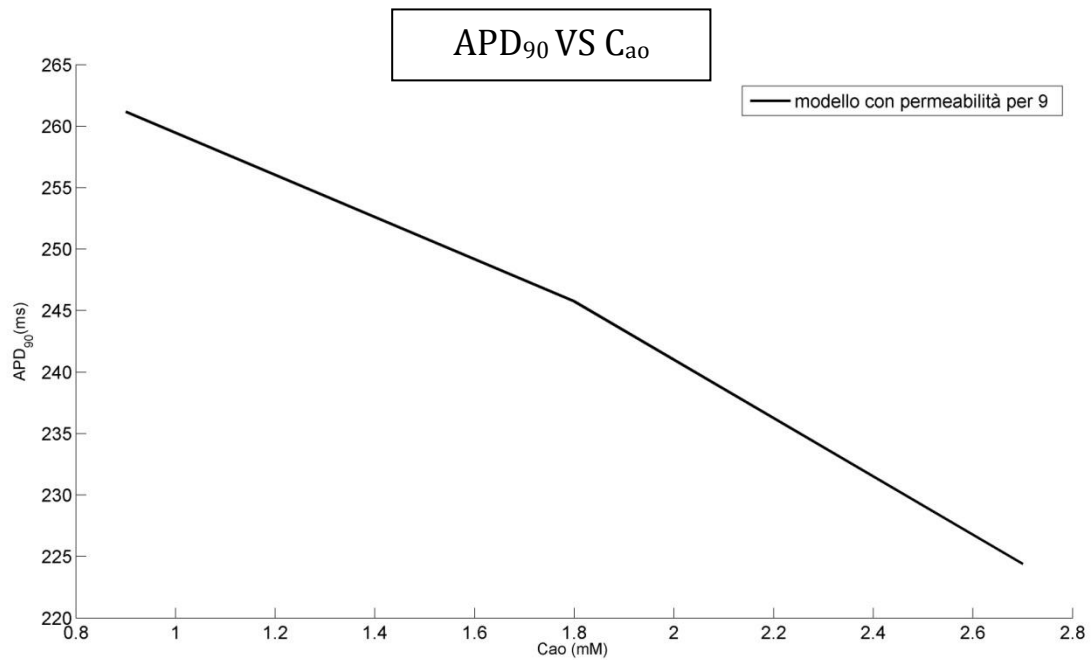


Figura 32: APD con permeabilità' aumentata di 9 volte

Il notevole aumento di permeabilità, tuttavia, ha aumentato significativamente il valore di picco della corrente di Ca^{2+} , che si è allontanato dai valori riportati in letteratura e utilizzati per la validazione del modello Koivumaki originale: rispetto ad un valore di circa -450pA , siamo passati infatti ad un valore di circa -800pA , con $[\text{Ca}^{2+}] = 1.8\text{mM}$.

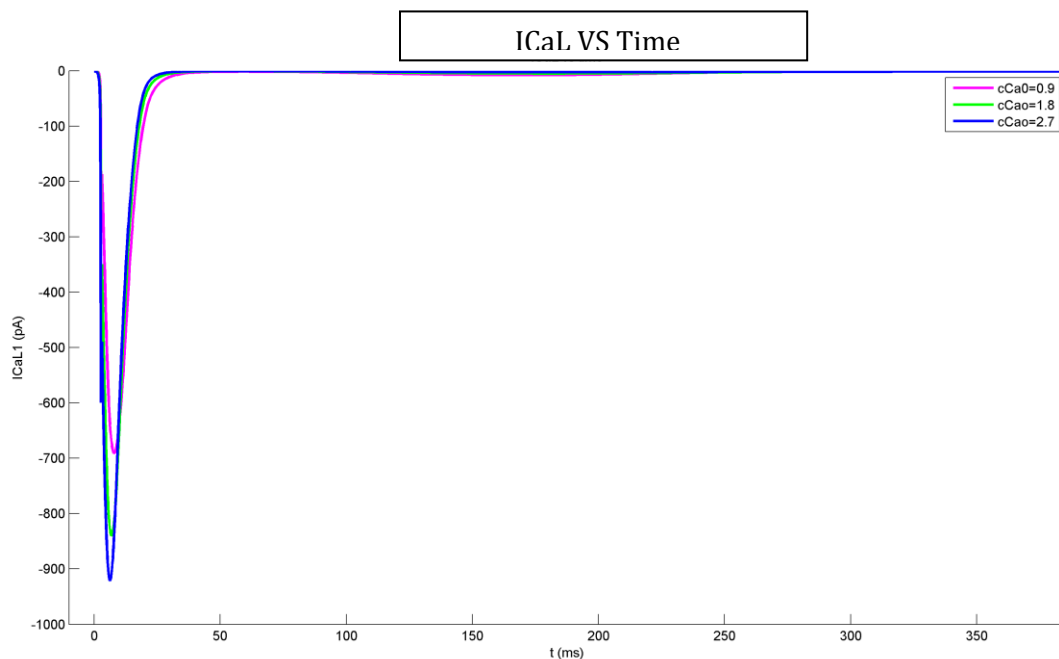


Figura 33: IC_{aL} in seguito alla modifica della permeabilità'

Questa differenza diventa ancora più significativa considerando la curva I-V ottenuta con uno specifico protocollo di V-Clamp, in cui viene fissato il potenziale di membrana ad un valore di riposo costante (-80 mV) e si applicano diversi gradini di potenziale, esplorando tutto il range tra -60 e +60 mV (Figura 34, pannello superiore). Per ogni gradino, viene misurata la corrispondente corrente di picco (Figura 34, pannello inferiore).

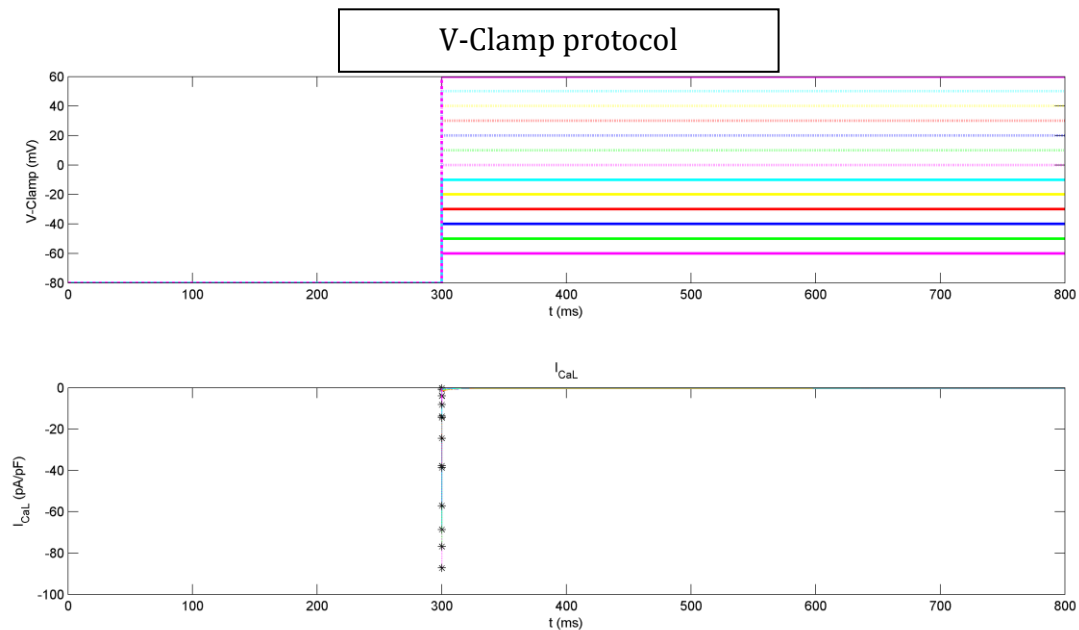


Figura 34: Protocollo in V-Clamp

Graficata in corrispondenza di ogni tensione, il suo valore della corrente di picco, si ottiene quindi la curva I-V della corrente di Ca^{2+} .

Nel modello Koivumaki originale, la curva I-V è stata confrontata con dati sperimentali in letteratura e presenta un picco massimo di -12 pA/pF (Nattel, 1997). In letteratura si trovano anche valori più alti (Le Grand), ed è presente un'elevata variabilità (Tabella 7), ma il modello modificato presenta un picco notevolmente superiore, di circa -90 pA/pF (Figura 35).

Tabella 6: Picchi della corrente ionica I_{CaL} utilizzati nei modelli a confronto

Referenze	Picco I_{CaL}	Incremento nel malato	Temperatura
Li and Nattel (Nattel, 1997)	-11 pA/pF	...	36°C
Mewes and Ravenes(Mewes T)	-1.5 pA/pF	...	21°C-23°C
Ouadid et al (Ouadid, 1995)	-12 pA/pF	-2 pA/pF	22°C
Le Grand et al (Le Grand)	-17 pA/pF	-5 pA/pF	20°C-24°C
Model	-4.5 pA/pF		33°C

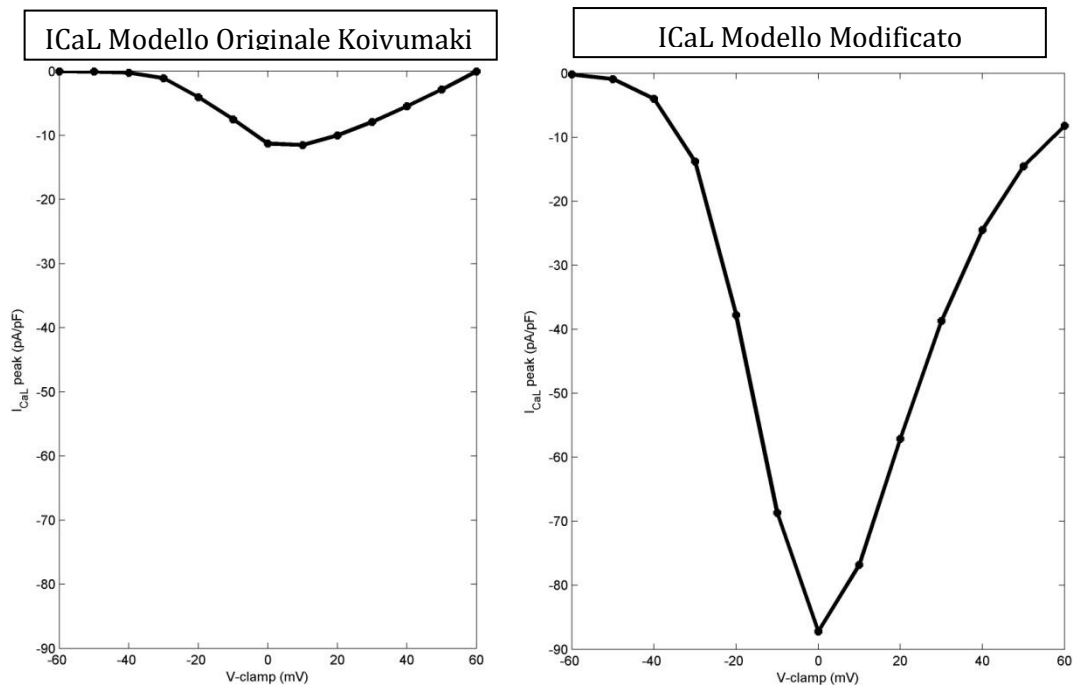


Figura 35: : Curva I-V della I_{CaL} : a sinistra la corrente calcolata del modello di Koivumaki con picco in -12 pA/pF a destra il modello con la modifica sulla permeabilità con picco in -90 pA/pF

5.2.5 LA COSTANTE DI TEMPO DI ATTIVAZIONE

Per cercare di migliorare la curva I-V, è stato necessario cercare un compromesso per aumentare la durata del potenziale d'azione senza tuttavia alzare eccessivamente la permeabilità. In particolare, è il picco di corrente a incidere sulla curva I-V, ed è quindi quello che deve essere mantenuto entro i range sperimentali.

Questo può essere fatto rallentando leggermente l'attivazione della corrente I_{CaL} , un processo molto veloce, con una costante di tempo molto piccola rispetto a quelle di inattivazione (circa 0.002s).

Riprendendo allora la formula della corrente ionica di Ca^{2+} :

$$I_{CaL} = 4 * p_{ca} * d * f_{ca} * f1 * f2 * \frac{VF^2}{RT} \left[\frac{\alpha [Ca_{ss}] e^{\frac{2VF}{RT}} - \beta [Ca_o]}{e^{\frac{2VF}{RT}} - 1} \right]$$

Rallentare l'attivazione dei canali implica lavorare sul parametro τ presente nell'equazione differenziale relativa alla variabile di attivazione (d), ovvero:

$$\frac{dd}{dt} = \frac{d_{inf} - d}{\tau}$$

Con

$$\tau_{originale} = 0.0027 e^{(-\frac{V+35}{30})^2} + 0.002$$

Questa costante di tempo ha una formulazione di tipo esponenziale, con un valore basale di 0.002s. Sono state fatte diverse prove aumentando questa costante di tempo e valutandone gli effetti sul potenziale d'azione, in particolare considerando valori basali compresi tra 2 e 10 ms.

In particolare, oltre a ridurre il picco di corrente, aumentare la costante di tempo aveva un effetto di allungamento sul potenziale d'azione, e anche un miglioramento della curva APD-[Ca^{2+}]_o (Figura 36).

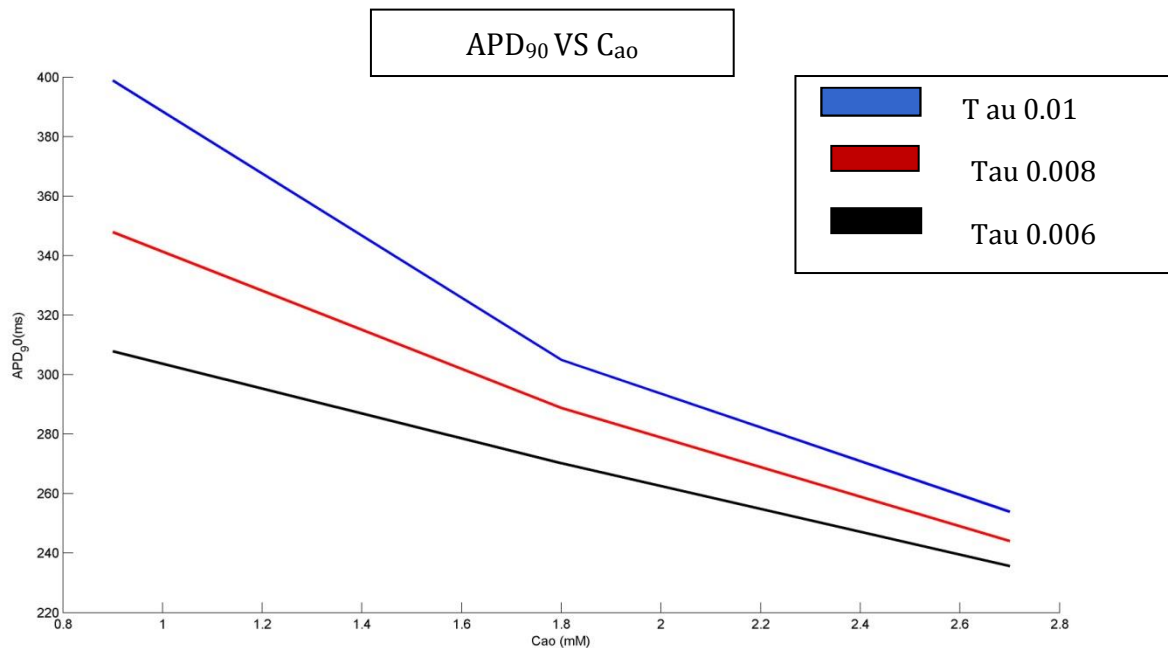


Figura 36: Confronto apd utilizzando diversi valori per il parametro τ : in nero la curva con valore basale 0.006 in ROSSO 0.008 in BLU 0.01

Quest'ultimo risultato si è rivelato fondamentale in quanto ci ha permesso di ridurre la permeabilità, la quale risultava essere la causa principale del picco troppo grande della corrente ionica I_{CaL} .

L'obiettivo è stato quindi quello di trovare il giusto compromesso tra il valore di τ (dato che non vi sono studi sperimentali sui valori che questa costante assume nelle cellule reali, lo scopo è stato quello di non allontanarsi troppo dal valore originale) ed un valore di permeabilità p_{Ca} inferiore a quello precedentemente scelto di $9 \cdot 2.710^{-4}$.

Le modifiche sono state fatte tenendo sempre in considerazione il comportamento della cellula in condizioni fisiologiche, così come la curva I-V e la corrente I_{CaL} , e infine (giustamente) la dipendenza tra APD-[Ca]_o.

I valori che sono risultati ottimali a questo proposito sono i seguenti:

$$\tau = 0.0027e^{\left(-\frac{V+35}{30}\right)^2} + 0.01$$

$$p_{Ca} = 3.3 \cdot 2.710^{-4}$$

Come mostrato in Figura 37, la curva I-V ottenuta con questi parametri è notevolmente diminuita rispetto a quella precedente, e anche se il picco è leggermente maggiore di quella del modello Koivumaki originale (-12 pA/pF) è comunque in linea con i risultati sperimentali.

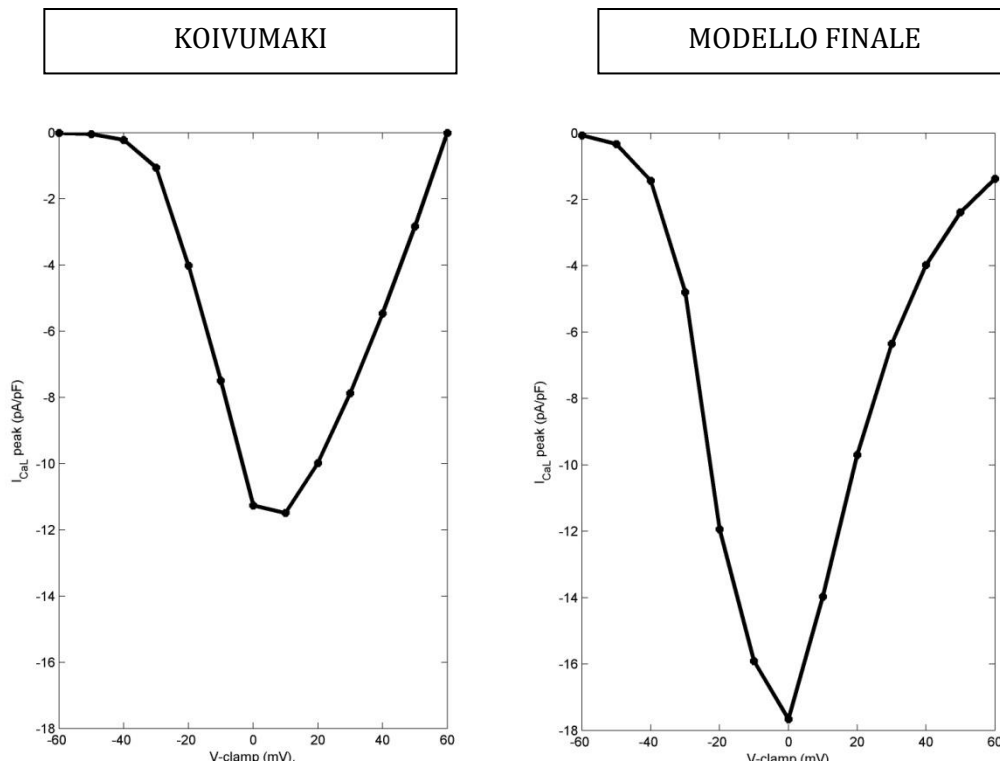


Figura 37: PROTOCOLLO V-CLAMP: confronto I_{Cat} tra il modello originale ed il modello ultimato

Il potenziale d'azione così ottenuto aveva una durata leggermente inferiore a quella prefissata (circa 240 ms) ed è quindi stata leggermente ridotta ($\times 0.8$) la conduttanza della corrente di potassio I_{Kr} , che viene tipicamente modulata nei modelli proprio per adattare la durata del potenziale d'azione.

Il potenziale finale è comunque leggermente più corto di quello del modello originale, ma una durata di 240 ms ci è sembrata più in linea con i risultati presenti in letteratura per il potenziale d'azione atriale umano.

Riepilogando, le modifiche apportate al modello Koivumaki originali e descritte in questo capitolo, sono state sostanzialmente 5:

- ✓ L'inserimento di una Driving Force dipendente dal gradiente di concentrazione di Ca^{2+} intra-extra cellulare, rispetto a quella originale che considerava un potenziale di equilibrio per il Ca^{2+} pari a -60 mV, quindi costante:

$$\frac{VF^2}{RT} \left[\frac{\alpha [C_{ass}] e^{\frac{2VF}{RT}} - \beta [C_{ao}]}{e^{\frac{2VF}{RT}} - 1} \right]$$

- ✓ La modifica del valore di regime dell'variabile di inattivazione Ca^{2+} -dipendente f_{ca} , per produrre un'inattivazione completa e aumentarne la sensibilità nel range di Ca^{2+} di interesse:

$$f_{ca,inf} = 1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{0.0006}{Ca_{ss}^{2+}}\right)^5}$$

- ✓ La riduzione del 20% della corrente di background, la cui esistenza non è provata sperimentalmente:

$$I_{Cab} = 0.8 * [g_{Cab} * (V_m - E_{Ca})]$$

- ✓ Aumento della permeabilità della I_{CaL} :

$$p_{Ca} = 3.3 * 2.7 * 10^{-4}$$

- ✓ Il rallentamento dell'attivazione della I_{CaL} , aumentando la relativa costante di tempo:

$$\tau = 0.0027 e^{\left(-\frac{V+35}{30}\right)^2} + 0.01$$

- ✓ Una riduzione del 20% della conduttanza massima della corrente I_{Kr} per ottenere la durata del potenziale d'azione desiderata.

Confrontando il modello Koivumaki originale ed il modello opportunamente modificato possiamo dunque concludere che:

1. Il potenziale di azione si accorcia all'aumentare della concentrazione del calcio, senza tuttavia che la morfologia ne risulti alterata (Figure 38-39):

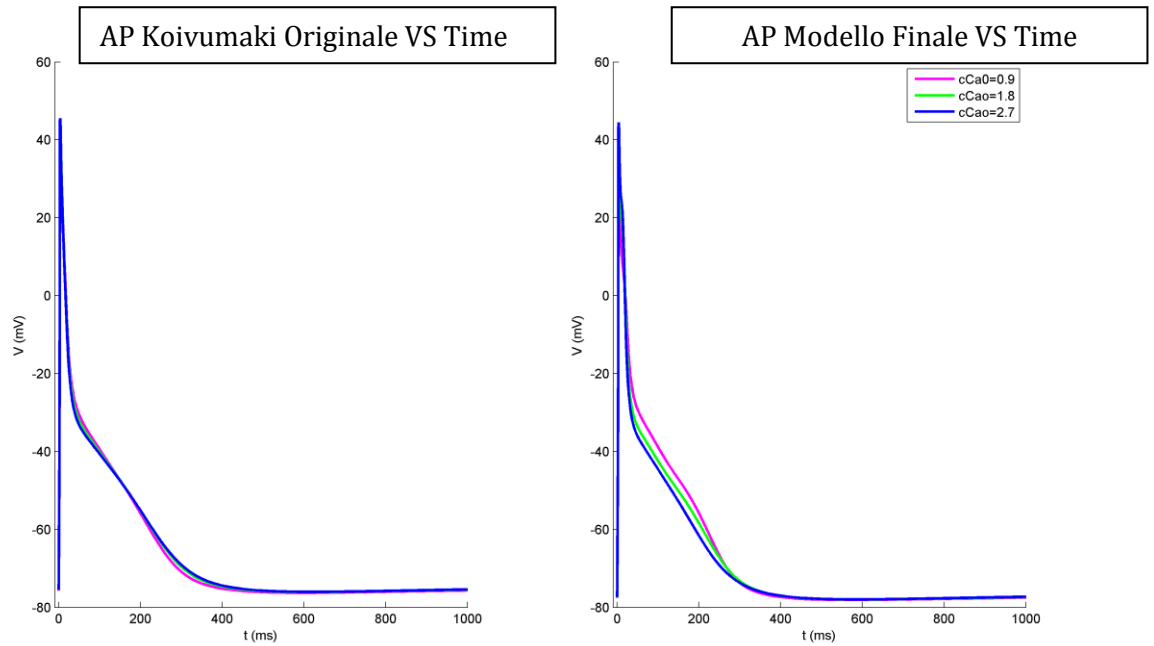


Figura 38: Il potenziale di azione: a sinistra il modello originale di koivumaki, a destra il modello modificato

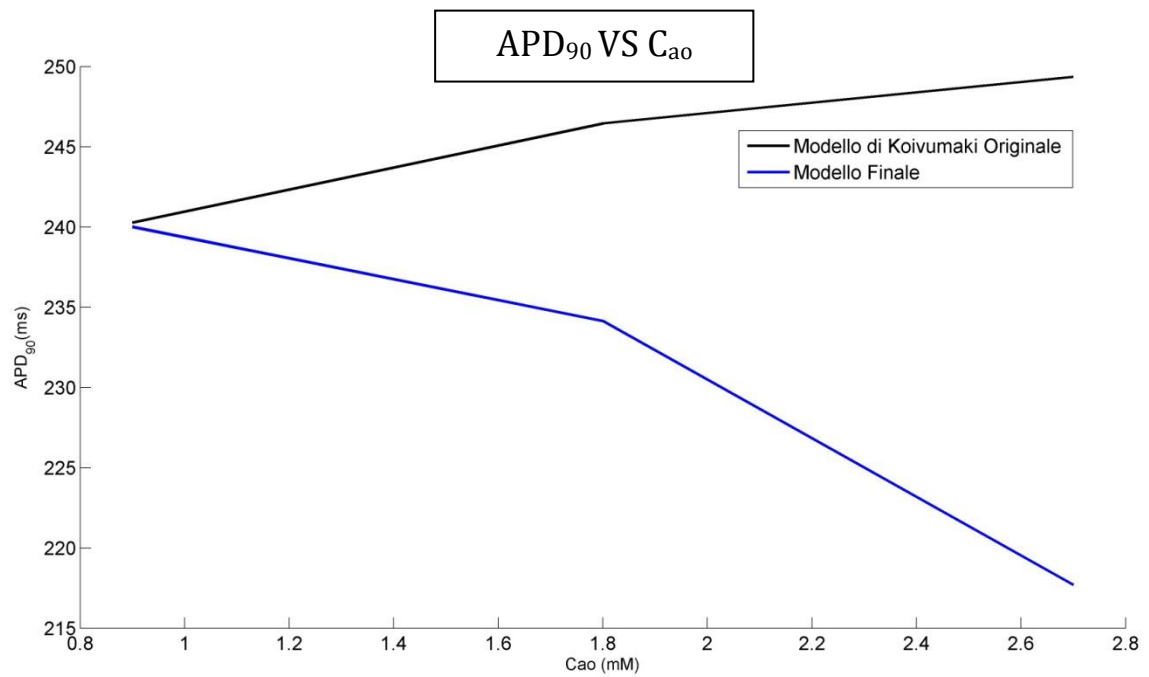


Figura 39: Durata del potenziale d'azione al variare della concentrazione di calcio extracellulare per il modello originale (nero) e quello modificato (blu)

2. La durata del potenziale di azione rispetto all'aumentare del calcio riproduce la dipendenza inversa osservata sperimentalmente.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi si è posto come obiettivo la modifica di un modello matematico di potenziale d'azione atriale umano, per riprodurre un fenomeno che non era stato preso in considerazione nel modello originale, ovvero la dipendenza inversa che lega la durata del potenziale d'azione alle variazioni di calcio extracellulare.

Questo fenomeno è particolarmente importante dal momento che eventuali allungamenti o accorciamenti del potenziale d'azione comportano un aumentato rischio di aritmie, a volte letali.

Il meccanismo ipotizzato essere alla base di questa relazione è la corrente di calcio L-type, e in particolare la sua inattivazione Ca^{2+} -dipendente, che comporta una riduzione della corrente stessa all'aumentare del calcio, contrariamente a quando accadrebbe considerando solo il gradiente elettrico, direttamente dipendente da quello di concentrazione.

Questa inattivazione è stata quindi oggetto di modifiche, volte ad aumentarne l'effetto.

Sono state effettuate altre modifiche di minore importanza, per mantenere il modello modificato coerente con l'originale in condizioni di controllo, ovvero quando il calcio extracellulare viene fissato pari al valore standard di 1.8-2 mM. Il modello modificato si è quindi rivelato in grado di riprodurre in modo corretto l'effetto delle variazioni di calcio sul potenziale d'azione, senza che venisse alterata la fisiologia cellulare complessiva.

Tale modello, potrà quindi essere utilizzato in futuro per simulare contesti clinici in cui i valori di calcio nel sangue si modificano, prima fra tutte la terapia dialitica, e fare quindi predizioni sugli eventuali effetti aritmogenici per il paziente.

APPENDICE A: CODICE MATLAB

A) MODELLO DI KOIVUMAKI ORIGINALE E MODIFICATO

Le modifiche apportate alla formulazione originale sono riportate in rosso

```
function dy = modK(t,y,flag)
```

```
global cCao
```

```
Human atrial myocyte model
```

```
%%Globals
```

```
global stim INa ICaL It Isus IKr IKs IK1 INab ICab ICaP INaK INaCa If Jrelss...
```

```
%%Stimulus
```

```
stim_amplitude = -960; % pA
```

```
stim_duration = 3e-3; % second (in membrane)
```

```
stim_offset = 0; % second (in membrane)
```

```
% stim_period = 1.0; % second (in membrane)
```

```
if ((t >= stim_offset) && (t <= stim_offset+stim_duration))
```

```
    Istim = stim_amplitude;
```

```
else
```

```
    Istim = 0.0;
```

```
end;
```

```
%%Definition of differential variables:
```

```
i_V = 1;
```

```
i_lastend = i_V;
```

```
% INa
```

```
i_start = 2;
```

```
i_INam = 2 ;
```

```
i_INah1 = 3;
```

```
i_INah2 = 4;
```

```
i_lastend = i_INah2;
```

```
% ICaL
```

```
i_start = 5;
```

```
i_ICaLd = 5;
```

```
i_ICaLf1 = 6;
```

```
i_ICaLf2 = 7;
```

```
i_ICaLfca = 8;
```

```
i_lastend = i_ICaLfca;
```

```
% It
```

```
i_start = 9;
```

```
i_Itr = 9;
```

```
i_Its = 10;
```

```
i_lastend = i_Its;
```

```
% Isus (Ikur)
```

```
i_start = 11;
```

```
i_Isusr = 11;
```

```
i_Isuss = 12;
```

```
i_lastend = i_Isuss;
```

```
% IKs
```

```
i_start = 13;
```

```
i_IKsn = 13;
```

```
i_lastend = i_IKsn;
```

```
% IKr
```

```
i_start = 14;
```

```
i_IKrpa = 14;
```

```
i_lastend = i_IKrpa;
```

```
% If
```

```
i_start = 15;
```

```

i_Ify = 15;
i_lastend = i_Ify;

% RyR
i_start = 16;
i_RyRoss = 16;
i_RyRcss = 17;
i_RyRass = 18;
i_RyRo1 = 19;
i_RyRc1 = 20;
i_RyRa1 = 21;
i_RyRo2 = 22;
i_RyRc2 = 23;
i_RyRa2 = 24;
i_RyRo3 = 25;
i_RyRc3 = 26;
i_RyRa3 = 27;
i_lastend = i_RyRa3;

% SERCA
i_start = 28;
i_SERCACa1 = 28; % first compartment from center
i_SERCACa2 = 29; % 2nd compartment from center
i_SERCACa3 = 30; % 3rd compartment from center
i_SERCACass = 31; % ss-SERCA
i_lastend = i_SERCACass;

% Nai ja Ki
i_start = 32;
i_Nass = 32;
i_Nai = 33;
i_Ki = 34;
i_lastend = i_Ki;

```

```

% Cai and CaSR
i_start = 35;
i_Cass = 35;
i_Cacenter = 36;
i_lastend = i_Cacenter;

%% Numerical parameters
Physical & environmental constants:
F = 96487;
R = 8314;
T = 306.15;

% Concentration:
cNao = 130;
cCao = 1.8;
cKo = 5.4;

Ki = y(i_Ki);
Nass = y(i_Nass);
Cass = y(i_Cass);
Cm = 0.05; nF

% Geometry:
Vss = 4.99232e-5;
rjunct = 6.5; % mum
lcell = 122.051; % mum

% Ca diffusion grid:
dx = 1.625; % mum
rstart = 0 + 0.5*dx;
j = round(rstart/dx):1:round(rjunct/dx);
j = j';

```

```

Aj_nj = pi*rjunct*2*lcell*0.5;
xj_nj = 0.02/2 + dx/2;
xj_nj_Nai = 0.02/2 + 2*dx;

%%Diffusion compartment volumes
Vnonjunct = (pi.*(j.*dx).^2.*lcell-pi.*((j-1).*dx).^2.*lcell).*1e-6.*0.5;
Vcytosol = sum(Vnonjunct) + Vss;
VSR = 0.05.*Vnonjunct./2*0.9;
Vnonjunct_Nai = sum(Vnonjunct);

% Non-junct Cai data & CaSR data
Cai = y(i_Cacenter:length(j)+i_Cacenter-1);
CaSR = y(length(j)+i_Cacenter:length(j)*2+i_Cacenter-1);

%%Cytosol Ca Buffers
BCa = 24e-3;
SLlow = 165;
SLhigh = 13;
KdBCa = 2.38e-3;
KdSLlow = 1.1;
KdSLhigh = 13e-3;

%%SR Ca buffers
CSQN = 6.7;
KdCSQN = 0.8;

% Sarcolemmal Na buffering
BNa = 0.49 * 2.31;
KdBNa = 10;

%%Ion channel conductances & permeabilities & other parameters
PNa = 0.0018;
ECa_app = 60;
gCaL = 25.3125; nS

```



```

k1 = 1000^2 * k4;
k2 = k1 * SERCAKmf^2;
cpumps = 40e-3; % pump concentration in cytosol volume
% SR Ca leak
kSRleak = 6e-3;

%% Analytical equations
% Reversal potentials:
ENa = R*T/F * log ( cNaO / Nass );
EK = R*T/F * log ( cKO / Ki );
ECa = R*T/F/2 * log ( cCao / Cass );

% Valori di interesse:
ECa_app = 60;
gCaL = 25.3125;

% ICaL
ICaLfcainf = 1-1 ./ ( 1 + (kCa./y(i_Cass)).^(kCan));
ICaL = gCaL *y(i_ICaLd) .* y(i_ICaLfca)*y(i_ICaLf1)* y(i_ICaLf2) .*(y(i_V) - ECa_app);
ICaLdinf = 1/(1+exp((y(i_V)+9)/-5.8));
ICaLf1inf = 1/(1+exp((y(i_V)+27.4)/7.1));
ICaLdtau = 0.0027*exp( -((y(i_V)+35)/30).^2 ) + 0.002;
ICaLf1tau = 0.98698.*exp( -((y(i_V)+30.16047)/7.09396).^2 ) +...
0.04275./(1+exp((y(i_V)-51.61555)/-80.61331)) +...
0.03576./(1+exp((y(i_V)+29.57272)/13.21758)) - 0.00821;
ICaLf2tau = 1.3323*exp( -((y(i_V)+40)/14.2).^2 ) + 0.0626;
ICaLfcatau = 2e-3;

```

Modifica del modello con equazione GHK

```

ISO=0;
AF=0;
pCa = 3.5*[(1+0.5*ISO)*(1-0.5*AF)*2.7e-4];
% Cmem = 1.1e-10;

```

```
DF=pCa*4*(y(i_V)*F*F/(R*T))*(1*y(i_Cass)*exp(2*y(i_V)*F/(R*T))-0.341*cCao)
/(exp(2*y(i_V)*F/(R*T))-1);
```

```
DDF= -DF+y(i_V);
```

```
% ICaL
```

```
ICaLfcainf = 1-1 ./ ( 1 + (kCa./y(i_Cass)).^(kCan));
```

```
ICaL = y(i_ICaLd) .* y(i_ICaLfca)*y(i_ICaLf1)* y(i_ICaLf2) .*(DF)*50; I
```

```
ICaLdinf = 1/(1+exp((y(i_V)+9)/-5.8));
```

```
ICaLfinf = 1/(1+exp((y(i_V)+27.4)/7.1));
```

```
ICaLdtau = 0.0027*exp( -(y(i_V)+35)/30).^2 ) + 0.01;
```

```
ICaLf1tau = 0.98698.*exp( -(y(i_V)+30.16047)/7.09396).^2 ) +...
```

```
0.04275./(1+exp((y(i_V)-51.61555)/-80.61331)) +...
```

```
0.03576./(1+exp((y(i_V)+29.57272)/13.21758)) - 0.00821;
```

```
ICaLf2tau = 1.3323*exp( -(y(i_V)+40)/14.2).^2 ) + 0.0626;
```

```
ICaLfcatau = 2e-3;
```

```
% INa
```

```
INa = PNa .* y(i_INam).^3 .* ( 0.9.*y(i_INah1) + 0.1.*y(i_INah2) ) * cNaO *...
```

```
y(i_V) * F^2/(R*T) * ( exp( (y(i_V)-ENa)*F/R/T ) - 1) / ( exp(...
```

```
y(i_V)*F/R/T ) - 1);
```

```
INaminf = 1/(1+exp((y(i_V)+27.12)/-8.21));
```

```
INahinf = 1/(1+exp((y(i_V)+63.6)/5.3));
```

```
INamtau = 0.000042*exp( -(y(i_V)+25.57)/28.8).^2 ) + 0.000024;
```

```
INah1tau = 0.03/(1+exp((y(i_V)+35.1)/3.2)) + 0.0003;
```

```
INah2tau = 0.12/(1+exp((y(i_V)+35.1)/3.2)) + 0.003;
```

```
% It
```

```
It = gt * y(i_Itr) * y(i_Its) * (y(i_V) - EK);
```

```
Itrinf = 1/(1+exp((y(i_V)-1)/-11));
```

```
Itsinf = 1/(1+exp((y(i_V)+40.5)/11.5));
```

```
Itrtau = 0.0035*exp( -(y(i_V)+0)/30).^2 ) + 0.0015;
```


$$\% Itstau = 0.4812 * \exp(-((y(i_V)+52.45)/14.97).^2) + 0.01414;$$

$$Itstau = 0.025635 * \exp(-((y(i_V)+52.45)/15.8827).^2) + 0.01414; \% Maleckar et al.$$

$$\% Isus$$

$$Isus = gsus * y(i_Isusr) * y(i_Isuss) * (y(i_V) - EK);$$

$$Isusrinf = 1/(1 + \exp((y(i_V) + 6)/-8.6)); \% Maleckar et al.$$

$$Isussinf = 1/(1 + \exp((y(i_V) + 7.5)/10)); \% Maleckar et al.$$

$$Isusrtau = 0.009/(1 + \exp((y(i_V) + 5)/12)) + 0.0005; \% Maleckar et al.$$

$$Isusstau = 0.59/(1 + \exp((y(i_V) + 60)/10)) + 3.05; \% Maleckar et al.$$

$$\% IKs$$

$$IKs = gKs * y(i_IKsn) * (y(i_V) - EK);$$

$$IKsninf = 1/(1 + \exp((y(i_V)-19.9)/-12.7));$$

$$IKsntau = 0.4 * \exp(-((y(i_V)-20)/20).^2) + 0.7;$$

$$\% IKr$$

$$IKrpi = 1/(1 + \exp((y(i_V)+55)/24));$$

$$IKr = gKr * y(i_IKrpa) * IKrpi * (y(i_V) - EK);$$

$$IKrpainf = 1/(1 + \exp((y(i_V)+15)/-6));$$

$$IKrptau = 0.21718 * \exp(-((y(i_V)+20.1376)/22.1996).^2) + 0.03118;$$

$$\% IK1$$

$$IK1 = gK1 * cKo.^0.4457 * (y(i_V) - EK) / (1 + \exp(1.5 * (y(i_V) - EK + 3.6) * F/R/T));$$

$$\% Background leaks$$

$$INab = gNab * (y(i_V) - ENa);$$

$$ICab = gCab * (y(i_V) - ECa);$$

VALORI MODIFICATI NEL MODELLO GHK:

$$ICab = 0.8 * gCab * (y(i_V) - ECa);$$

$$\% INaK$$

$$INaK = INaKmax * cKo./(cKo + kNaKK) * Nass.^1.5/(Nass.^1.5 + kNaKNa.^1.5) * ...$$

$(y(i_V) + 150) / (y(i_V) + 200);$

% INaCa

fCaNCX = 1;

INaCa = kNaCa * ((exp(gam.*y(i_V)*F/R/T) .* Nass.^3 .* cCao - exp(...
(gam-1).*y(i_V)*F/R/T) .* cNao^3 .* y(i_Cass)*fCaNCX) / (1 + dNaCa*(cNao^3 ...
.* y(i_Cass)*fCaNCX + Nass.^3 .* cCao)));

% ICaP

ICaP = ICaPmax * y(i_Cass) / (kCaP + y(i_Cass));

% If, Zorn-Pauly LAW fit

Ifyinf = 1 / (1 + exp((y(i_V)+97.82874)/12.48025));

Ifytau = 1 ./...

(0.00332.*exp(-y(i_V)./16.54103)+23.71839.*exp(y(i_V)./16.54103));

IfNa = gIf * y(i>Ify)*((0.2677)*(y(i_V)-ENa));

IfK = gIf * y(i>Ify)*((1-0.2677)*(y(i_V)-EK));

If = IfK + IfNa;

% Ca buffers

betass = (1 + SLlow*KdSLlow./(y(i_Cass) + KdSLlow).^2 +...

SLhigh*KdSLhigh./(y(i_Cass) + KdSLhigh).^2 + BCa*KdBCa./(y(i_Cass) +...

KdBCa).^2).^(-1);

betai = (1 + BCa.*KdBCa./(Cai + KdBCa).^2).^(-1);

gammai = BCa.*KdBCa./(Cai + KdBCa).^2;

betaSR = (1 + CSQN.*KdCSQN./(CaSR + KdCSQN).^2).^(-1);

betaNass = (1 + BNa*KdBNa./(y(i_Nass) + KdBNa).^2).^(-1);

% Diffusion from junct to non-junct

Jj_nj = DCa * Aj_nj / xj_nj * (y(i_Cass)-Cai(end)).*1e-6;

J_SERCASR1 =...

(-k3*CaSR(1).^2*(cpumps-y(i_SERCACa1))+k4*y(i_SERCACa1))*Vnonjunct(1)*2;

J_bulkSERCA1 =...

$(k1 * Cai(1) .^2 * (cpumps - y(i_SERCACA1)) - k2 * y(i_SERCACA1)) * Vnonjunct(1) * 2;$

J_SERCASR2 =...

$(-k3 * CaSR(2) .^2 * (cpumps - y(i_SERCACA2)) + k4 * y(i_SERCACA2)) * Vnonjunct(2) * 2;$

J_bulkSERCA2 =...

$(k1 * Cai(2) .^2 * (cpumps - y(i_SERCACA2)) - k2 * y(i_SERCACA2)) * Vnonjunct(2) * 2;$

J_SERCASR3 =...

$(-k3 * CaSR(3) .^2 * (cpumps - y(i_SERCACA3)) + k4 * y(i_SERCACA3)) * Vnonjunct(3) * 2;$

J_bulkSERCA3 =...

$(k1 * Cai(3) .^2 * (cpumps - y(i_SERCACA3)) - k2 * y(i_SERCACA3)) * Vnonjunct(3) * 2;$

J_SERCASRss =...

$(-k3 * CaSR(4) .^2 * (cpumps - y(i_SERCACass)) + k4 * y(i_SERCACass)) * Vss * 2;$

J_bulkSERCACass =...

$(k1 * y(i_Cass) .^2 * (cpumps - y(i_SERCACass)) - k2 * y(i_SERCACass)) * Vss * 2;$

% RyR

RyRtauadapt = 1;

RyRtauactss = 5e-3;

RyRtauinactss = 15e-3;

nuss = 625 * Vss;

RyRSRCass = (1 - 1 ./ (1 + exp((CaSR(4) - 0.3) ./ 0.1)));

RyRainfss = 0.505 - 0.427 ./ (1 + exp((y(i_Cass) * 1000 - 0.29) ./ 0.082));

RyRoinfss = (1 - 1 ./ (1 + exp((y(i_Cass) * 1000 - (y(i_RyRass) + ...
0.22)) ./ 0.03)));

RyRcinfss = (1 ./ (1 + exp((y(i_Cass) * 1000 - (y(i_RyRass) + 0.02)) ./ 0.01)));

Jrelss = nuss * (y(i_RyRoss)) * y(i_RyRcss) * RyRSRCass * (CaSR(4) - ...
y(i_Cass));

RyRtauact = 18.75e-3;

RyRtauinact = 87.5e-3;

nu1 = 1*Vnonjunct(1);

RyRSRCa1 = (1 - 1./(1 + exp((CaSR(1)-0.3)/0.1)));

RyRainf1 = 0.505-0.427./(1 + exp((Cai(1).*1000-0.29)/0.082));

RyRoinf1 = (1 - 1./(1 + exp((Cai(1).*1000-(y(i_RyRa1) + 0.22))/0.03)));

RyRcinf1 = (1./(1 + exp((Cai(1).*1000-(y(i_RyRa1)+0.02))/0.01)));

Jrel1 = nu1 * (y(i_RyRo1)) * y(i_RyRc1) * RyRSRCa1 * (CaSR(1) - ...
Cai(1));

nu2 = 1*Vnonjunct(2);

RyRSRCa2 = (1 - 1./(1 + exp((CaSR(2)-0.3)/0.1)));

RyRainf2 = 0.505-0.427./(1 + exp((Cai(2).*1000-0.29)/0.082));

RyRoinf2 = (1 - 1./(1 + exp((Cai(2).*1000-(y(i_RyRa2) + 0.22))/0.03)));

RyRcinf2 = (1./(1 + exp((Cai(2).*1000-(y(i_RyRa2)+0.02))/0.01)));

Jrel2 = nu2 * (y(i_RyRo2)) * y(i_RyRc2) * RyRSRCa2 * (CaSR(2) - ...
Cai(2));

nu3 = 1*Vnonjunct(3);

RyRSRCa3 = (1 - 1./(1 + exp((CaSR(3)-0.3)/0.1)));

RyRainf3 = 0.505-0.427./(1 + exp((Cai(3).*1000-0.29)/0.082));

RyRoinf3 = (1 - 1./(1 + exp((Cai(3).*1000-(y(i_RyRa3) + 0.22))/0.03)));

RyRcinf3 = (1./(1 + exp((Cai(3).*1000-(y(i_RyRa3)+0.02))/0.01)));

Jrel3 = nu3 * (y(i_RyRo3)) * y(i_RyRc3) * RyRSRCa3 * (CaSR(3) - ...
Cai(3));

%%SR leak fluxes

JSRCaleak1 = kSRleak * (CaSR(1) - Cai(1)) * Vnonjunct(1);

JSRCaleak2 = kSRleak * (CaSR(2) - Cai(2)) * Vnonjunct(2);

JSRCaleak3 = kSRleak * (CaSR(3) - Cai(3)) * Vnonjunct(3);

JSRCaleakss = kSRleak * (CaSR(4) - y(i_Cass)) * Vss;

%%Cafluxes in 1 nl volume

```

JCa = zeros(length(j),1);
JCa(1) = -J_bulkSERCA1 + JSRCaleak1 + Jrel1;
JCa(2) = -J_bulkSERCA2 + JSRCaleak2 + Jrel2;
JCa(3) = -J_bulkSERCA3 + JSRCaleak3 + Jrel3;
JCa(4) = Jj_nj;
JCass = -Jj_nj + JSRCaleakss - J_bulkSERCAss + Jrelss;

```

```

JSRCa = zeros(length(j),1);
JSRCa(1) = J_SERCASR1 - JSRCaleak1 - Jrel1;
JSRCa(2) = J_SERCASR2 - JSRCaleak2 - Jrel2;
JSRCa(3) = J_SERCASR3 - JSRCaleak3 - Jrel3;
JSRCa(4) = J_SERCASRss - JSRCaleakss - Jrelss;

```

```

% Naflux in 1 nl volume

```

```

JNa = DNa * Aj_nj / xj_nj_Nai * (y(i_Nass) - y(i_Nai))* 1e-6;

```

```

%% Differential equations

```

```

dy = zeros(length(j)*2+i_Cacenter-1,1);

```

```

% V

```

```

dy(i_V) = (INa + ICaL + It + Isus + IK1 + IKr + IKs + INab + ICab + INaK + ...
ICaP + INaCa + If + Istim)/(-Cm); % currents are in (pA)

```

```

% INa

```

```

dy(i_INam) = (INaminf - y(i_INam))/INamtau;
dy(i_INah1) = (INahinf - y(i_INah1))/INah1tau;
dy(i_INah2) = (INahinf - y(i_INah2))/INah2tau;

```

```

% ICaL

```

```

dy(i_ICaLd) = (ICaLdinf - y(i_ICaLd))/ICaLdtau;
dy(i_ICaLf1) = (ICaLfinf - y(i_ICaLf1))/ICaLf1tau;
dy(i_ICaLf2) = (ICaLfinf - y(i_ICaLf2))/ICaLf2tau;

```

$dy(i_ICaLfca) = (ICaLfca_{inf} - y(i_ICaLfca))/ICaLfca_{tau};$

% It

$dy(i_Itr) = (Itr_{inf} - y(i_Itr))/Itr_{tau};$

$dy(i_Its) = (Its_{inf} - y(i_Its))/Its_{tau};$

% Isus

$dy(i_Isusr) = (Isusr_{inf} - y(i_Isusr))/Isusr_{tau};$

$dy(i_Isuss) = (Isuss_{inf} - y(i_Isuss))/Isuss_{tau};$

% IKs

$dy(i_IKsn) = (IKsn_{inf} - y(i_IKsn))/IKsn_{tau};$

% IKr

$dy(i_IKrpa) = (IKrpainf - y(i_IKrpa))/IKrpatau;$

% If

$dy(i_Ify) = (Ify_{inf} - y(i_Ify))/Ify_{tau};$

% SERCACa

$dy(i_SERCACa1) = 0.5*(-J_SERCASR1 + J_bulkSERCA1)/V_{nonjunct}(1);$

$dy(i_SERCACa2) = 0.5*(-J_SERCASR2 + J_bulkSERCA2)/V_{nonjunct}(2);$

$dy(i_SERCACa3) = 0.5*(-J_SERCASR3 + J_bulkSERCA3)/V_{nonjunct}(3);$

$dy(i_SERCACass) = 0.5*(-J_SERCASR_{ss} + J_bulkSERCA_{ss})/V_{ss};$

% RyR

$dy(i_RyRoss) = (RyRo_{infss} - y(i_RyRoss))/RyR_{tauactss};$

$dy(i_RyRcss) = (RyRc_{infss} - y(i_RyRcss))/RyR_{tauinactss};$

$dy(i_RyRass) = (RyRa_{infss} - y(i_RyRass))/RyR_{tauadapt};$

$dy(i_RyRo1) = (RyRo_{inf1} - y(i_RyRo1))/RyR_{tauact};$

$dy(i_RyRc1) = (RyRc_{inf1} - y(i_RyRc1))/RyR_{tauinact};$

$dy(i_RyRa1) = (RyRa_{inf1} - y(i_RyRa1))/RyR_{tauadapt};$

$dy(i_RyRo2) = (RyRo_{inf2} - y(i_RyRo2))/RyR_{tauact};$

$dy(i_RyRc2) = (RyRc_{inf2} - y(i_RyRc2))/RyR_{tauinact};$

$dy(i_RyRa2) = (RyRa_{inf2} - y(i_RyRa2))/RyR_{tauadapt};$

```

dy(i_RyRo3) = (RyRoinf3-y(i_RyRo3))./RyRtauact;
dy(i_RyRc3) = (RyRcinf3-y(i_RyRc3))./RyRtauinact;
dy(i_RyRa3) = (RyRainf3-y(i_RyRa3))./RyRtauadap% Nai & Ki
dy(i_Nass) = betaNass * (-JNa/Vss -(INa + INab + 3*INaK + 3*INaCa + IfNa) /...
(Vss*F));
dy(i_Nai) = JNa/Vnonjunct_Nai;
dy(i_Ki) = -(It + Isus + IK1 + IKr + IKs - 2*INaK + IfK + Istim) /...
(Vcytosol*F);

% Ca
dy(i_Cass) = betass * ( JCass/Vss + (-ICaL - ICab - ICaP + 2*INaCa) /...
(2*Vss*F) );

dCaidt = zeros(length(Cai),1);
dCaidt(1) = betai(1) .* (DCa + gammai(1).*DCaBm) .* (...
(Cai(2)-2.*Cai(1)+Cai(1))./dx.^2 + (Cai(2)-Cai(1))./(2.*j(1).*dx.^2) ) -...
2.*betai(1).*gammai(1).*DCaBm./(KdBCa + Cai(1)) .*...
((Cai(2)-Cai(1))./(2.*dx)).^2 + JCa(1)./Vnonjunct(1).*betai(1);
dCaidt(2:end-1) = betai(2:end-1) .* (DCa + gammai(2:end-1).*DCaBm) .* (...
(Cai(3:end)-2.*Cai(2:end-1)+Cai(1:end-2))./dx.^2 +...
(Cai(3:end)-Cai(1:end-2))./(2.*j(2:end-1).*dx.^2) ) -...
2.*betai(2:end-1).*gammai(2:end-1).*DCaBm./(KdBCa + Cai(2:end-1)) .*...
((Cai(3:end)-Cai(1:end-2))./(2.*dx)).^2 +...
JCa(2:end-1)./Vnonjunct(2:end-1).*betai(2:end-1);
dCaidt(end) = betai(end) .* (DCa + gammai(end).*DCaBm) .* (...
(Cai(end)-2.*Cai(end)+Cai(end-1))./dx.^2 +...
(Cai(end)-Cai(end-1))./(2.*j(end).*dx.^2) ) -...
2.*betai(end).*gammai(end).*DCaBm./(KdBCa + Cai(end)) .*...
((Cai(end)-Cai(end-1))./(2.*dx)).^2 + JCa(end)./Vnonjunct(end).*betai(end);

dy(i_Cacenter:length(Cai)+i_Cacenter-1) = dCaidt;

```

```

dCaSRdt = zeros(length(CaSR),1);
dCaSRdt(1) = betaSR(1) .* (DCaSR) .* ( (CaSR(2)-2.*CaSR(1)+CaSR(1))./dx.^2 +...
(CaSR(2)-CaSR(1))./(2.*j(1).*dx.^2) ) + JSRCa(1)./VSR(1).*betaSR(1);
dCaSRdt(2:end-1) = betaSR(2:end-1) .* (DCaSR) .* (...
(CaSR(3:end)-2.*CaSR(2:end-1)+CaSR(1:end-2))./dx.^2 +...
(CaSR(3:end)-CaSR(1:end-2))./(2.*j(2:end-1).*dx.^2) ) +...
JSRCa(2:end-1)./VSR(2:end-1).*betaSR(2:end-1);
dCaSRdt(end) = betaSR(end) .* (DCaSR) .* (...
(CaSR(end)-2.*CaSR(end)+CaSR(end-1))./dx.^2 +...
(CaSR(end)-CaSR(end-1))./(2.*j(end).*dx.^2) ) +...
JSRCa(end)./VSR(end).*betaSR(end);

dy(i_Cacenter+length(j):length(j)*2+i_Cacenter-1) = dCaSRdt;
if flag
    dy = [ICaL,ICab,INaCa,ECa_app,INaK,ICaLfcainf];
end

```


B) FILE DI IMPLEMENTAZIONE DEL MODELLO

Extracellular Concentrations

global cCao

%% ODE options

options = odeset('RelTol',1e-5,'MaxStep',1e-3);

%% Main options

addpath(genpath('Funzioni'));

addpath(genpath('CondizioniIniziali'));

addpath(genpath('Modelli'));

%% Simulation Settings

CL_s = 1;

nbeats1 = 15;

mod1=@modK;

vCao= [0.9,1.8,2.7]; % vettore calcio

%% Figure Initialization

h1 =figure;

title(sprintf('AP vs time 1 - %i beats',nbeats1));

hold on; xlabel('t (ms)'); ylabel('V (mV)'); xlim([-10 CL_s*1e3]); % figura 1 AP

h2 =figure;

title(sprintf('ICaL1 vs time - %i beats',nbeats1));

hold on; xlabel('t (ms)'); ylabel('ICaL1 (pA)'); xlim([-10 CL_s*1e3]);% figura 2 Ical

h3=figure;

subplot(1,2,1)

title('Nai mod1');

hold on; xlabel('beats'); ylabel('Nai(mM)');

subplot(1,2,2)

title('Cai mod1');

```

hold on; xlabel('beats '); ylabel('Nai(mM)');

h4 =figure;
title(sprintf('ICab1 vs time - %i beats',nbeats1));
hold on; xlabel('t (ms)'); ylabel('ICab1(pA)'); xlim([-10 CL_s*1e3]);% figura 2 Ical

h5=figure;
title(sprintf('INaCa1 vs time - %i beats',nbeats1));
hold on; xlabel('t (ms)'); ylabel('INaCa1(pA)'); xlim([-10 CL_s*1e3]);% figura 2 Ical

h6 =figure;
title(sprintf('DDF vs time - %i beats',nbeats1));
hold on; xlabel('t (ms)'); ylabel('Eca_app(pA)'); xlim([-10 CL_s*1e3]);% figura 2 Ical

h7=figure;
title(sprintf('INak1 vs time - %i beats',nbeats1));
hold on; xlabel('t (ms)'); ylabel('INa1(pA)'); xlim([-10 CL_s*1e3]);% figura 2 IcaL

h9=figure;
subplot(2,1,1)
title(sprintf('fcainf1 - %i beats',nbeats1));
hold on; xlabel('t (ms)'); ylabel('fcainf1'); xlim([-10 CL_s*1e3]);% figura 2 Ical
subplot(2,1,2)
title(sprintf('fcainf1 - %i beats',nbeats1));
hold on; xlabel('cass'); ylabel('fcainf1');

h10=figure;
title(sprintf('Cass1 vs time - %i beats',nbeats1));
hold on; xlabel('t (ms)'); ylabel('Cass(mM)'); xlim([-10 CL_s*1e3]);% figura 2 Ical
%% Simulazione

colore= 'mgbkryc';
for iCa = 1:length(vCao)
    cCao= vCao(iCa);

```

```

load('CI_K2011');
Y0_K = y0_K2011;

for nb=1:nbeats1
    [t1,y1] = ode15s(mod1,[0 CL_s],Y0_K,options,0);
    Y0_K = y1(end,:);
    fprintf('Beats %i of %i\n',nb,nbeats1);
    vNass1(nb)= y1(end,32);
    vCass1(nb)= y1(end,35); % vettore lungo quanto i battiti per valutareSS
end

figure(h1);
plot(t1*1e3,y1(:,1),colore(iCa));

figure(h3);
subplot(1,2,1)
plot(vNass1,colore(iCa))
subplot(1,2,2)
plot(vCass1,colore(iCa))

APD90_K (iCa)=calcoloAPD(t1*1e3,y1(:,1),90,0);

figure(h10);
plot(t1*1e3,y1(:,35),colore(iCa));

%% Recupero correnti
ll=size(mod1(t1(1),y1(1,:)'),1,2);

output1=zeros(length(t1),ll);
for j=1:length(t1)
    output1(j,:) = mod1(t1(j),y1(j,:)'),1);
end
ICaL1 = output1(:,1); % corrente calcio modello koivumaki

```

```
ICab1 = output1(:,2);  
INaCa1= output1(:,3);  
Eca_app= output1(:,4);  
INaK1=output1(:,5);  
fcainf1=output1(:,6);
```

```
figure(h2)  
plot(t1*1e3,ICaL1,colore(iCa));
```

```
figure(h4)  
plot(t1*1e3,ICab1,colore(iCa));
```

```
figure(h5)  
plot(t1*1e3,INaCa1,colore(iCa));
```

```
figure(h6)  
plot(t1*1e3,Eca_app,colore(iCa));
```

```
figure(h7)  
plot(t1*1e3,INaK1,colore(iCa));
```

```
figure(h9)  
subplot(1,2,1)  
plot(t1*1e3,fcainf1,colore(iCa))  
plot(t1*1e3,y1(:,8),colore(iCa),'LineWidth',2)  
subplot(1,2,2)  
plot(y1(:,35),fcainf1,colore(iCa));  
plot(y1(:,35),y1(:,8),colore(iCa),'LineWidth',2)
```

```
y1save{iCa}=y1; % salva tutti i valori per tutti i cicli e non solo l'ultimo  
t1save{iCa}=t1;  
end
```

C) FUNZIONE DI CALCOLO DELL'APD

```
function APD=calcoloAPD(t,V,p,flag)

% APD90 = calcoloAPD(t,V,p,flag)
% t -> vettore dei tempi
% V -> vettore di Vm
% p -> percentuale tra 0 e 100 (es.90)
% La funzione restituisce il valore dell'APD in ms
% Ricerca del punto di Massima Pendenza
% (inizio del calcolo dell'APD):
pendenzaV = V(2:end)-V(1:end-1);
pendenzat = t(2:end)-t(1:end-1);
[temp, i_start] = max(pendenzaV./pendenzat);

% Valore iniziale del potenziale -> minimo:
m=V(1);
M=max(V);
% Calcolo del valore di soglia e relativo indice
durata=p;
Vsoglia=m+(1-durata/100)*(M-m);
i_end=find(V>=Vsoglia,1,'last');
APD_start=t(i_start);
APD_end=t(i_end);
APD = APD_end - APD_start;
%% Test
if flag==1
    plot(t,V,'m')
    hold on
    plot(APD_start,M,'k*')
    plot(APD_end,V(i_end),'bo')
end
% fprintf('APD calcolato\n');
end
```

D) PROTOCOLLO V_CLAMP

```
function ProtocolloVClamp_ICaL(modello,y0_SS,report,file_s)

%% Magyar Protocol (A): ICaL Steady State Activation and I-V curve
% V-Clamp protocol (2 steps simulations):
% 1) 100ms with V holding = es. -40mV
% 2) 400ms with V clamp = vettore da definire, es. -35:5:60mV
% INPUTS:
% - modello: model m-file
% - nomefile_y0_SS: file da caricare con y0_SS (vanno bene 100b con frequenza a 1Hz)
% - report 1 -> plot; report 3 -> detailed plot report;
% -> consiglio: metti il report sempre a 3, così vedi anche le correnti
% - file_s -> nome per il salvataggio es. 'ProvaICaL' (con le virgolette)

%% Data Loading
% load(nomefile_y0_SS);
CI = y0_SS;
daSalvare='Data_VClamp'; %Directory per il salvataggio dei dati
if ~exist(daSalvare,'dir')
    mkdir(daSalvare);
end

%% Main Settings
% V-clamp values
v_hold = -80; %mV
pclamp = [-60:10:-10,0.01,10:10:60]; %mV RICORDA che lo zero da ERRORE
PICaL = zeros(length(pclamp),1);
% interpulse intervals -> durata del primo e del secondo tratto di V-Clamp
ts1 = 300; ts2 = 500;
% options for ode solver
options=odeset('MaxStep',1);
colori = 'mgbryc'; linea = {'-',':','-','--'}; kl = 1; nplot = 1;
if report==3
    axis3 = [0 ts1+ts2 -10 1];    axis3V = [0 ts1+ts2 -50 70];
```

```

hICaL=figure('Name','VClamp');
subplot(2,1,1); hold on; box; %axis(axis3V);
xlabel('t (ms)'); ylabel('V-Clamp (mV)');
title('V-Clamp protocol');
subplot(2,1,2); hold on; box; %axis(axis3);
xlabel('t (ms)'); ylabel('I_{CaL} (pA/pF)');
title('I_{CaL}');
namehICaL = [daSalvare '\ file_s '_ICaLplot'];
end

%% V-clamp cycle:
for iv=1:length(pclamp)
v_clamp = pclamp(iv);
V-Clamp protocol -> Ely:

% 1st step: V_hold held for t1
x0 = CI;    x0(1)=v_hold;    t0=0;
[t1,y1] = ode15s(modello,[t0 t0+ts1],x0,options,0,1);
% 2st step: V_clamp held for t2
x0 = y1(end,:); x0(1)=v_clamp;    t0=t1(end);
[t2,y2] = ode15s(modello,[t0 t0+ts2],x0,options,0,1);
% Tempo e Y totali dei due step
t_tot=[t1;t2]; y_tot=[y1;y2];
% Calcolo correnti -> in questo caso è ICaL ma puoi cambiare
ICaL=zeros(size(t_tot));
for j=1:length(t_tot)
    CVs=feval(modello,t_tot(j),y_tot(j,:),'1,1');
    ICaL(j)=CVs(1);
end
% Calcolo del picco, in questo caso con min perchè è negativo
[PICaL(iv),iP] = min(ICaL);
% ICaL plot
if report == 3 % && mod(iv,3)==1
    il = mod(kl,length(linea));

```

```

        if il==0; il=length(linea); end;
ic = mod(nplot,length(colori));
    if ic==0; ic=length(colori); kl=kl+1; end;
figure(hICaL)
subplot(2,1,1);
plot(t_tot,y_tot(:,1),[colori(ic) linea{il}]);
subplot(2,1,2);
plot(t_tot,ICaL,[colori(ic) linea{il}]);
plot(t_tot(iP),PICaL(iv),'k*');
nplot = nplot+1;
end
end
save([daSalvare '\ file_s '_data'],'y_tot','t_tot','pclamp','PICaL');
if report
    hIV = figure('Name','IVcurve');
    namehIV = [daSalvare '\ file_s '_IVcurve'];
    hold on; box; ('ICaL I-V curve');
    xlabel('V-clamp (mV)'); ylabel('I_{CaL} peak (pA/pF)');
    plot(pclamp,PICaL,'m*-'); %axis([-40 65 -9 1]);
    saveas(hIV,namehIV);
end
if report == 3; saveas(hICaL,namehICaL);
end;

```


E) IMPLEMENTAZIONE PROTOCOLLO

```
clear all; close all; clc
global cCao
cCao=1.8;
load('DatiSIM','Y0_K');
y0_SS=Y0_K;
%% Utilizzo della funzione per il V-Clamp
modello = @mod_K;
report = 3;
file_s = 'ProvaSalvataggioK';
ProtocolloVClamp_K(modello,y0_SS,report,file_s)
```

F) CALCOLO DELLA FCA,INF

```
%PROVA VERIFICA DIVERSI VALORI fcainf CICLO FOR
```

```
%% Equazioni iniziale fcainf
```

```
a =[0.0001 0.0005 0.005 0.01 0.05]; % shift
```

```
b= [1 3 4]; % esponenziale
```

```
vCass=1e-3*[0:0.2:1.8];
```

```
fca_vera = 1-1./(1+(0.001./vCass).^2);
```

```
%% CICLO FOR
```

```
colori='mgbyrck';
```

```
figure; hold on;
```

```
for i=1:length(a)
```

```
    fcainf= 1-1./(1+(a(i)./vCass).^2);
```

```
    subplot(1,2,1);
```

```
    plot(vCass,fcainf,'color',colori(i));
```

```
    title(sprintf('Fcainf var a')); 
```

```
    hold on; xlabel('vcass (mM)'); ylabel('fcainf ');
```

```
end
```

```
plot(vCass,fca_vera,'k','LineWidth',2);
```

```
legend('0.0001','0.0005','0.005','0.01','0.05','originale'); % shift
```

```
for i=1:length(b)
```

```
    fcainf= 1-1./(1+(0.001./vCass).^b(i));
```

```
    subplot(1,2,2);
```

```
    plot(vCass,fcainf,'color',colori(i));
```

```
    title(sprintf('Fcainf var b')); 
```

```
    hold on; xlabel('vcass (mM)'); ylabel('fcainf ');
```

```
end
```

```
plot(vCass,fca_vera,'k','LineWidth',2);
```

```
legend('1','3','4','originale'); % shift
```

APPENDICE B : MODIFICA DEL MODELLO DI KOIVUMAKI CON ECA_APP

Dato che il modello da cui siamo partiti non utilizza una Driving Force [$V_m - E_{Ca}$] che dipenda dalla concentrazione ma piuttosto sfrutta un potenziale di equilibrio per il calcio costante nel tempo, abbiamo deciso di provare anche a lavorare sulla funzione originale di Koivumaki et al., senza apportare modifiche alla Driving Force, sempre per raggiungere lo stesso obiettivo, ovvero riprodurre la dipendenza corretta tra durata del potenziale d'azione e calcio extracellulare.

Riproponendo l'equazione della corrente ionica:

$$I_{CaL} = g_{CaL} * d * f_{Ca} * f_1 * f_2 * (V - E_{Ca,app})$$

In questo caso, senza l'effetto della driving force che ha un ruolo importante, siamo riusciti a ottenere il risultato desiderato molto facilmente.

Basandoci sulle stesse modifiche descritte nel capitolo 5, abbiamo lavorato in particolare sulla corrente di background sulla conduttanza massima della corrente di calcio I_{CaL} . In particolare la soluzione ottimale è stata raggiunta riducendo la prima del 20% e la seconda incrementata di 2.3 volte, ovvero:

$$g_{CaL} = 2.3 * 25.3125$$

$$I_{Cab} = 0.8 * [g_{Cab} * (V_m - E_{Ca})]$$

Includendo queste semplici modifiche nel modello, infatti, si ottiene subito la corretta dipendenza della durata del potenziale d'azione dal calcio, come mostrato nelle Figure 40,41.

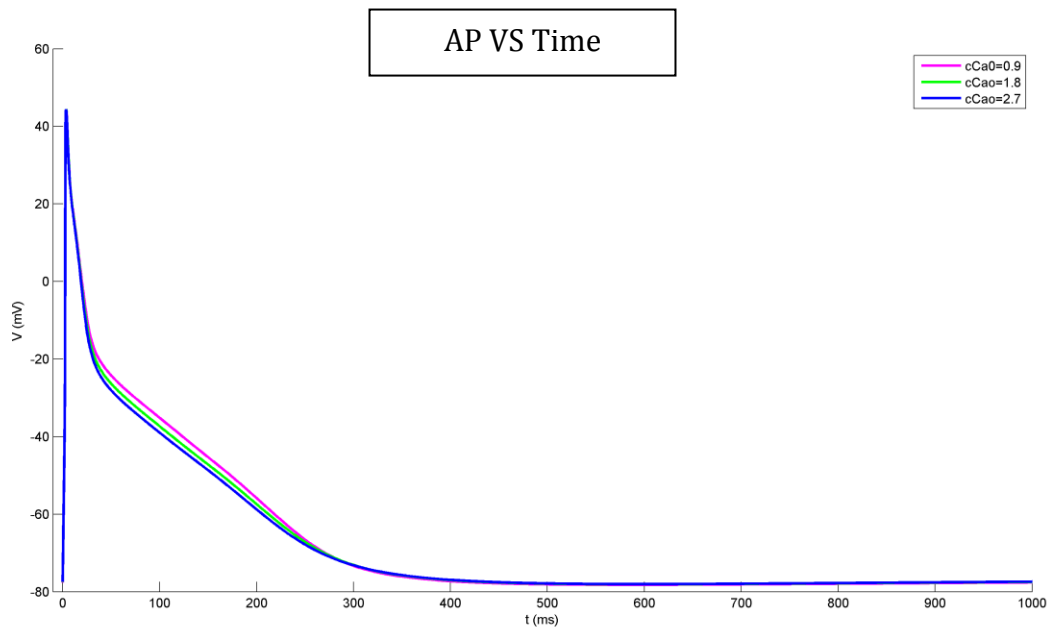


Figura 40: AP KOIVUMAKI MODIFICATO

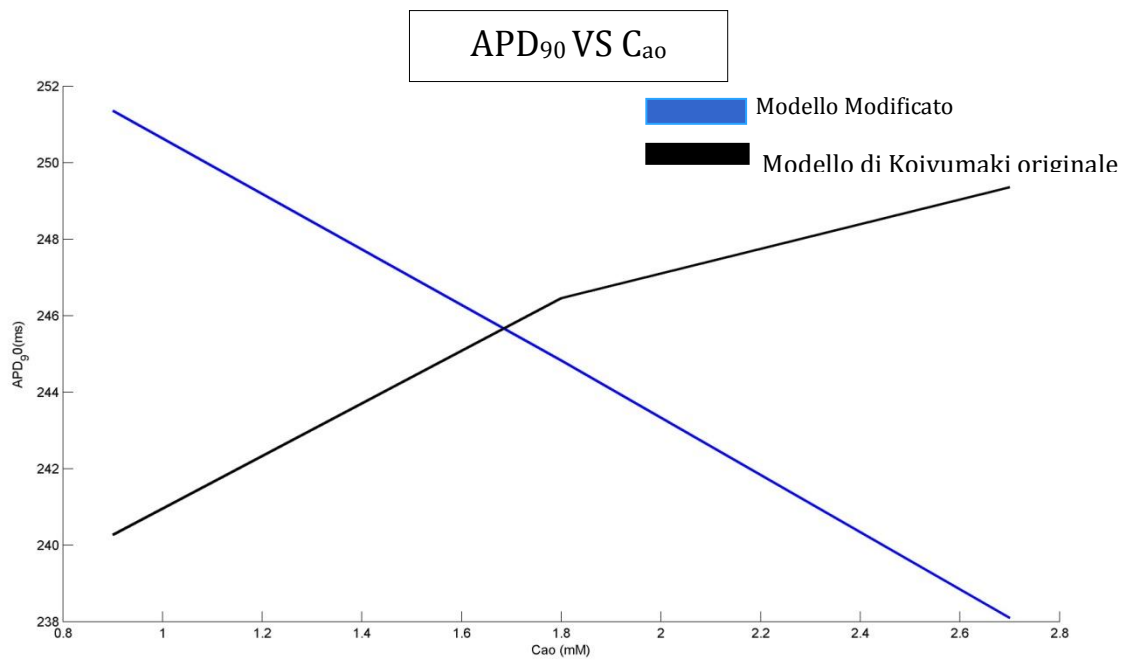


Figura 41: Confronto APD: la curva in blu mostra la dipendenza del modello modificato in cui la Driving Force risulta invariata, la curva in nero mostra il modello originale di Koivumaki

Calcolando la corrente ionica del calcio in protocollo Voltage clamp, descritto ampiamente nei capitoli precedenti, abbiamo riscontrato che il valore assunto dalla corrente ionica in seguito alle modifiche sopra descritte, si allontanava dai valori presenti in letteratura:

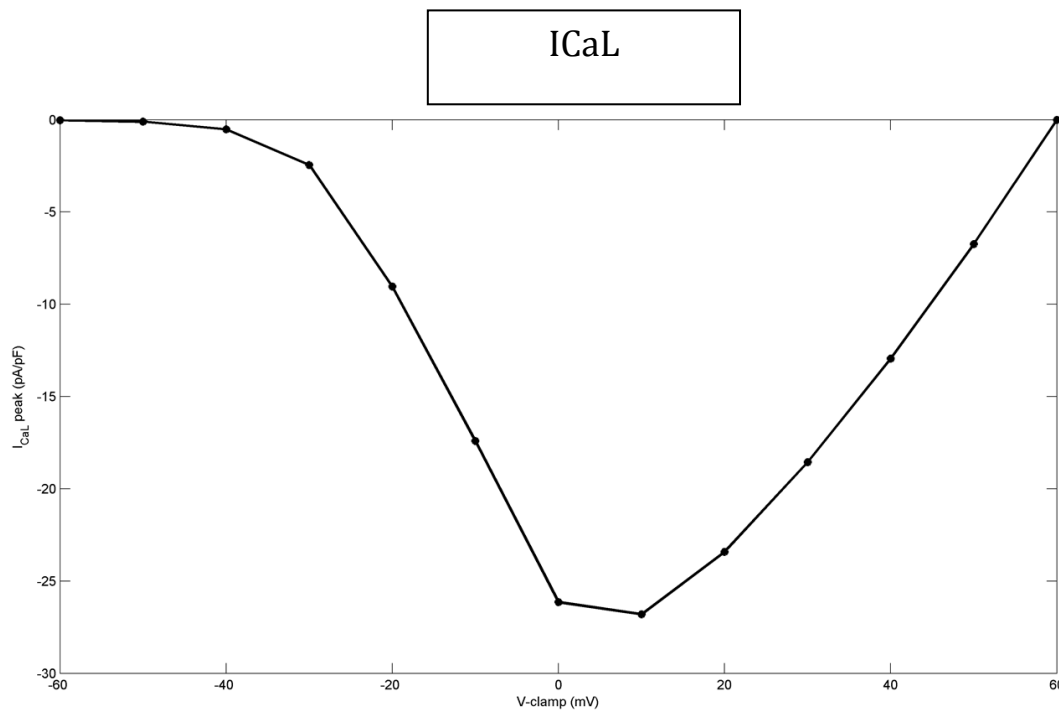


Figura 42: PROTOCOLLO V-CLAMP : modello modificato con la Driving Force

Il picco raggiunto dalla corrente ionica è di circa -27 pA/pF a fronte dei -12 pA/ pF del modello originale.

Questo risultato ci ha portati allo stesso ragionamento effettuato nel capitolo 5:

$$\frac{dd}{dt} = \frac{d_{inf} - d}{\tau}$$

Con

$$\tau_{originale} = 0.0027e^{\left(-\frac{V+35}{30}\right)^2} + 0.002$$

I valori scelti:

$$\tau_{finale} = 0.0027e^{\left(-\frac{V+35}{30}\right)^2} + 0.006$$

$$g_{CaL} = 1.5 * 25,3125 \text{ nS}$$

I risultati mostrano una durata del potenziale di circa 239 ms in corrispondenza di una concentrazione di 1.8mM:

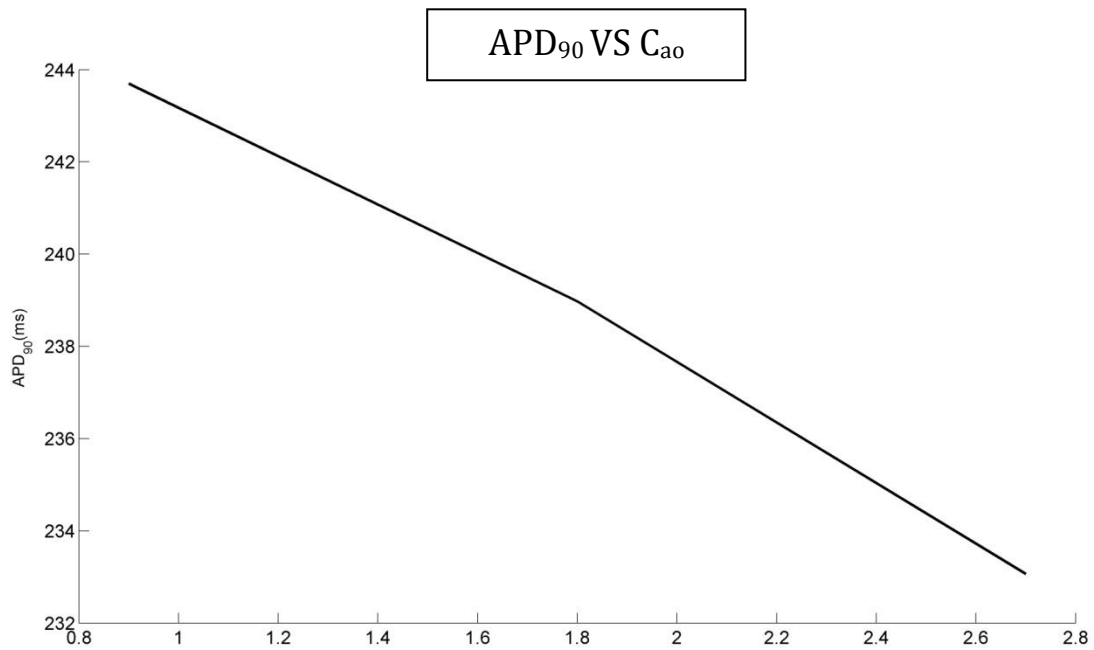


Figura 43: APD Koivumaki modificatCalcolando la corrente ionica attraverso il protocollo voltage clamp del modello modificato possiamo vedere che il picco della corrente è di -12 pA/ pF , che coincide con il picco originariamente calcolato per il modello di Koivumaki.

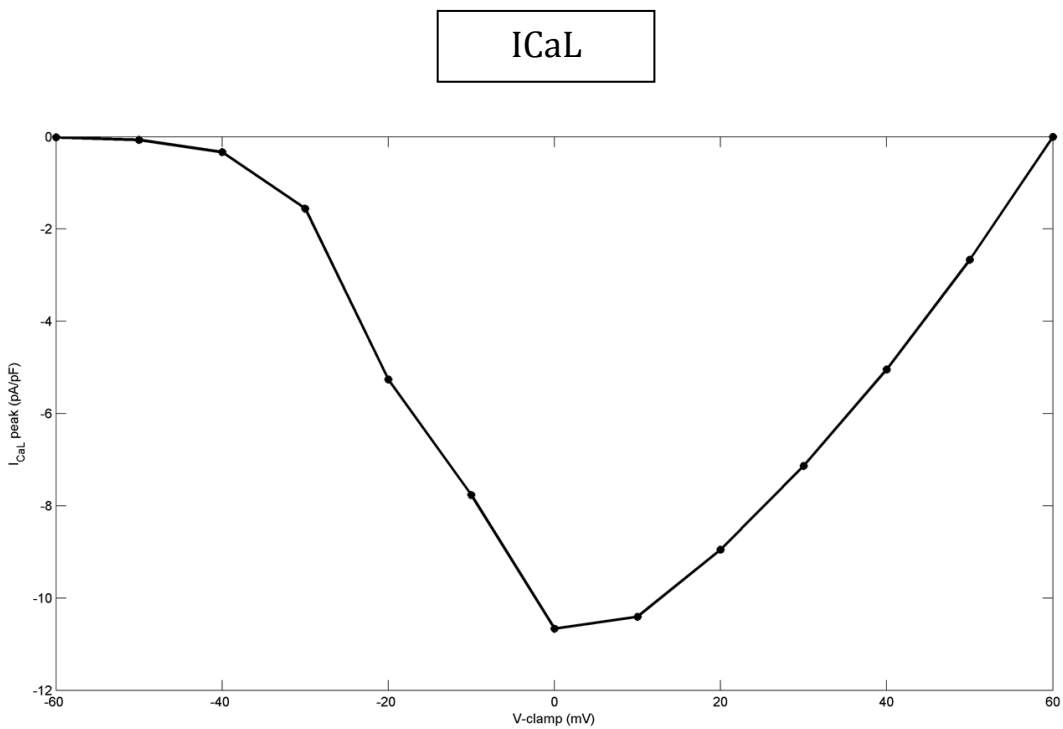


Figura 44:Protocollo V-clamp del modello di koivumaki modificato senza Driving Force

A fronte delle modifiche fatte e dei risultati analizzati, nonostante il modello di Koivumaki non è propriamente definibile fisiologico a causa della mancanza di dipendenza delle tensioni da concentrazioni extra ed intra cellulari, l'intento di modificare la dipendenza tra la durata del potenziale e le variazioni di calcio inizialmente proporzionali, è riuscito pienamente.

BIBLIOGRAFIA

Berne, R. M. (2010). *Fisiologia*. Ambrosiana.

Bers. (2001). *EXCITATION-CONTRACTION COUPLING AND CARDIAC CONTRACTILE FORCE*. Kluwer Academic Press .

Bosh, R. F. (1999). Ionic mechanism of electrical remodeling in human atrial fibrillation.

Boutjdir M, L. J. (1986). *Inhomogeneity of Cellular Refractoriness in Human Atrium - Factor of Arrhythmia?* Pacing Clin Electrophysiol 9: 1095–1100.

Brixius K, P. M. (1997). *Effect of inotropic interventions on contraction and Ca²⁺ transient in the human heart*. J Appl Physiol 83: 652–660.

Cerbai, S. S. (2009). From in vivo plasma composition to in vitro cardiac electrophysiology and in silico virtual heart: the extracellular calcium enigma.

Cheng H, C. M. (1994). *Propagation of Excitation-Contraction Coupling into Ventricular Myocytes*. Pflugers Archiv-European Journal of Physiology 428: 415–417.

Christ, W. e. (2008). Pathology-specific effects of the IK_{Kur}/Ito/IK₁, ACh blocker rAVE0118 on channels in human chronic atrial fibrillation.

Courtemanche, M. J. (1998). Ionic mechanisms underlying human atrial action potential properties: insights from a mathematical model.

Coutu P, C. D. (2006). *Comparison of Ca²⁺ handling properties of canine pulmonary vein and left atrial cardiomyocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 291: H2290–2300.

Daoud, E. K. (1997). Effect of verapamil and procainamide on atrial fibrillation-induced electrical remodeling in humans.

Dawodu AA, M. F. (1996). *The shape of human atrial action potential accounts for different frequency-related changes in vitro*. . Int J Cardiol 54: 237–249.

Deck, K. T. (1964). Voltage clamp technique in mammalian cardiac fibres.

Demir, S. S. (1994). *A mathematical model of a rabbit sinoatrial node cell*. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 266, C832–C852.

- Di Francesco, Noble . (1985). A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes.
- DM, B. (2011). *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*. Dordrecht. Boston: Kluwer Academic Publishers. xxiv, 427 p. p.
- Dokos, S. C. (1996). *Vagal control of sinoatrial rhythm: a mathematical model*. J. Theor. Biol. 182, 21–44. (doi:10.1006/jtbi.1996.0141).
- Earm, Y. N. (1990). A model of the single atrial cell: relation between calcium current and calcium release.
- Fabiato.A. (1983). *Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum*. Am J Physiol Cell Physiol 245: C1–14.
- Fitzhugh, R. (1960). *Thresholds and plateaus in the Hodgkin–Huxley nerve equa*. J. Gen. Physiol. 43, 867–896. (doi:10.1085/jgp.43.5.867).
- Frank, M. A. (1975). Stereological measurements of atrial ultrastructures in the guinea-pig.
- Gosling, P. (1986). Analytical reviews in clinical biochemistry: calcium measurement.
- Grandi, E. (2011). Human atrial action potential and Ca²⁺ model:sinus rhythm and chronic atrial fibrillation ,.
- Grandi., P. F. (2009). A Novel Computational Model of the Human Ventricular Action Potential and Ca transient.
- Gyorke I, G. S. (1998). *Regulation of the cardiac ryanodine receptor channel by luminal Ca²⁺*. Biophys J 75: 2801–2810.
- Gyorke S, F. M. (1993). *Ryanodine Receptor Adaptation - Control Mechanism of Ca²⁺-Induced Ca²⁺ Release in Heart*. Science 260: 807–809.
- Han, C. T. (2002). Modulation of action potential by [Ca²⁺] in modeled rat atrial and guinea pig ventricular myocytes.
- Hatem SN, B. A. (1997). *Different compartments of sarcoplasmic reticulum participate in the excitation-contraction coupling process in human atrial myocytes*. Circ Res 80: 345–353.

- Hilgermann, D. N. (1987). Excitation-concentration coupling and extracellular calcium transient in rabbit atrium: reconstruction of basic cellular mechanisms.
- Hodgkin. (1952c). The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*.
- Hodgkin, H. &. (1952b). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*.
- Hodgkin., H. (1952d). *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*. *J Physiol*.
- Hodgkin., H. (1952a). The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*.
- Hove-Madsen, L. L.-G. (2004). Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes.
- Huser J, L. S. (1996). *Calcium gradients during excitation-contraction coupling in cat atrial myocytes*. *J Physiol* 494: 641–651.
- Israel, G. (1986). *Modelli matematici, Editori Riuniti. Nuova edizione: Modelli Matematici. Introduzione alla matematica applicata, Gruppo Editoriale Muzzio, 2009.*
- Iyer, V. M. (2004). *A computational model of the human left-ventricular epicardial myocyte*. *Biophys. J.* 87, 1507–1525. (doi:10.1529/biophysj.104.043299).
- Jafri, M. S. (1998). *Cardiac Ca²⁺ dynamics: the roles of ryanodine receptor adaptation and sarcoplasmic reticulum load*. *Biophys. J.* 74, 1149–1168. (doi:10.1016/S0006-3495(98)77832-4).
- Johnson E. A. & Lieberman, M. (1971). *Heart: excitation and contraction*. *Annu. Rev. Physiol.* 33,479–532. (doi:10.1146/annurev.ph.33.030171.002403).
- Katz. (1992).
- Kockskamper J, Z. A. (2005). *Modulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release by glycolysis in cat atrial myocytes*. *J Physiol* 564: 697–714.
- Kockskamper, J. S. (2001). Activation and propagation of Ca²⁺ release during excitation-contraction coupling in atrial myocytes.

- Koivumäki, J. T. (2011). Impact of sarcoplasmic reticulum calcium release on calcium dynamics and action potential morphology in human atrial myocytes: a computational study.
- Le Grand, B. , -P. (s.d.). Depressed transient outward and calcium currents in dilated human atria.
- Lindblad, D. S. (1996). *A model of the action potential and underlying membrane currents in a rabbit atrial cell*. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 271, H1666–H1696.
- Luo, C. H. (1994). *A dynamic model of the cardiac ventricular action potential I. Simulations of ionic currents and concentration changes*. *Circ. Res.* 74, 1071–1096.
- Maier LS, B. P. (2000). *Ca²⁺ handling in isolated human atrial myocardium*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H952–H958.
- Malekar, M. (2008). Mathematical simulations of ligand-gated and cell-type specific effects on the action potential of human atrium.
- Mathias, W. H. (2013). Benchmarking electrophysiological models of human atrial myocytes.
- Matsuoka, S. S. (2003). *Role of individual ionic current systems in ventricular cells hypothesized by a model study*. *Jpn J. Physiol.* 53, 105–123. (doi:10. 2170/jjphysiol.53.105).
- Mewes T, R. U. *L-type calcium currents of human myocytes from ventricle of non-failing and failing hearts and from atrium*. *Mol Cell J Mol Cell*.
- Michailova, A. D. (2002). Spatiotemporal features of Ca²⁺ buffering and diffusion in atrial cardiac myocytes with inhibited sarcoplasmic reticulum.
- Nattel, S. L. (1997). Properties of human atrial I-Ca at physiological temperatures and relevance to action potential.
- Niedergerke R. & Orkand, R. K. (1966). *The dual effect of calcium on the action potential of the frog's heart*. The dual effect of calcium on the action potential of the.
- Noble, D. &. (1984). *A model of sino-atrial node electrical activity based on a modification of the DiFrancesco–Noble (1984) equations*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 222, 295–304. (doi:10.1098/rspb.1984.0065).
- Noble, D. (1962). *A modification of the Hodgkin–Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pace-maker potentials*. *J. Physiol. (Lond.)* 160, 317–352.

- Nygren, e. a. (1998). Mathematical model of a adult human atria lcell. The role of K⁺ currents in repolarization.
- O'Shaughnessy, W. (1831). *Proposal of a new method of treating the blue epidemic cholera by the injection of highly-oxygenated salts into the venous system*. Lancet 17, 366–371.
- O'Hara, T. V. (2011). Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: model formulation and experimental validation.
- Orkand R. K. & Niedergerke, R. (1964). *Heart action potential: dependence on external calcium and sodium ions*. Science 146, 1176–1177.
- Ouadid, H. A. (1995). Calcium Currents in Diseased Human Cardiac-Cells.
- Pandit, S. V. (2001). *A mathematical model of action potential heterogeneity in adult rat left ventricular myocytes*. Biophys. J. 81, 3029–3051. (doi:10.1016/S0006-3495(01)75943-7).
- Piacentino V, W. C.-T. (2003). *Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes*. Circ Res 92: 651–658.
- Priebe, L. &. (1998). *Simulation study of cellular electric properties in heart failure*. . Circ. Res. 82, 1206–1223.
- Ramirez RJ, N. S. (2000). *Mathematical analysis of canine atrial action potentials: rate, regional factors, and electrical remodeling*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 279: H1767–1785.
- Rasmusson, R. C. (1990). A mathematical model of electrophysiological activity in a bullfrog atrial cell.
- Reuter, H. (1997). *The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium-concentration*. J. Physiol. 192, 479–492.
- Ringer, S. (1883). *A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart*. J. Physiol. (Lond.) 4, 29–42.
- Rudy, Y. Luo, C H. and. (1994). A dynamic model of the cardiac ventricular action potential: I. Simulations of ionic currents and concentration changes.
- Shannon TR, G. K. (2000). *Reverse mode of the sarcoplasmic reticulum calcium pump and load-dependent cytosolic calcium decline in voltageclamped cardiac ventricular myocytes*. Biophysical Journal 78: 322-333.

- Shannon, T. R. (2004). *A mathematical treatment of integrated Ca dynamics within the ventricular myocyte*. *Biophys. J.* 87, 3351–3371. (doi:10.1529/biophysj.104.047449).
- Swietach, P. S.-J. (2008). *Ca²⁺ mobility in the Sarcoplasmic Reticulum of Ventricular Myocytes Is Low*.
- Tanaami T, I. H. (2005). *Difference in propagation of Ca²⁺ release in atrial and ventricular myocytes*. *Jpn J Physiol* 55: 81–91.
- Ten Tusscher, K. H. (2006). *Alternans and spiral breakup in a human ventricular tissue model*. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291, H1088–H1100. (doi:10.1152/ajpheart.00109.2006).
- Tietz, N. W. (1995). *Clinical guide to laboratory tests*, 3rd edn.
- Verdonck F, M. K. (2004). *Na⁺ in the subsarcolemmal fuzzy' space and modulation of [Ca²⁺] and contraction in cardiac myocytes*. *Cell Calcium* 35: 603–612.
- Voigt, N. T. (2009). *Cellular and molecular determinants of altered atrial Ca²⁺ signaling in patients with chronic atrial fibrillation*.
- Wagner J, K. J. (1994). *Effects of Rapid Buffers on Ca²⁺*. *Biophys J* 67: 447–456.
- Walden AP, D. K. (2009). *Differences in intracellular calcium homeostasis between atrial and ventricular myocytes*. *J Mol Cell Cardiol* 46 463–473.
- Wang Z, P. L. (1990). *Effects of flecainide and quinidine on human atrial action potentials. Role of rate-dependence and comparison with guinea pig, rabbit, and dog tissues*. *Circulation* 82: 274–283.
- Weber CR, P. V. (2002). *Na⁺-Ca²⁺ exchange current and submembrane [Ca²⁺] during the cardiac action potential*. *Circ Res* 90: 182–189.
- Winslow, R. L. (1999). *Mechanisms of altered excitation–contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure, II: model studies*. *Circ. Res.* 84, 571–586.
- Workman, A. R. (2011). *The contribution of ionic currents to changes in refractoriness of human atrial myocytes associated with chronic atrial fibrillation*. *Cardiovasc.Res.* 52, 226–235.
- Yue, L. ., (1997). *Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation*.

Zhang, H. H. (2000). *Mathematical models of action potentials in the periphery and center of the rabbit sinoatrial node*. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279, H397–H421.

RINGRAZIAMENTI

In primo luogo vorrei ringraziare i miei genitori, che mi hanno sempre sostenuto e aiutato nei momenti di difficoltà che ho incontrato durante il mio percorso di studio ; li ringrazio per la fiducia datami e per tutti i sacrifici fatti , senza i quali oggi non avrei raggiunto questo tanto atteso traguardo.

E' per me doveroso ringraziare il professore Stefano Severi e la dottoressa Elisa Passini per l'attenzione, la pazienza e la disponibilità che mi hanno sempre dimostrato durante la preparazione del presente lavoro.

Un grande ringraziamento va a mio fratello Marco, il quale ha sempre creduto in me , mi è stato vicino e mi ha fatto sorridere nei momenti più difficili . Ringrazio fortemente mia zia Lorella, che durante questi 5 anni mi ha aiutata e capita, la ringrazio per tutte le volte che mi ha fatto riflettere e per tutte quelle volte che ha creduto in me quando io pensavo di non farcela. Ringrazio i miei nonni sempre pronti a consolarmi e sempre presenti.

A te Daniele, va uno dei miei più grandi ringraziamenti; un compagno ed un amico, con me in tutti questi anni; mi hai visto piangere, urlare, stare male, e nonostante tutto sei sempre rimasto con me pronto a consolarmi a farmi ridere e scherzare. A te che grazie ad un tuo sorriso, ero pronta a ricominciare.

Non posso non ringraziare le mie due coinquiline Barbara e Concetta, insieme abbiamo affrontato un lungo percorso, abbiamo creduto di non farcela, abbiamo riso, abbiamo festeggiato, e accompagnate sempre dalla nostra frase ‘madò che ansia’ ce l'abbiamo fatta.

Vorrei dire grazie ad Ilenia e Chiara, due grandi amiche, compagne di viaggio e di sventure; a voi che ci siete sempre state, a voi che nonostante la lontananza ci ha diviso oggi siete ancora con me, a voi che quando tutto sembrava perduto avete trovato la forza di andare avanti, a voi ringrazio perché se oggi sono qui è anche merito vostro.

Vorrei ringraziare Clio, amica ed insegnante di vita, per tutti i consigli e tutte le esperienze vissute, perché sin dai tempi del liceo mi ha capita ed è così pazza da starmi ancora vicina.

Dico grazie a Mirco, un amico speciale, che in questi 5 anni di università mi ha sopportata ma anche supportata nel bene e nel male.

Un ringraziamento particolare va a te, Andrea, che sei lassù, che mi guardi dall'alto, mi consigli e mi sei vicino . Come scordarmi tutte quelle volte in cui ti divertivi a prendermi in giro perché studiavo troppo, e tutte quelle volte che mi chiamavi per chiedermi com'era andato l'esame, come scordarmi di te, della tua amicizia, del tuo esserci sempre.

Te Mel, ringrazio, perché mi hai fatto capire l'importanza della vita, il valore dell'amicizia. Ti ringrazio per aver sempre creduto in me, anche quando io stessa non ci credevo, ti ringrazio perché, anche se non potrò più vederti, sei parte di me e mi aiuti ad affrontare la vita di tutti i giorni.

Impossibile inoltre dimenticare tutti coloro, amici universitari e non, che in qualsiasi modo mi hanno aiutato in tutti questi anni, ma altrettanto impossibile risulta per me elencarli tutti: anche a voi va tutta la mia gratitudine.

Francesca Gulla'