

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITA' DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA
BIOMEDICA

**Ottimizzazione delle proprietà di
restituzione della durata del
potenziale d'azione in un modello di
cardiomiocita ventricolare umano**

Tesi in

Bioingegneria Molecolare e Cellulare LM

Relatore:

Prof. Stefano Severi

Presentata da:

Matteo Facciani

Correlatore:

Dott.ssa Elisa Passini

Sessione III

Anno Accademico 2012/2013

INDICE

INTRODUZIONE	5
CAPITOLO 1: ELETTROFISIOLOGIA DEL CUORE	6
1.1 Cenni di anatomia e fisiologia	6
1.2 Il potenziale d'azione	9
1.2.1 Potenziale di membrana a riposo	9
1.2.2 Fasi del potenziale d'azione	11
1.2.3 Eterogeneità del potenziale d'azione nelle aree cardiache	17
1.2.4 Soglia	18
1.2.5 Refrattarietà	19
1.2.6 Post-depolarizzazioni	19
1.3 Il ciclo del calcio intracellulare	21
CAPITOLO 2: MODELLISTICA MATEMATICA CARDIACA ..	24
2.1 Il modello come strumento	24
2.2 Breve storia dei modelli cardiaci	25
2.3 Il modello di Hodgkin e Huxley	28
2.4 I modelli markoviani	33
2.5 Tecniche di misurazione delle correnti di membrana	36
CAPITOLO 3: MODELLI VENTRICOLARI UMANI	39
3.1 Il modello Grandi-Pasqualini-Bers (2010).....	39
3.2 Il modello O'Hara-Rudy (2011)	45
3.3 Il modello ORk (2013)	50

CAPITOLO 4: METODI	56
4.1 Innovazioni e limiti del modello ORk	56
4.2 Il <i>calcium handling</i> nel modello ORd	61
4.3 Modifiche al modello ORk	64
4.3.1 Modifiche alla SERCA pump	64
4.3.2 Modifiche al modello dei canali RyRs	65
4.3.3 Variazioni volumetriche	67
4.3.4 Modifiche alle correnti ioniche	67
4.3.5 Dipendenza dell'APD da $[Ca^{2+}]_o$	67
CAPITOLO 5: RISULTATI	69
5.1 Il modello newORk	69
5.1.1 Il reticolo sarcoplasmatico.....	69
5.1.2 Lo scambiatore Na^+/Ca^{2+}	71
5.1.3 La corrente ICa_L	71
5.1.4 I flussi ionici J_{up} e $J_{diff,Ca}$	72
5.2 Risultati delle simulazioni	73
5.2.1 Potenziale d'azione	74
5.2.2 Transienti e flussi di Ca^{2+} intracellulari	74
5.2.3 ICa_L	77
5.2.4 Correnti di scambiatore	77
5.2.5 Dipendenza dal calcio	78
5.2.6 Altri protocolli sperimentali	80
CONCLUSIONI	86
APPENDICE: CODICE MATLAB	88
A) File dei parametri	88
B) Script del modello newORk	90
BIBLIOGRAFIA	105

INTRODUZIONE

I modelli matematici nel campo dell'elettrofisiologia cellulare sono complementari alle scoperte sperimentali da più di mezzo secolo, sia nella comprensione sia nella predizione dei meccanismi ionici alla base del funzionamento delle cellule.

A partire dal modello paradigmatico di Hodgkin & Huxley (1952, [1][2][3]) di potenziale d'azione nervoso, si sono col tempo evolute molteplici applicazioni in campo cardiaco della modellistica matematica e della simulazione numerica, con l'obiettivo di riprodurre, investigare e predire fenomeni riguardanti l'elettrofisiologia cardiaca.

Dopo una breve introduzione, volta a descrivere le principali caratteristiche anatomiche ed elettrofisiologiche del cuore, così come le potenzialità offerte dall'approccio modellistico in questo settore, l'obiettivo di questo elaborato è stato quello di modificare un modello matematico pre-esistente per migliorarne la risposta in frequenza, non riprodotta in modo coerente rispetto ai dati sperimentali presenti in letteratura.

Le modifiche sono state fatte dopo un accurato studio degli ultimi modelli pubblicati e delle loro caratteristiche, e hanno riguardato in particolare le correnti ioniche e i flussi coinvolti nella gestione del calcio intracellulare.

Nell'elaborato verranno quindi discusse le innovazioni e le limitazioni proprie del modello di partenza, così come le strategie seguite per ottenere il comportamento desiderato.

Capitolo 1

ELETTROFISIOLOGIA DEL CUORE

1.1 CENNI DI ANATOMIA E FISIOLOGIA

Il cuore è il componente principale del sistema circolatorio, la cui funzione è quella di trasportare ai tessuti ossigeno e sostanze nutritive, raccogliendo anidride carbonica che viene riportata ai polmoni e vari prodotti di metabolismo che vengono poi filtrati nei reni; inoltre svolge un ruolo importante nella regolazione della temperatura corporea e si occupa anche della distribuzione di ormoni e altri agenti che regolano le funzioni cellulari. Il portatore di tutte queste sostanze è il sangue, che grazie al cuore viene pompato attraverso un sistema chiuso di vasi [4].

Anatomicamente, il cuore è formato da 4 cavità: due superiori, gli atri e due inferiori, i ventricoli (fig 1.1). Atrio e ventricolo sinistri hanno la funzione di spingere il sangue ossigenato e ricco di sostanze nutritive attraverso arterie, arteriole ed infine capillari, per raggiungere gli organi e i tessuti periferici (circolazione sistemica). Dai capillari il sangue viene drenato e attraverso il sistema venoso ricondotto prima all'atrio poi al ventricolo destro. Da qui, tramite l'arteria polmonare, il sangue ricco di anidride carbonica raggiungerà quindi i polmoni, dove avviene lo scambio ossigeno-anidride carbonica, prima del

ritorno del sangue nel cuore sinistro tramite le vene polmonari (circolazione polmonare)[4].

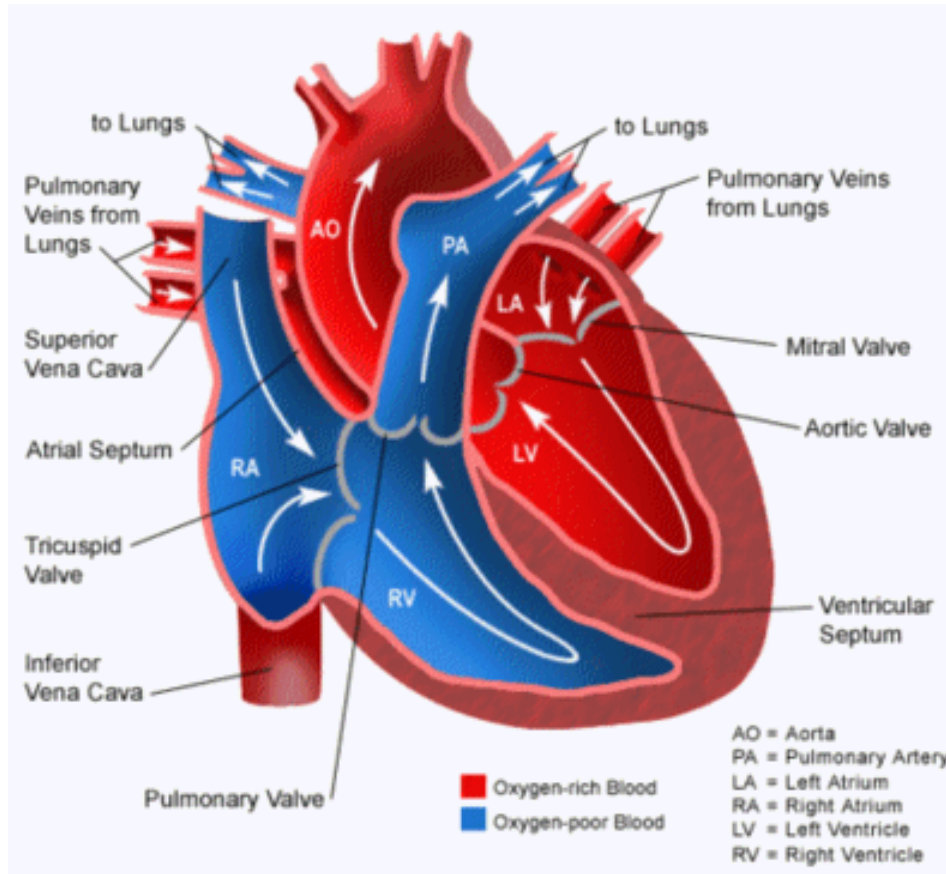


Figura 1.1: Il cuore con le sue 4 cavità e le due circolazioni (in rosso la sistemica, in blu la polmonare).

Per assicurare questo continuo trasporto il cuore necessita di una efficiente muscolatura. Il muscolo cardiaco è un muscolo striato involontario che presenta esternamente una membrana protettiva chiamata pericardio e più internamente tre strati (tonache) uno interno all'altro, che costituiscono la parete del cuore: più esternamente vi è l'epicardio che è composto da tessuto connettivo; subito sotto vi è il miocardio, formato per il 70% da fibre muscolari ordinatamente orientate in modo da permettere la

corretta contrazione; nella parte più interna del cuore si trova l'endocardio, che costituisce un rivestimento protettivo, formato da cellule endoteliali.

Dal punto di vista funzionale, il meccanismo di contrazione del cuore è simile a quello dei muscoli scheletrici, ovvero l'interazione fra filamenti delle proteine actina e miosina nei sarcomeri dei cardiomiociti produce la contrazione della muscolatura; la contrazione è inoltre strettamente legata all'attività elettrica del cuore, in quanto è la propagazione dell'impulso elettrico a produrre il rilascio del calcio (Ca^{2+}) responsabile di questo fenomeno. Le varie parti del cuore battono fisiologicamente in ordinata sequenza: prima si contraggono gli atri (sistole atriale), poi i ventricoli (sistole ventricolare); durante la diastole tutte e quattro le camere cardiache sono rilassate.

La contrazione delle cellule che costituiscono atri e ventricoli è autonoma, ma deve essere coordinata e simultanea: essa è innescata dal Potenziale d'Azione (PA), che nel cuore origina spontaneamente in un sistema di conduzione specializzato, attraverso il quale diffonde in tutte le parti del miocardio; le strutture che costituiscono questo sistema sono il nodo seno-atriale, il nodo atrio-ventricolare, il fascio di His con le sue branche destra e sinistra ed il sistema di Purkinje: la propagazione del PA segue questa via discendente, fino a raggiungere i ventricoli. In condizioni fisiologiche è il nodo seno-atriale a definire il ritmo cardiaco (pacemaker), in quanto è quello che si depolarizza a frequenza più alta, propagando lo stimolo alle altre aree prima che esse si eccitino spontaneamente [4].

1.2 IL POTENZIALE D'AZIONE

Il PA è una breve e transitoria depolarizzazione della membrana cellulare, nella quale il potenziale elettrico, a partire da una condizione di riposo molto negativa (variabile a seconda dei tipi di cellula, ma di circa -80/-90 mV), aumenta rapidamente fino a raggiungere valori positivi per poi tornare allo stato iniziale, seguendo un andamento caratteristico. I PA si verificano in molte cellule eccitabili animali (neuroni, cellule cardiache, cellule endocrine), ognuno con caratteristiche proprie di morfologia, potenziale a riposo e durata.

1.2.1 Potenziale di membrana a riposo

Il potenziale di membrana è legato alle differenti concentrazioni degli ioni sodio (Na^+), potassio (K^+) e Ca^{2+} che si muovono attraverso la membrana cellulare. La quantità netta di ioni che diffonde attraverso una membrana dipende, oltre che dalla permeabilità della stessa a quello ione, anche dalla differenza di concentrazione di quest'ultimo e dalla differenza del potenziale elettrico ai capi della membrana. Come nelle altre cellule dell'organismo, la concentrazione di K^+ all'interno della cellula muscolare cardiaca è notevolmente superiore a quella extracellulare (145 mM contro 5 mM), mentre accade il contrario per gli ioni Na^+ (10 mM contro 140 mM) e Ca^{2+} (100 nM contro 2 mM). La membrana cellulare a riposo è molto più permeabile al K^+ piuttosto che al Na^+ e Ca^{2+} : esso quindi tenderà a diffondere dall'interno all'esterno della cellula, seguendo la direzione del suo gradiente di concentrazione. Il flusso di K^+ avviene attraverso canali specifici; la membrana delle cellule cardiache contiene diversi tipi di canali del K^+ : 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 gradienti opposti che agiscono sugli ioni K^+ , facendoli muovere attraverso la membrana cellulare: uno chimico ed uno elettrostatico. L'equilibrio si raggiungerà quando le due forze saranno uguali e il potenziale di equilibrio può essere ricavato matematicamente tramite l'equazione di Nernst, che tiene in considerazione appunto le concentrazioni. Per il K^+ è di circa -95 mV, valore molto vicino al potenziale di riposo delle cellule cardiache.

In generale il potenziale di Nernst può essere calcolato, per ogni ione, con la seguente formula:

$$E_x = (R \cdot T / z \cdot F) \cdot \log([X]_i / [X]_o)$$

Dove:

R = 8.314472 è la costante universale dei gas espressa in J/mol·K

z è la valenza dell'elemento considerato

F = 96485.309 C/mol è la costante di Faraday

T è la temperatura assoluta in gradi Kelvin

$[X]_i$ è la concentrazione ionica intracellulare

$[X]_o$ è la concentrazione ionica extracellulare

E_x è definito potenziale di Nernst, potenziale di equilibrio o potenziale di inversione per la specie ionica considerata. Quando, come nel caso delle cellule cardiache, ci sono più ioni che diffondono attraverso la membrana, il potenziale di riposo misurato dipende dai potenziali di Nernst di tutti gli ioni presenti, e questo è il motivo per cui nelle cellule cardiache esso risulta di circa -82 mV.

1.2.2 Fasi del potenziale d'azione

Il PA cardiaco si può dividere in 5 fasi (fig. 1.2):

- **Fase 0:** fase di depolarizzazione rapida
- **Fase 1:** fase di ripolarizzazione precoce
- **Fase 2:** fase di plateau
- **Fase 3:** fase di ripolarizzazione finale
- **Fase 4:** ripristino della condizione di riposo e delle concentrazioni ioniche iniziali

Verranno analizzate di seguito le fasi sopraelencate, con particolare attenzione alle basi ioniche che generano il PA, le correnti che lo innescano e i canali coinvolti.

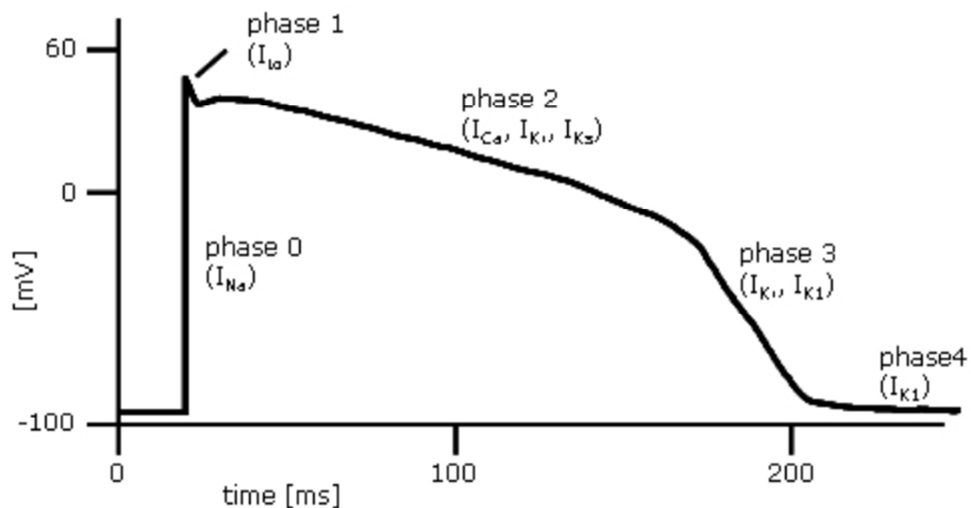


Figura 1.2: Il potenziale d'azione ventricolare e le principali correnti coinvolte in ognuna delle 5 fasi.

La depolarizzazione rapida (fase 0)

Il PA può essere generato da qualsiasi stimolo in grado di innalzare il potenziale di riposo della membrana cellulare fino ad un valore critico, definito soglia (pari a circa -65mV). La depolarizzazione rapida che ha luogo durante la fase 0 è dovuta principalmente all'entrata rapida di ioni Na^+ (fig 1.3) conseguente all'aumento della sua conduttanza e l'ampiezza della variazione di potenziale durante questa fase è proporzionale al logaritmo della concentrazione extracellulare del Na^+ [5]. L'ingresso di ioni Na^+ positivi riduce la negatività del potenziale intracellulare e provoca l'attivazione di altri canali rapidi del Na^+ , che aumentano ulteriormente la conduttanza: il risultato è un meccanismo a feedback positivo. La corrente di Na^+ è molto rapida e di ampiezza elevata: si parla per questo motivo di corrente rapida entrante. L'ingresso di Na^+ , tuttavia, si arresta dopo 1-2 ms: la ragione è che i canali di Na^+ , dopo una rapida apertura, si inattivano altrettanto velocemente e la conduttanza torna ai valori di riposo: questo stato di inattivazione è mantentuto fino alla completa ripolarizzazione.

La ripolarizzazione precoce (fase 1)

Questo breve periodo di parziale ripolarizzazione è dovuto sia all'inattivazione dei canali rapidi di Na^+ ma anche in larga parte all'apertura dei canali per il K^+ , che consentono il passaggio di una corrente transiente uscente ripolarizzante, chiamata I_{t_0} (transient outward, vedi fig. 1.3).

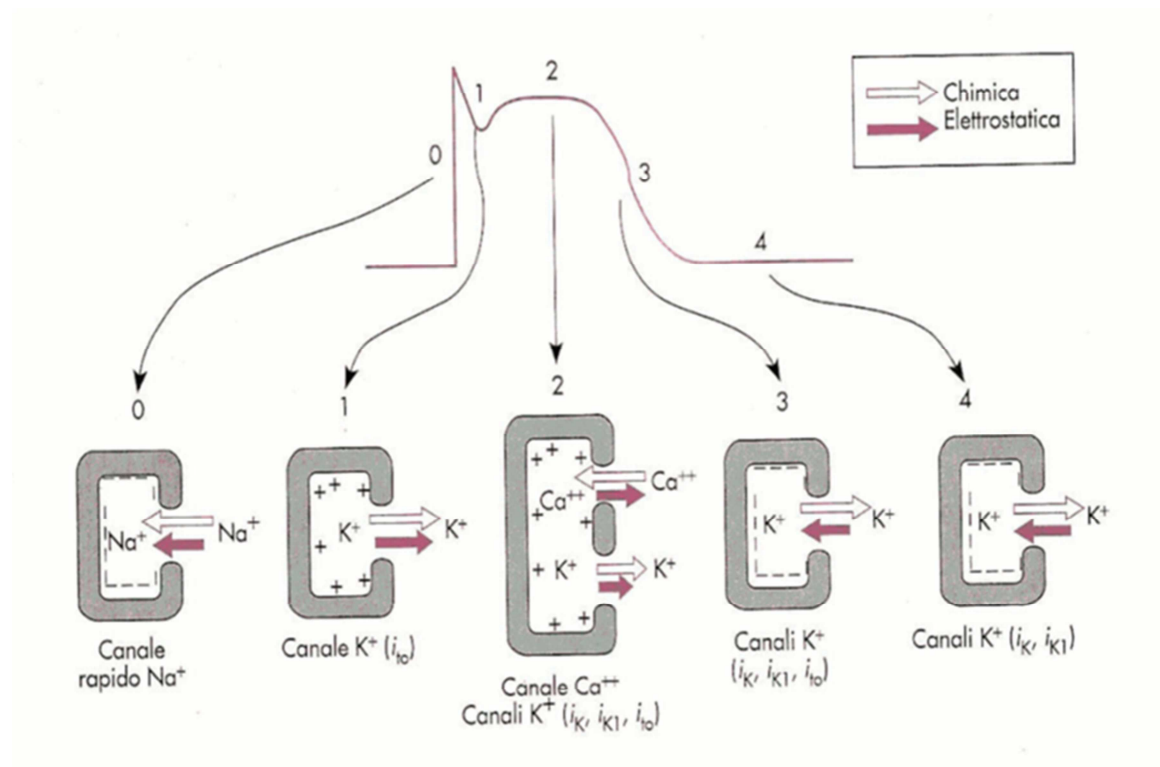


Figura 1.3: Bilancio ionico cellulare durante un potenziale d'azione [6].

Genesi del plateau (fase 2)

Peculiarità del PA cardiaco è la fase di plateau, principale responsabile della durata del PA stesso.

In questa fase entrano nella cellula ioni Ca^{2+} e questo ingresso di cariche positive è controbilanciato dall'uscita di una uguale quantità di cariche positive attraverso le correnti di K^+ (fig. 1.4).

I canali del Ca^{2+} sono voltaggio-dipendenti e si attivano durante l'ascesa del potenziale d'azione, quando si toccano potenziali meno negativi; sono definiti canali lenti e di lunga durata (Long-Lasting, L-type). L'apertura di questi canali genera un aumento della conduttanza del Ca^{2+} , che inizia subito dopo la fase 0 del potenziale; poiché la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} è molto inferiore alla concentrazione extracellulare, l'aumento di conduttanza

favorisce una corrente di Ca^{2+} entrante nella cellula per tutta la durata del plateau, corrente chiamata ICa_L .

Durante il plateau la sinergia di forze chimiche ed elettrostatiche favorisce l'uscita di K^+ dalla cellula, in concomitanza di un valore di potenziale di membrana V_m positivo che porta ad una rapida riduzione della conduttanza della membrana a questo ione; questo fattore impedisce una perdita eccessiva di K^+ durante la fase di plateau ed è chiamato rettificazione in ingresso, caratteristica della corrente ionica IK_1 . Nel dettaglio il termine rettificante indica che lo stato di apertura o chiusura del canale dipende da V_m , e pertanto la relazione apertura-voltaggio è non lineare; nel caso della corrente IK_1 , questo si traduce in variazioni e valori della conduttanza più elevati per potenziali inferiori al potenziale di inversione per il K^+ (cioè quando impone una corrente entrante), ed in valori più piccoli quando il potenziale ne è superiore. Un altro fattore che contribuisce a rendere bassa la conduttanza di membrana al K^+ durante la fase di plateau è la rettificazione ritardata, caratteristica di altri canali del K^+ responsabili delle correnti IK_r e IK_s (rapid e slow, ovvero rispettivamente rapida e lenta, nel senso di velocità di apertura dei canali), le quali contribuiscono a formare la corrente rettificante ritardata IK . Questi canali si attivano verso la fine della fase 0, ma data la loro cinetica molto lenta si chiudono soltanto durante la fase 4. L'attivazione di questi canali tende quindi ad incrementare la conduttanza della membrana al K^+ lentamente ed in misura lieve durante la fase di plateau, per poi contribuire al processo di ripolarizzazione finale [5].

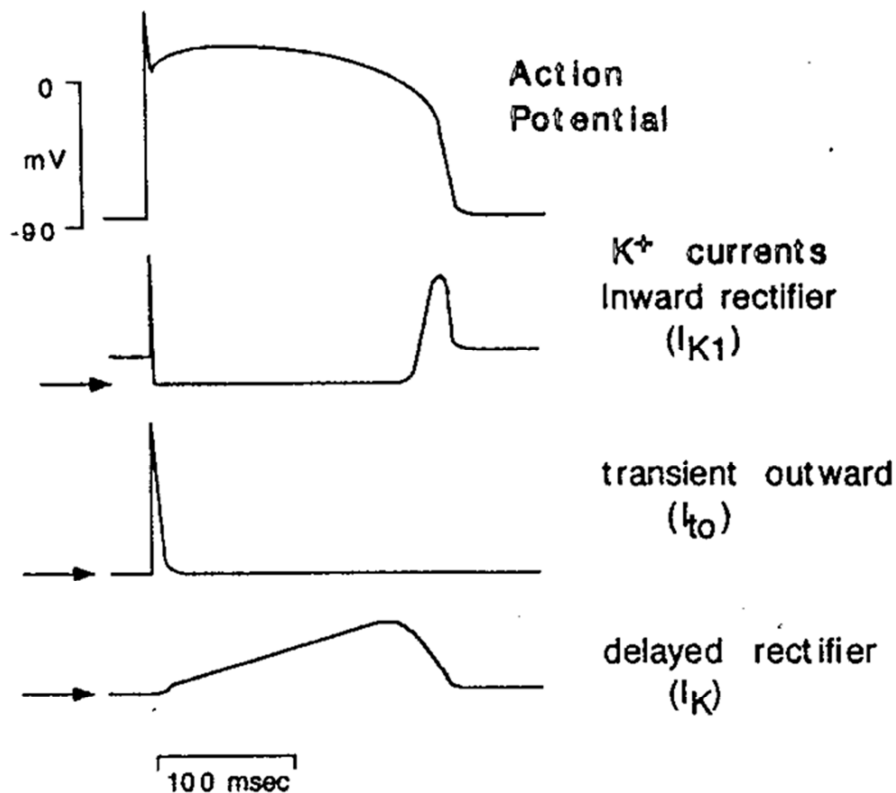


Figura 1.4: Correnti del potassio agenti durante un potenziale d'azione.

La ripolarizzazione finale (fase 3)

Quando la fuoriuscita di ioni K^+ dalla cellula tende a superare il flusso entrante di ioni Ca^{2+} la fase di plateau giunge al termine e ha inizio il processo di ripolarizzazione della membrana: questi flussi inversi sono dovuti all'incremento della conduttanza di K^+ (g_K) e specularmente alla riduzione della conduttanza di Ca^{2+} (g_{Ca}); lo sbilanciamento di queste due conduttanze causa un uscita di K^+ dalla cellula, non più compensato dalle correnti entranti di Na^+ e Ca^{2+} , per cui l'interno della membrana diventa sempre più elettronegativo. L'aumento di g_K è voltaggio-dipendente, per cui la progressiva diminuzione di V_m incrementa la conduttanza e conseguentemente il flusso uscente di ioni K^+ , seguendo un processo autosostenuto a feedback positivo. Questo efflusso di ioni K^+ riporta rapidamente il potenziale di membrana ai livelli di riposo:

in questo processo sono fondamentali le correnti rettificanti IK_1 ed IK illustrate in precedenza.

Ripristino delle concentrazioni ioniche (fase 4)

Nella fase finale del ciclo sono presenti principalmente due meccanismi che favoriscono il ripristino delle condizioni iniziali di V_m .

Il primo è la pompa Na^+/K^+ , che espelle l'eccesso di Na^+ entrato nella cellula e contemporaneamente trasporta all'interno il K^+ uscito durante le fasi 2 e 3; nel dettaglio, la pompa Na^+/K^+ trasporta fuori tre ioni Na^+ in cambio di due ioni K^+ . Questo meccanismo genera una corrente netta uscente che contribuisce al mantenimento del potenziale di riposo: anche se in condizioni fisiologiche piccola, questa corrente ripolarizzante aumenta quando la cellula è sovraccarica di Na^+ , ad esempio nel caso di frequenza cardiaca accelerata.

L'altra pompa ionica di ripristino è lo scambiatore Na^+/Ca^{2+} , che sposta uno ione Ca^{2+} all'esterno della cellula e tre ioni Na^+ all'interno, sostenendo una piccola corrente uscente durante la sistole ed entrante durante la diastole.

1.2.3 Eterogeneità del potenziale d'azione nelle aree cardiache

All'interno del cuore, il PA è diverso a seconda del tipo di cellule considerate (fig. 1.5):

- le cellule pacemaker del nodo seno-atriale e le cellule del nodo atrio-ventricolare presentano risposte lente e non hanno un vero e proprio potenziale di riposo. Tra un PA ed un altro si registra una progressiva depolarizzazione della cellula partendo da un valore di circa -65 mV; la depolarizzazione prosegue verso lo zero, come se dovesse raggiungere un potenziale di riposo, ma prima che si possa stabilizzare raggiunge il potenziale soglia (-50 mV), dopo il quale riparte il picco del PA.
- Le cellule del fascio di His e delle fibre di Purkinje presentano un PA a risposta rapida ampio e di lunga durata (circa 300 ms).
- Le fibre muscolari atriali e ventricolari presentano delle risposte di tipo rapido, anche se di durata diversa: negli atri la durata è relativamente breve e la salita, la ripolarizzazione e il plateau veloci; Il PA ventricolare invece è simile a quello delle fibre del Purkinje, di minore ampiezza ma comunque più grande rispetto a quello degli atri. L'ampiezza del PA è di circa 105 mV, il che porta ad avere un picco (spike) del potenziale di circa 20 mV e il potenziale a riposo è di circa -90 mV.

Inoltre le durate dei PA differiscono nei diversi strati della parete ventricolare: nello specifico il PA è più lungo nel miocardio, un più corto nell'endocardio e ancora più breve nell'epicardio. Questa eterogeneità è principalmente

dovuta al differente contributo delle due correnti di potassio I_{to} e IK_s .

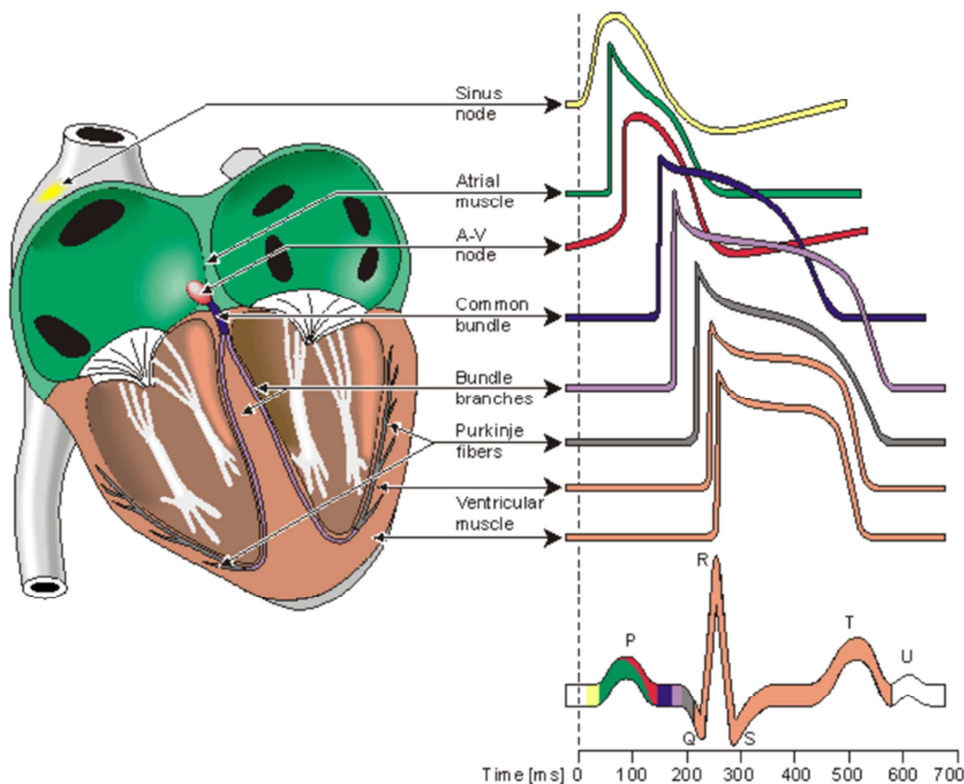


Figura 1.5: Andamento del PA nella varie regioni del cuore e corrispondenze nel tracciato elettrocardiografico.

1.2.4 Soglia

La propagazione del PA è di tipo rigenerativo, ovvero la depolarizzazione di una cellula si propaga a quelle vicine a riposo, scatenando un nuovo PA. Affinché uno stimolo sia in grado di propagarsi, tuttavia, la depolarizzazione deve raggiungere un valore soglia: piccole depolarizzazioni sottosoglia causano soltanto risposte locali, consentendo l'apertura solo di una modesta quantità di canali Na^+ voltaggio-dipendenti, insufficiente a generare il PA. D'altra parte, una volta raggiunta la soglia, la successiva depolarizzazione non dipende più dall'entità dello stimolo iniziale.

1.2.5 Refrattarietà

Il PA può essere registrato sperimentalmente eccitando la membrana con un impulso di corrente e misurando le conseguenti variazioni di potenziale; se lo stimolo applicato causa una depolarizzazione che supera il valore di soglia si ha la generazione del PA. Una volta che questo si è espresso si ha un intervallo di tempo durante il quale non è possibile scatenare un nuovo PA qualunque sia lo stimolo applicato, il periodo refrattario assoluto; questo intervallo parte dalla fase 0 e dura fino alla fase 3 in cui i canali rapidi del Na^+ si riattivano. A questo intervallo segue il periodo refrattario relativo, in cui è possibile generare un nuovo PA ma solo applicando uno stimolo più intenso, perché il valore di soglia risulta maggiore rispetto a quello a riposo; le risposte che si hanno durante questo periodo sono comunque lente e di ampiezza non elevata, perché la conduzione è più lenta. Progressivamente se lo stimolo viene applicato successivamente al periodo refrattario relativo la depolarizzazione acquista ampiezza e velocità, in modo proporzionale al recupero di un sempre maggior numero di canali per il Na^+ .

1.2.6 Post-depolarizzazioni

Le post-depolarizzazioni (After-Depolarizations, ADs) sono depolarizzazioni anomale dei miociti che possono presentarsi durante la fase 2, la fase 3 o la fase 4 del PA cardiaco; la loro insorgenza non dipende da stimoli esterni ma da cause patologiche. Le ADs possono generare due comportamenti distinti: quando la depolarizzazione non raggiunge un'ampiezza tale da superare il valore di soglia, si hanno piccole oscillazioni del potenziale di membrana; quando invece la depolarizzazione è sufficientemente ampia, si

innesca un nuovo PA, denominato Triggered Activity (TA), che necessita di un innesco (trigger) ovvero una depolarizzazione prematura a monte. Questi PA propagati sono di particolare interesse clinico poiché possono causare pericolose aritmie cardiache.

Le ADs si differenziano in:

- Post-depolarizzazioni precoci (Early After-Depolarizations o **EADs**), che insorgono durante le fasi 2 e 3 del PA (plateau e ripolarizzazione). Dal punto di vista elettrofisiologico possono essere causate da una riattivazione della corrente di Ca^{2+} ICa_L e/o dal rilascio spontaneo di Ca^{2+} da parte del reticolo sarcoplasmatico (nella fase 2 di plateau) o indotte dalla diminuzione della conduttanza del K^+ , con conseguente riduzione dell'intensità della corrente IK_1 (nella fase 3 di ripolarizzazione). L'ipokaliemia, ovvero la carenza di K^+ nel sangue, e la bradicardia favoriscono l'insorgenza delle EADs, le quali possono causare una seria patologia, la sindrome del QT lungo: in questa sindrome la durata del PA è superiore a quella fisiologica e l'aumento della stimolazione adrenergica (durante l'attività sportiva o in risposta ad un forte stimolo emotivo) può portare al manifestarsi delle EADs, a causa dell'amplificarsi della corrente entrante ICa_L ; tale aritmia può condurre alla fibrillazione ventricolare, che senza un adeguato intervento medico causa il decesso.
- Post-depolarizzazioni tardive (Delayed After-Depolarizations, **DADs**) si generano in prossimità del potenziale di riposo (fase 4 del PA), quando la ripolarizzazione è completa. Sono espressione del sovraccarico di Ca^{2+} nel miocita, generalmente dovuto

al precedente PA, che genera correnti anomale depolarizzanti. Le DADs possono dar luogo all'insorgenza di impulsi quando viene raggiunto il potenziale di soglia, generando un'extrasistole, un battito prematuro o una scarica di impulsi; possono essere causate da catecolamine e digitalici (farmaci cardiotonici) e vengono favorite dalla tachicardia.

1.2 IL CICLO DEL CALCIO INTRACELLULARE

La concentrazione intracellulare di Ca^{2+} ha un ruolo predominante per le cellule cardiache poiché è proprio questo ione a garantire la funzione contrattile del cardiomiocita attraverso l'accoppiamento eccitazione-contrazione, in maniera non dissimile a ciò che avviene nei muscoli scheletrici.

Quando un PA proveniente da una cellula adiacente si propaga nella membrana di una cellula a riposo, questo causa l'apertura di canali voltaggio-dipendenti per il Ca^{2+} presenti nel sistema T di tubuli trasversali (fig. 1.7), ovvero i canali L-type; l'apertura di questi canali determina il rilascio di Ca^{2+} in un ambiente ristretto del citoplasma in cui sarcolemma e reticolo sarcoplasmatico (SR) sono estremamente vicini, chiamato spazio diadico: qui il Ca^{2+} si lega ai recettori della Rianodina (RyRs), particolari molecole presenti nella membrana del SR, innescando un ulteriore rilascio di Ca^{2+} dalle cisterne terminali del SR dove è immagazzinato verso il citoplasma (fig. 1.8): questo meccanismo è denominato rilascio di calcio indotto dal calcio stesso (Calcium-Induced Calcium Release, CICR).

Il sistema possiede un alto guadagno, poiché il Ca^{2+} rilasciato dal SR è in concentrazione notevolmente maggiore rispetto a quello fluito nello spazio diadico tramite i canali L-type.

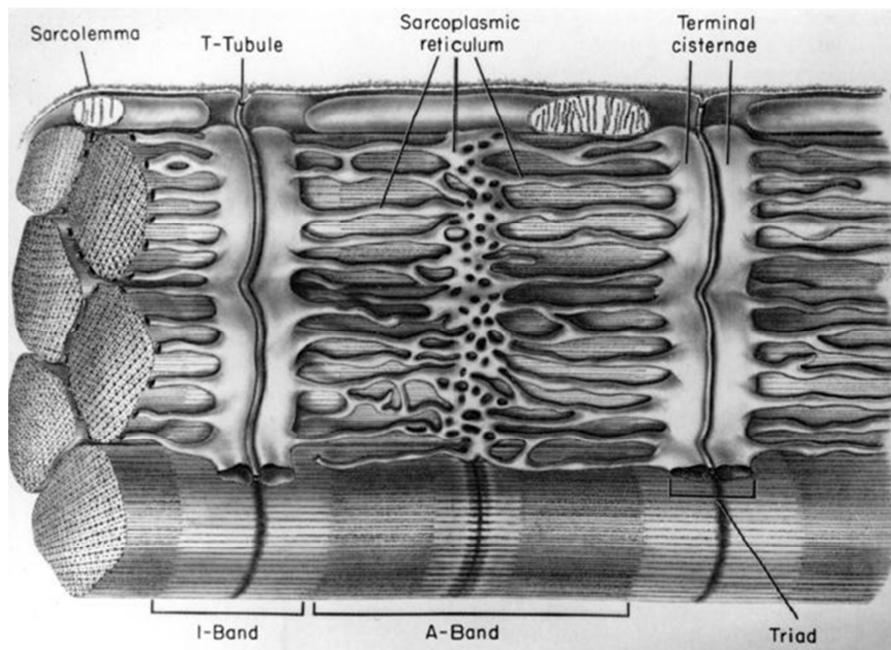


Figura 1.7: Sezione di muscolo di mammifero, in cui si possono notare alcune strutture coinvolte nel ciclo del Ca^{2+} intracellulare.

In seguito il Ca^{2+} agisce attivamente nell'interazione dei filamenti di actina-miosina; queste due proteine delle cellule muscolari scorrendo l'una sull'altra causano la contrazione in seguito al loro legame con la troponina, una proteina anch'essa coinvolta nell'accoppiamento eccitazione-contrazione. Successivamente allo scorrimento dei filamenti sottili di actina sui filamenti spessi di miosina, con conseguente accorciamento del sarcomero, si ha il riaccumulo di Ca^{2+} all'interno del SR mediante trasporto attivo ad opera della pompa Ca^{2+} -ATPasi; il Ca^{2+} quindi diffonde nelle cisterne, dove viene immagazzinato fino all'arrivo di un

nuovo PA. Non appena la concentrazione di Ca^{2+} all'esterno del reticolo si è sufficientemente abbassata, l'interazione chimica fra actina e miosina cessa e il muscolo si rilassa (fase di diastole)[4].

Il Ca^{2+} ancora presente in eccesso nel citoplasma viene estruso dalla cellula mediante particolari trasportatori, tra cui la pompa $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$, che scambia uno ione Ca^{2+} con tre di Na^+ , e la pompa Ca^{2+} -ATPasi; infine la concentrazione di Na^+ verrà ripristinata tramite lo scambiatore Na^+/K^+ -ATPasi, che espelle dalla cellula tre molecole di Na^+ e pompa all'interno due molecole di K^+ : si ha così il ripristino delle concentrazioni ioniche iniziali, fino all'arrivo di un nuovo PA che riavvia il ciclo.

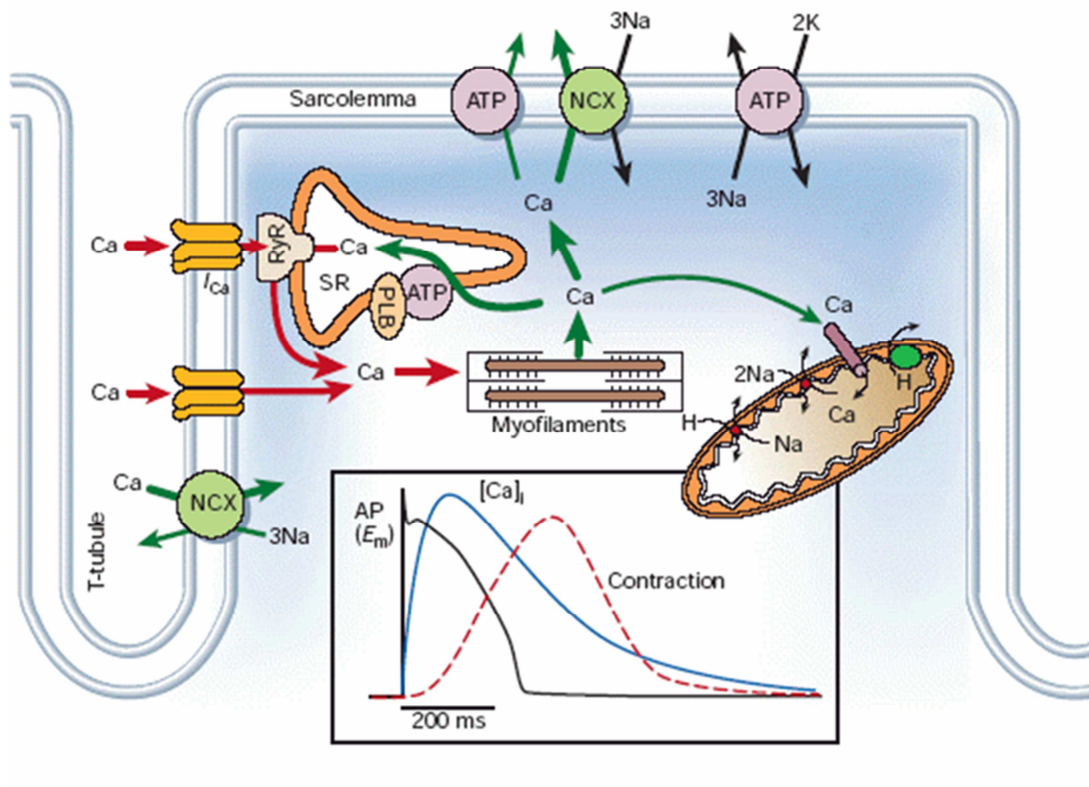


Figura 1.8: Schema del ciclo del calcio in un miocita. In basso sono riportati gli andamenti del PA, del transiente di Ca^{2+} intracellulare e della contrazione (Bers, 2002 [7]).

Capitolo 2

MODELLISTICA MATEMATICA CARDIACA

2.1 IL MODELLO COME STRUMENTO

Un modello è una rappresentazione approssimata di un sistema reale; tale approccio è utilizzato in vari ambiti (fisica, matematica, economia, ingegneria, ecc...) per definire, esplorare, capire, simulare, predire, progettare o comunicare aspetti di un sistema già esistente, alla luce di precisi riscontri concreti ottenuti a partire da un metodo che ne confermi la controllabilità.

Solitamente i modelli risultano più facili da studiare rispetto al sistema a cui si riferiscono: ad esempio è semplice implementare cambiamenti nella struttura di un modello per isolarne uno dei componenti, oppure integrare dati sperimentali ottenuti separatamente. Inoltre un modello è "trasparente", ovvero osservabile dall'esterno, pregio rilevante laddove l'oggetto di studio non sia direttamente accessibile.

Allo stesso tempo, però, è importante tenere presente che la capacità di previsione di qualsiasi modello è limitata, poiché alcuni processi potrebbero essere stati trascurati o descritti

in maniera incompleta; è quindi di grande rilevanza la validazione del modello tramite il confronto con risultati sperimentali ottenuti *in vivo* ed *in vitro*.

L'incapacità di un modello di riprodurre fenomeni osservati empiricamente, quindi, indica la presenza di lacune nella progettazione del sistema stesso; ciò può essere tenuto in considerazione per successive prove sperimentali, in modo da ottenere nuovi dati utilizzabili per aggiornare il modello in esame e fare ulteriori previsioni.

Nell'ambito dell'elettrofisiologia cardiaca i modelli matematici costituiscono uno strumento importante, in quanto possono aiutare a chiarire i meccanismi ionici alla base dei fenomeni osservati, soprattutto perché spesso le misure sperimentali non sono disponibili. Inoltre, una volta validato, un modello può diventare utile per effettuare previsioni quantitative e guidare futuri esperimenti.

2.2 BREVE STORIA DEI MODELLI CARDIACI

Noble negli anni '60 del secolo scorso fu tra i primi a realizzare un modello di cellula cardiaca [8], adattando ai miociti la descrizione delle correnti di Na^+ e K^+ proposta da Hodgkin e Huxley [2][3][1] a livello nervoso e riuscendo così a riprodurre il lungo plateau del potenziale d'azione (PA) nelle fibre di Purkinje.

Tuttavia fino agli anni '80 non si aveva una descrizione soddisfacente delle cinetiche ioniche, in particolare dell'ione Ca^{2+} ; il modello di Di Francesco-Noble (1985, [9]) è il

primo a chiarire i meccanismi di pacemaking e a introdurre pompe e scambiatori (fig. 2.1) per descrivere in maniera più esaustiva le concentrazioni ioniche durante l'attività elettrica del cuore.

I modelli cardiaci in principio erano concepiti su cellule animali ed avevano una caratterizzazione molto generale; di pari passo con la disponibilità di dati sperimentali hanno acquisito negli anni complessità e specificità, divenendo sempre più esaustivi.

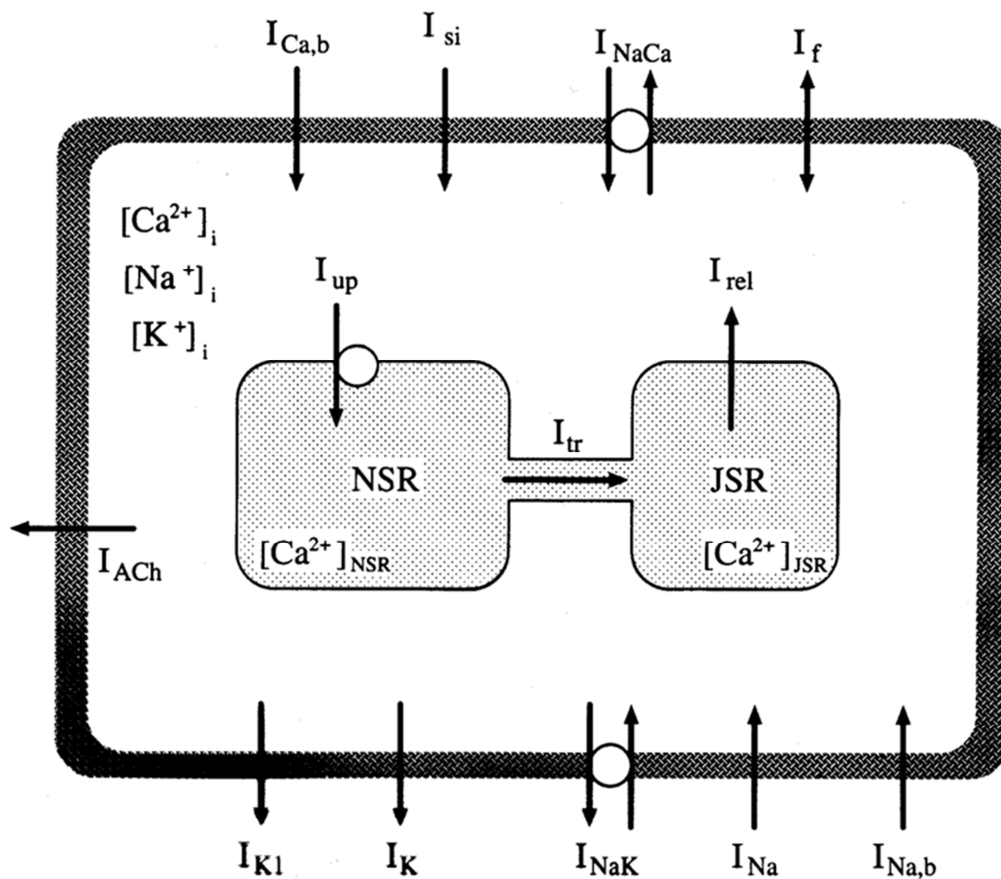


Figura 2.1: Il modello di Di Francesco-Noble (1985, [9]).

Il modello di Priebe-Beuckelmann [10] è il primo a rappresentare il PA ventricolare umano; a partire da questo nell'ultima decade i modelli cardiaci umani hanno acquistato sempre più dettagli e caratteristiche (Shannon 2004 [11], Ten Tusscher-Panfilov 2006 [12]), con ulteriori modifiche strutturali al miocita, come ad esempio l'inserimento di compartimenti intracellulari nel SR, una maggiore differenziazione e caratterizzazione dei flussi ionici ed una eterogeneità delle cellule stesse a seconda delle regioni cardiache (cellule epicardiche, miocardiche, endocardiche), fino a giungere ai modelli oggetto di studio di questo elaborato. Questa progressiva introduzione di dettagli anatomici ha portato verso la creazione di un vero e proprio "cuore virtuale" (*in silico heart*), e dopo anni di interazione tra simulazione e sperimentazione i modelli cardiaci hanno raggiunto un livello di accuratezza tale da permettere l'inizio del loro utilizzo nell'ambito della sperimentazione farmacologica.

In questa tesi sono stati analizzati tre modelli cardiaci di ultima generazione: il Grandi-Pasqualini-Bers (2010 [13]), l'O'Hara-Rudy (2011 [14]) e la versione di quest'ultimo ottimizzata da Passini e Severi (2013 [15]), che verranno descritti in dettaglio nel Capitolo 3. Matematicamente questi modelli sono rappresentati da equazioni differenziali che descrivono le variabili di stato caratterizzanti il sistema progettato, quali ad esempio le concentrazioni di Ca^{2+} intracellulari, i flussi ionici, le correnti di membrana, i rateo di transizione dei canali ionici; in particolare l'apertura e la chiusura di tali canali è governata da variabili di *gating* che possono essere espresse secondo la concezione di Hodgkin e Huxley o attraverso i modelli

markoviani. Queste due di distinte formulazioni verranno descritte nei prossimi paragrafi.

2.3 IL MODELLO DI HODGKIN E HUXLEY

Tutti i modelli cardiaci possono essere fatti risalire a quello ideato da Hodgkin e Huxley (HeH, 1952 [2][3][1]), i quali grazie ad esperimenti effettuati su assoni giganti di calamaro fornirono una completa descrizione quantitativa delle variazioni di permeabilità della membrana a Na^+ e K^+ . Il lavoro di HeH costituisce il primo modello matematico in grado di riprodurre la depolarizzazione della membrana cellulare e rappresenta una pietra miliare che valse ai suoi ideatori il Premio Nobel per la Medicina nel 1963.

Secondo HeH, in termini di analogo elettrico (fig. 2.2, [1]) la membrana cellulare equivale al parallelo tra una capacità C_m e dei rami conduttivi, ove il flusso ionico avviene in funzione del potenziale di membrana V_m ; tali rami sono caratterizzati da conduttanze varianti nel tempo e con valore dipendente dal potenziale ai capi della membrana.

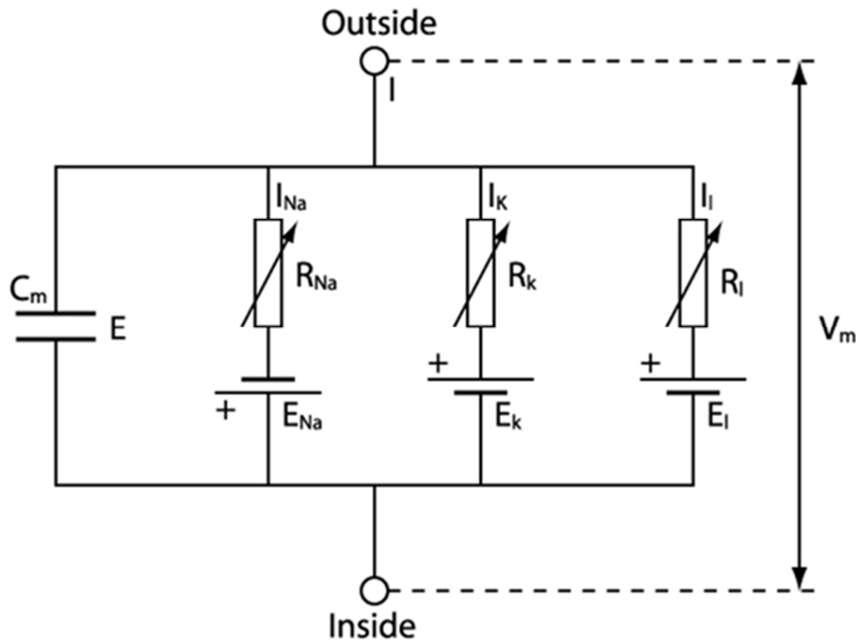


Figura 2.2: *Equivalente elettrico del modello di Hodgkin-Huxley. $R_{Na}=1/g_{Na}$, $R_K=1/g_K$, $R_l=1/g_l$, dove g_{Na} , g_K e g_l sono rispettivamente le conduttanze di sodio, potassio e la conduttanza di leakage (perdita). R_{Na} e R_K variano con il tempo e con il potenziale di membrana, le altre componenti rimangono costanti.*

La tecnica di modellazione di HeH supponeva che il passaggio degli ioni attraverso la membrana permeabile fosse governato da meccanismi in base ai quali entità distinte (*gates*) regolavano in modo diverso i flussi di Na^+ e K^+ , funzionando da "cancelli" per l'ingresso degli ioni.

Per la corrente di K^+ la condizione del gate definiva due stati funzionali: uno corrispondente allo stato di apertura ed uno corrispondente allo stato di chiusura, mentre per la corrente di Na^+ la condizione di due gates definiva tre diversi stati funzionali: uno stato chiuso, uno stato aperto e uno stato refrattario (inattivato).

Nel modello le conduttanze di K^+ e Na^+ sono espresse dalle seguenti equazioni:

$$g_K = g_{Kmax} \cdot n^4$$

$$g_{Na} = g_{Namax} \cdot m^3 \cdot h$$

dove g_{Kmax} e g_{Namax} sono le conduttanze massime (valori costanti) mentre $n(t)$, $m(t)$ e $h(t)$ sono delle variabili adimensionali rappresentanti la 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 mentre m e h sono chiamati, rispettivamente, fattore di attivazione e di inattivazione della conduttanza g_{Na} . Tali espressioni per queste conduttanze sono state ricavate da HeH tramite esperimenti in voltage-clamp (vedi paragrafo 2.5) in seguito ai quali, applicando un corretto *data fitting* ai risultati, i due scienziati furono in grado di determinare le variabili di gating (elevate alle opportune potenze) ed i ratei di transizione ad esse associati che meglio riproducevano le dinamiche delle conduttanze in relazione all'andamento dei dati sperimentali.

Prendendo in esame la variabile n , la sua cinetica può essere espressa dalla seguente equazione differenziale:

$$dn/dt = \alpha_n \cdot (1 - n) - \beta_n \cdot n$$

Ragionando sul singolo canale, n esprime la probabilità che un canale del K^+ sia nello stato di apertura, per cui il suo valore sarà compreso tra 0 e 1; analogamente $1-n$ rappresenterà la probabilità che un canale sia nello stato di chiusura. Se

prendiamo in esame la totalità dei canali, n esprime la frazione di canali aperti rispetto al numero complessivo. α_n e β_n variano con il potenziale di membrana V_m e rappresentano i ratei (ovvero le velocità) di transizione dallo stato chiuso ad aperto (α_n) e dallo stato aperto a chiuso (β_n).

Similmente per le altre variabili adimensionali abbiamo:

$$dm/dt = \alpha_m \cdot (1 - m) - \beta_m \cdot m$$

$$dh/dt = \alpha_h \cdot (1 - h) - \beta_h \cdot h$$

Utilizzando i ratei di transizione è possibile ricavare l'espressione a regime per le variabili di gating e le relative costanti di tempo (di apertura o di chiusura a seconda della variabile); prendendo in esame n si può scrivere:

$$\tau_n \cdot dn/dt = n_{SS} - n$$

Dove $\tau_n = 1/(\alpha_n + \beta_n)$ è la costante di tempo di apertura dei gates di n e $n_{SS} = \alpha_n/(\alpha_n + \beta_n)$ è il valore in steady-state (a regime) della variabile.

Una volta determinate le conduttanze è possibile ricavare le espressioni delle correnti ioniche; per il K^+ si ha:

$$I_K = g_K \cdot (V_m - E_K)$$

Dove il fattore tra parentesi rappresenta la *driving force*, ovvero la differenza tra il potenziale di membrana e il potenziale di Nernst del K^+ .

L'equazione differenziale che descrive l'analogo elettrico del modello somma i contributi di tutte le correnti ioniche:

$$C_m \cdot dV_m/dt + g_K \cdot (V_m - E_K) + g_{Na} \cdot (V_m - E_{Na}) + g_L \cdot (V_m - E_L) = I$$

g_L ed E_L rappresentano rispettivamente la conduttanza di *leakage* (perdita) e il corrispondente potenziale di inversione.

Integrando in un unico sistema le loro descrizioni delle correnti di Na^+ e K^+ , HeH furono in grado di riprodurre il PA e di spiegare come l'interazione fra queste due correnti portasse alla sua generazione.

Una caratteristica peculiare di questo modello sono le variabili di gating per le conduttanze, qui assunte indipendenti tra loro; tuttavia particolari comportamenti dei canali ionici hanno richiesto l'utilizzo di una descrizione della loro cinetica alternativa a quella di proposta da HeH, che fosse in grado di esprimere la dipendenza di una data transizione dall'occupazione di differenti stati del canale. I modelli che si avvalgono di tale concezione verranno illustrati nel prossimo paragrafo.

2.4 I MODELLI MARKOVIANI

In generale un processo stocastico markoviano è un processo aleatorio nel quale la probabilità di transizione che determina il passaggio ad uno stato del sistema dipende unicamente dallo stato immediatamente precedente e non dal come si è giunti a tale stato.

Nell'ambito dell'elettrofisiologia cellulare i modelli markoviani sono diagrammi i cui stati rappresentano delle conformazioni dei canali ionici sperimentalmente caratterizzate (aperto, chiuso, inattivato); questi modelli forniscono un'astrazione delle interazioni molecolari che avvengono nei canali e che spesso dipendono dalla loro stessa configurazione.

Questa descrizione della cinetica dei canali ionici è alternativa a quella fornita da HeH, che risultava incapace di riprodurre particolari comportamenti dei canali cellulari. Un esempio dell'utilizzo dei modelli markoviani in ambito cardiaco è quello concepito da Shannon *et al.* [11] per caratterizzare i recettori della Rianodina (fig. 2.3).

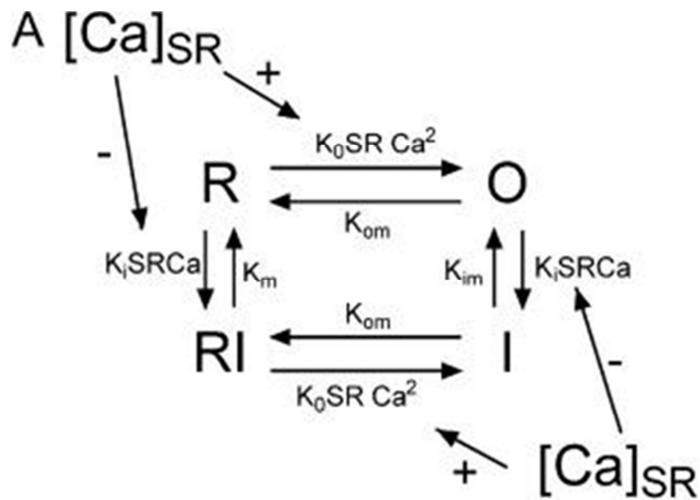


Figura 2.3: Il modello markoviano del recettore della Rianodina di Shannon et al. (2004, [11]).

Come si può vedere dalla figura 2.3 questo modello markoviano è costituito da quattro stati: O, R, I, RI.

O rappresenta lo stato aperto, R quello di riposo, I quello inattivato e RI riposo inattivato; inoltre in ogni passaggio di stato abbiamo due ratei (velocità) di transizione, uno diretto ed uno inverso.

Dalla figura si nota come le transizioni dipendano dalle concentrazioni di Ca^{2+} intracellulare, in particolare nel SR (Ca_{SR}) e nel junctional cleft (Ca_{jct}), ovvero il piccolo spazio fra la membrana del sarcolemma ed il SR. Ne consegue che la quantità di corrente passante dipende in ogni istante dal numero di canali che sono nello stato aperto. Un tale approccio suggerisce come la struttura e le transizioni di un determinato canale ionico governino il suo comportamento e il suo intervento nella propagazione del PA.

Come accennato nel paragrafo precedente, il formalismo di HeH ipotizza l'indipendenza delle variabili di gating; tuttavia i

risultati sperimentali hanno dimostrato che i processi di attivazione ed inattivazione dei canali ionici tipicamente non sono svincolati, ma accoppiati: pertanto, le transizioni fra stati sono correlate fra loro e l'ipotesi di gating indipendenti ipotizzata da HeH non può essere applicata.

Nel modello markoviano di Shannon il sistema che descrive le configurazioni degli stati dei recettori della Rianodina è il seguente:

$$dR/dt = (k_{im} \cdot RI - k_{iSRCa} \cdot [Ca]_{jct} \cdot R) - (k_{oSRCa} \cdot [Ca]_{jct}^2 \cdot R - k_{om} \cdot O)$$

$$dO/dt = (k_{oSRCa} \cdot [Ca]_{jct}^2 \cdot R - k_{om} \cdot O) - (k_{iSRCa} \cdot [Ca]_{jct} \cdot O - k_{im} \cdot I)$$

$$dI/dt = (k_{iSRCa} \cdot [Ca]_{jct} \cdot O - k_{im} \cdot I) - (k_{om} \cdot I - k_{oSRCa} \cdot [Ca]_{jct}^2 \cdot RI)$$

$$RI = 1 - R - O - I$$

Il sistema è formato da 3 equazioni differenziali che determinano l'occupazione del canale ionico in uno stato più una quarta configurazione ricavabile come somma algebrica delle altre tre, sotto il vincolo che la somma totale degli stati sia 1, valore che indica la probabilità massima di un canale di trovarsi in una particolare conformazione.

Gli stati descritti dalle equazioni differenziali sono calcolabili analogamente ai bilanci delle reazioni chimiche, quindi seguendo lo schema di fig. 2.3 le transizioni entranti in un determinato stato avranno segno positivo, quelle uscenti segno negativo: il risultato dell'equazione determinerà l'occupazione del canale ionico nella condizione in esame.

In base a queste caratteristiche la densità di corrente di uno ione x attraverso un insieme di canali di questo tipo può essere descritta mediante la seguente equazione:

$$I_x = g_x \cdot n \cdot O \cdot (V_m - E_x)$$

g_x è la conduttanza del singolo canale, n è il numero di canali per unità d'area della membrana, O è la probabilità che un canale occupi lo stato aperto e $(V_m - E_x)$ è la driving force dello ione in esame.

La corrente descritta da questa equazione è il risultato del flusso ionico passante per la popolazione di canali che si trova nello stato aperto, con una probabilità che dipende dal tempo e dal potenziale. Questo tipo di formulazione, relativo ad una singola corrente, può essere facilmente incorporato in un modello di PA cardiaco ed esteso a più categorie di canali, come risulterà evidente nei modelli cardiaci descritti nei capitoli successivi.

2.5 TECNICHE DI MISURAZIONE DELLE CORRENTI DI MEMBRANA

Per la costruzione e la validazione dei modelli cardiaci è di massima importanza l'utilizzo dei dati sperimentali riguardanti le singole correnti ioniche che attraversano la membrana cellulare, come conseguenza dell'apertura o chiusura dei corrispettivi canali; tale conoscenza permette una adeguata e più precisa progettazione del modello cellulare che si vuole ottenere.

Il più comune test utilizzato per effettuare tali misure è il voltage-clamp (blocco di voltaggio, fig. 2.4), che permette di controllare dall'esterno il potenziale di membrana tramite la sollecitazione con gradini di tensione costante (impulsi ad onda quadra), consentendo la misurazione della corrente che fluisce in risposta a tali stimoli, in modo speculare al metodo utilizzato per la misurazione del potenziale di membrana (ovvero il current-clamp, in cui si eccita la membrana con gradini di corrente costante e si osserva l'andamento del potenziale).

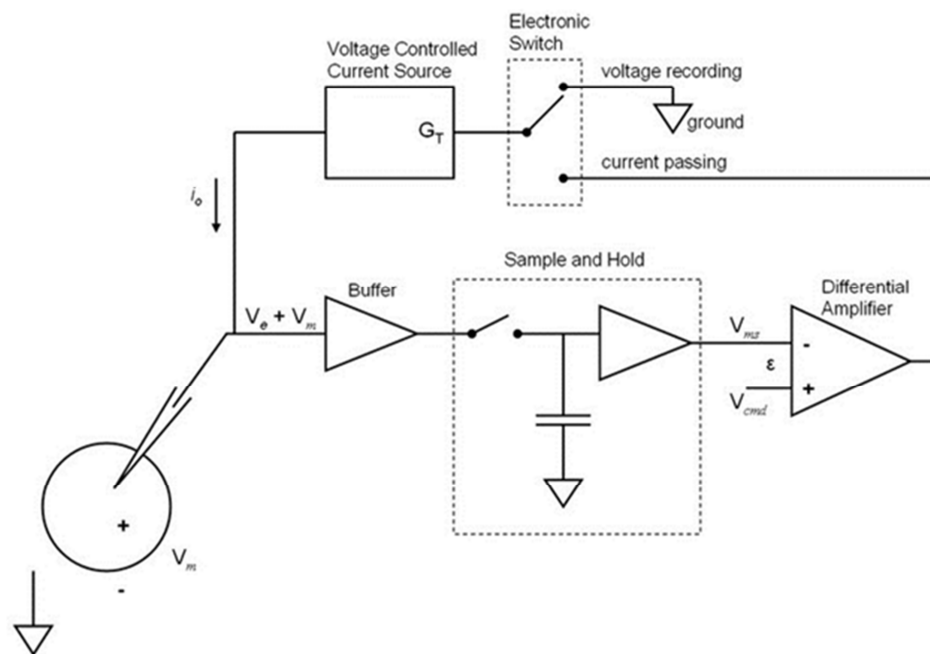


Figura 2.4: Diagramma a blocchi di un voltage-clamp a singolo elettrodo.

La tecnica del voltage-clamp ha principalmente due vantaggi: innanzitutto fornisce una misura della permeabilità ionica della membrana ad un determinato ione; inoltre l'apertura dei canali di Na^+ , Ca^{2+} e K^+ , determinanti il PA, dipende dal potenziale di membrana stesso, per cui la possibilità di manipolare questa variabile permette il controllo e l'analisi della cinetica dei cambiamenti di stato di tali canali.

Tuttavia in questi test quella che viene misurata è sempre e solo la corrente totale e non si è in grado di separare le componenti dei diversi ioni; quindi, se vengono utilizzate cellule intatte ciò che si fa è bloccare la corrente che si vuole misurare, ricavandola poi per differenza.

Un altro approccio consiste nel creare in laboratorio, avvalendosi di tecniche di biologia molecolare, cellule dotate solo di un certo tipo di canali, che permettono la misura delle singole correnti ioniche.

I modelli matematici cardiaci in questo ambito sono di grande importanza, poiché permettono di integrare in un unico sistema informazioni elettrofisiologiche ricavate anche separatamente tramite le tecniche di clampaggio cellulare.

Capitolo 3

MODELLI VENTRICOLARI UMANI

In questa tesi sono stati presi in esame tre modelli di cardiomiocita ventricolare umano di ultima generazione: il Grandi-Pasqualini-Bers (2010), l'O'Hara-Rudy (2011) e la sua versione modificata da Passini e Severi (2013); a partire da quest'ultimo modello sono state effettuate le modifiche oggetto di questo elaborato. Verranno di seguito descritti più nel dettaglio questi tre modelli.

3.1 IL MODELLO GRANDI-PASQUALINI-BERS (2010)

Il modello Grandi-Pasqualini-Bers (GB [13]) utilizza come template il modello di cardiomiocita di coniglio proposto da Shannon *et al.* (2004 [11]), con l'aggiunta di nuovi dati sperimentali umani. Gli obiettivi principali di questo modello sono simulare i fenomeni alla base dell'accoppiamento eccitazione-contrazione, definire realistiche correnti di ripolarizzazione per il potassio (K^+) e migliorare il comportamento del potenziale d'azione (PA) in condizioni stazionarie (steady-state).

Questo modello è costituito da 4 compartimenti (fig. 3.1): il compartimento intracellulare, il reticolo sarcoplasmatico (SR), il junctional cleft, ovvero una zona di giunzione tra

il SR e la membrana del sarcolemma dove avviene il ciclo del calcio calcio-indotto (CICR) e un compartimento denominato subsarcolemma (SL) che separa il compartimento intracellulare da quello extracellulare.

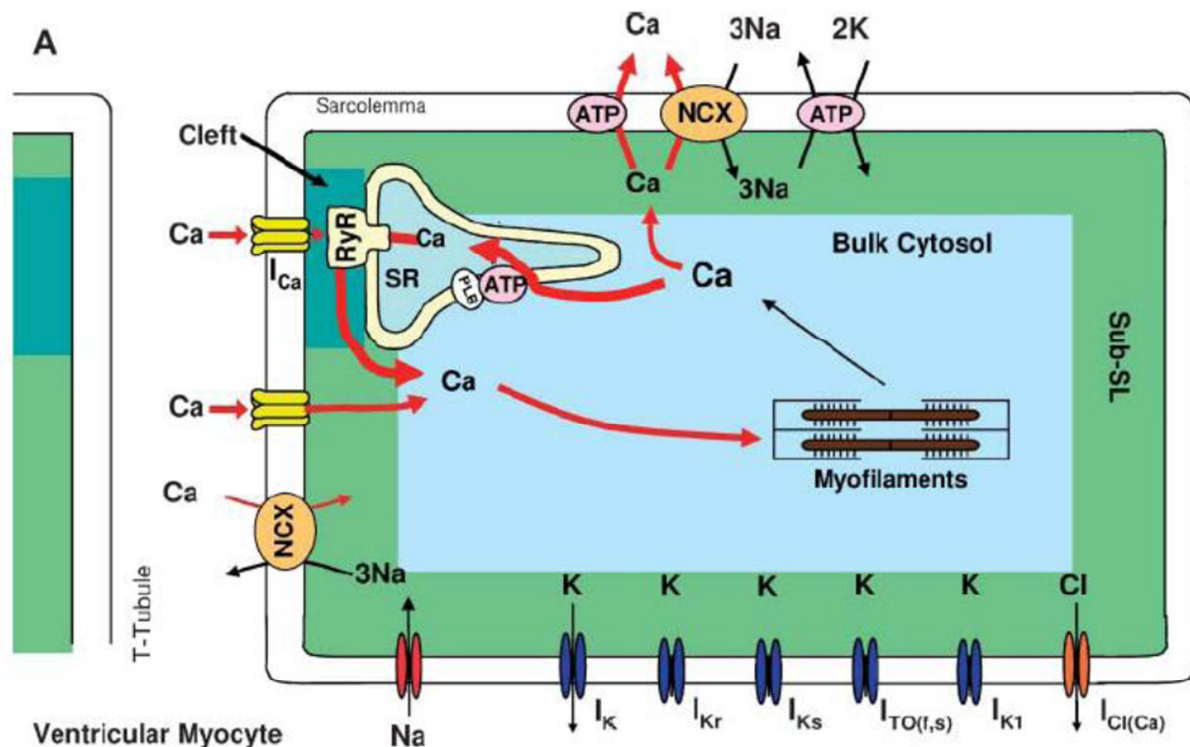


Figura 3.1: Schematizzazione della cellula del modello Grandi-Bers. Questa strutturazione è mutuata dal modello di Shannon [11] per il cardiomiocita ventricolare di coniglio.

Particolare rilievo è stato dato alle correnti rettificanti I_{K1} e I_{Kr} e alla corrente di K^{+} uscente I_{to} , qui suddivisa in due componenti: $I_{to,fast}$ corrente transiente uscente veloce, che mostra una rapida ripresa dall'inattivazione (88% della totale I_{to}) e $I_{to,slow}$ che ha cinetiche relativamente lente di ripresa (vedi fig. 3.3).

La corrente I_{CaL} viene formulata considerando la permeabilità dei canali L-type oltre che al calcio (Ca^{2+}), anche a sodio (Na^{+}) e K^{+} , per quanto in minima parte. Per Ca^{2+} e Na^{+} , la corrente è data dalla somma di due componenti: una proveniente dal SL, l'altra dal junctional cleft; questi

due compartimenti funzionali sono stati introdotti per tener conto del diverso transiente della concentrazione di Ca^{2+} rispetto a quello registrato nel compartimento intracellulare (chiamato anche bulk cytosol).

Come nel modello di Shannon [11], in GB la densità dei canali L-type non è uniforme: il 90% si affaccia nel junctional cleft e il rimanente 10% è distribuito nel resto della membrana che si interfaccia con il SL; questa distribuzione è dovuta all'accoppiamento che avviene fra il Ca^{2+} trasportato dai canali L-type e i recettori della Rianodina (RyRs) collocati nella membrana del SR, accoppiamento che dà luogo al CICR. Il Ca^{2+} nella zona giunzionale raggiunge in breve il valore di picco prima di diffondere nel bulk cytosol, via SL, picco che aumenta all'aumentare delle frequenze di stimolazione; dopo il picco iniziale in questi due compartimenti il Ca^{2+} si assesta su concentrazioni di gran lunga inferiori nel compartimento intracellulare.

Il flusso di Ca^{2+} in uscita dal SR è regolato dai canali RyRs, descritti con un modello markoviano a 4 stati (Riposo (R), Aperto (O), a Riposo Inattivo (RI), Inattivo (I)), similmente a quanto concepito da Shannon [11] nel suo modello. Il passaggio da una configurazione all'altra è mediato dalla concentrazione di Ca^{2+} nel SR (vedi Capitolo 2 paragrafo 2.4).

All'aumentare della frequenza di stimolazione si ha un incremento dell'ampiezza del Ca^{2+} transiente: ciò è dovuto all'aumento del carico di Ca^{2+} nel SR che causa rilasci maggiori e quindi transienti maggiori; inoltre, questo accumulo di Ca^{2+} produce anche accumulo di Na^+ , che contribuisce significativamente all'accorciarsi dell'APD90, ovvero la durata del PA al 90% della ripolarizzazione (fig 3.2 e 3.3).

Inoltre il modello GB riproduce molto bene il blocco selettivo delle correnti di K^+ : in particolare il blocco di IK_r prolunga significativamente la durata del PA, mentre con il blocco di IK_1 si ha un moderato incremento dell'APD, indipendentemente dalle frequenze di stimolazione.

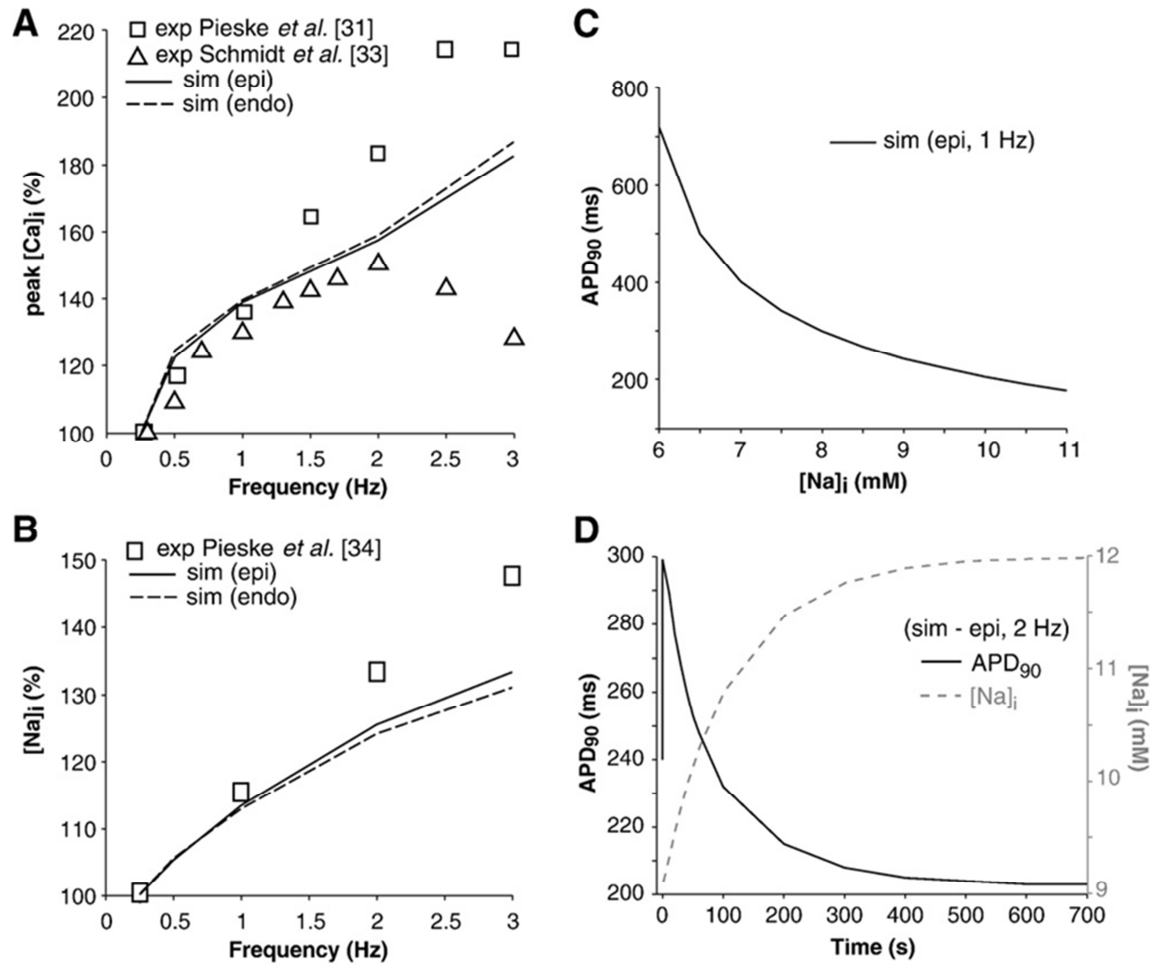


Figura 3.2: (A) Variazioni dei picchi di $[Ca]_i$ e (B) $[Na]_i$ all'aumentare delle frequenze di stimolazione nei modelli ventricolari di miociti epicardici (linea continua) ed endocardici (linea tratteggiata) umani. I simboli rappresentano i risultati sperimentali. (C) Simulazione della dipendenza dell' APD_{90} da $[Na]_i$ (epicardio, stimolazione ad 1 Hz). (D) La simulazione del blocco della pompa di Na (50%) causa un prolungamento del PA seguito da un graduale accorciamento non appena gli ioni Na^+ si accumulano nel cytosol (epicardio, stimolazione a 2 Hz).

Matematicamente il modello GB è formato da un sistema di 38 equazioni differenziali ordinarie (ODE) che descrivono le variabili di gating governanti la cinetica dei canali ionici, le concentrazioni di Na^+ e Ca^{2+} intracellulari e le dinamiche dei processi di Ca^{2+} . Le equazioni differenziali del modello sono implementate in linguaggio MATLAB (Mathworks Inc., Natick, MA, USA) e risolte numericamente utilizzando un solutore di ordine variabile (ode15s).

In definitiva il modello computazionale proposto da GB combina con alcune delle migliori proprietà dei modelli precedentemente ideati nuovi dati sperimentali ed è in grado di riprodurre alcune caratteristiche dei miociti ventricolari umani quali:

- L'accorciamento dell'APD come conseguenza dell'aumento della frequenza di stimolazione (adattamento)
- Cinetiche e morfologia dei transienti di Ca^{2+}
- Incremento dei picchi dei transiente di Ca^{2+} e Na^+ proporzionalmente all'aumento della frequenza di stimolazione
- Effetti del bloccaggio delle correnti di K^+ rettificanti sull'APD e loro dipendenza dalla frequenza

Questo modello rappresenta quindi un significativo passo avanti rispetto ai modelli pre-esistenti e risulta un utile punto di partenza per esplorare i meccanismi ionici e le anomalie di ripolarizzazione a livello della singola cellula.

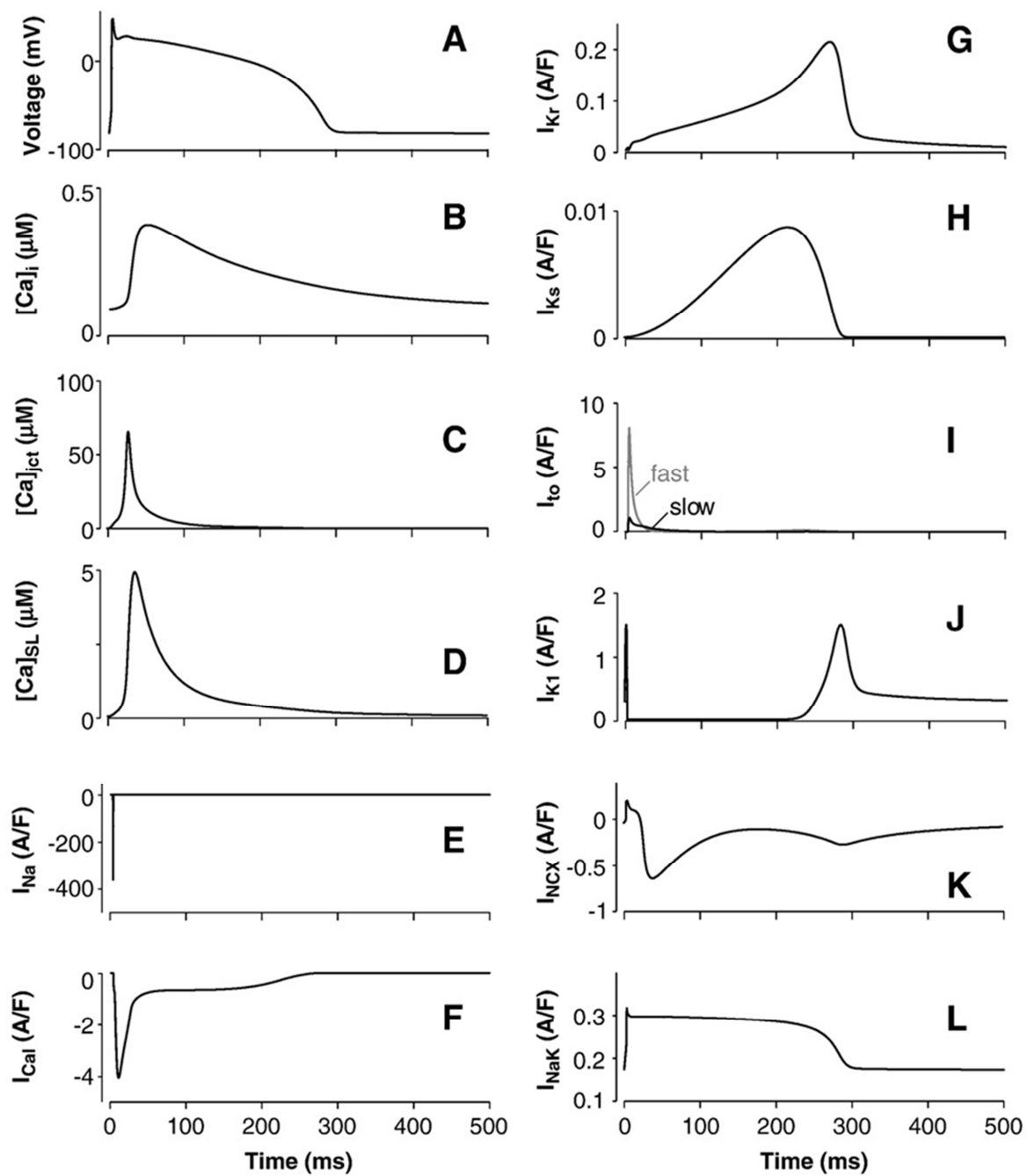


Figura 3.3: PA nell'epicardio in steady-state, transienti di Ca^{2+} e le maggiori correnti ioniche simulate alla frequenza di stimolazione di 1 Hz.

3.2 IL MODELLO O'HARA-RUDY (2011)

Il modello O'Hara-Rudy (OR dynamic, abbreviato ORd, 2011 [14]) è attualmente il modello ventricolare umano più recente. L'obiettivo degli autori è stato quello di riprodurre un'estesa gamma di comportamenti fisiologici, quali la dipendenza dell'APD dalla frequenza, l'APD restitution e gli effetti della Calmodulina protein-kinasi II-Ca²⁺ dipendente (CaMK) sulle correnti ioniche e sul Ca²⁺.

Un punto di forza del modello consiste nella disponibilità di nuovi e numerosi dati sperimentali ottenuti da cellule ventricolari umane sane provenienti da più di 100 cuori senza patologie. Grazie a questo importante dataset gli autori hanno ottenuto nuove misure per la corrente ICa_L, per le correnti del K⁺ e per la corrente dello scambiatore Na⁺/Ca²⁺ (NCX).

Lo schema del modello (fig. 3.4) deriva in larga parte da quello di Decker *et al.* per i miociti ventricolari di cane (2009 [16]). La rilevazione di una diversa concentrazione di Ca²⁺ nelle regioni limitrofe alla membrana sarcoplasmatica ha suggerito l'aggiunta del subspace (SS), gli altri componenti funzionali sono il reticolo sarcoplasmatico (SR) che funge da riserva per Ca²⁺ e il bulk cytosol, ovvero il citoplasma più interno della cellula, per un totale di tre compartimenti.

Rispetto al modello GB si può notare la suddivisione del SR in due subcompartimenti, il NSR (Network Sarcoplasmic Reticulum) e il JSR (Junctional Sarcoplasmic Reticulum), oltre che l'assenza del subsarcolemma SL; di contro però il SS di ORd risulta dimensionalmente maggiore del junctional cleft in GB. Inoltre nel SS sono presenti soltanto i canali L-type e lo scambiatore NCX, mentre tutti gli altri canali si trovano nel compartimento intracellulare.

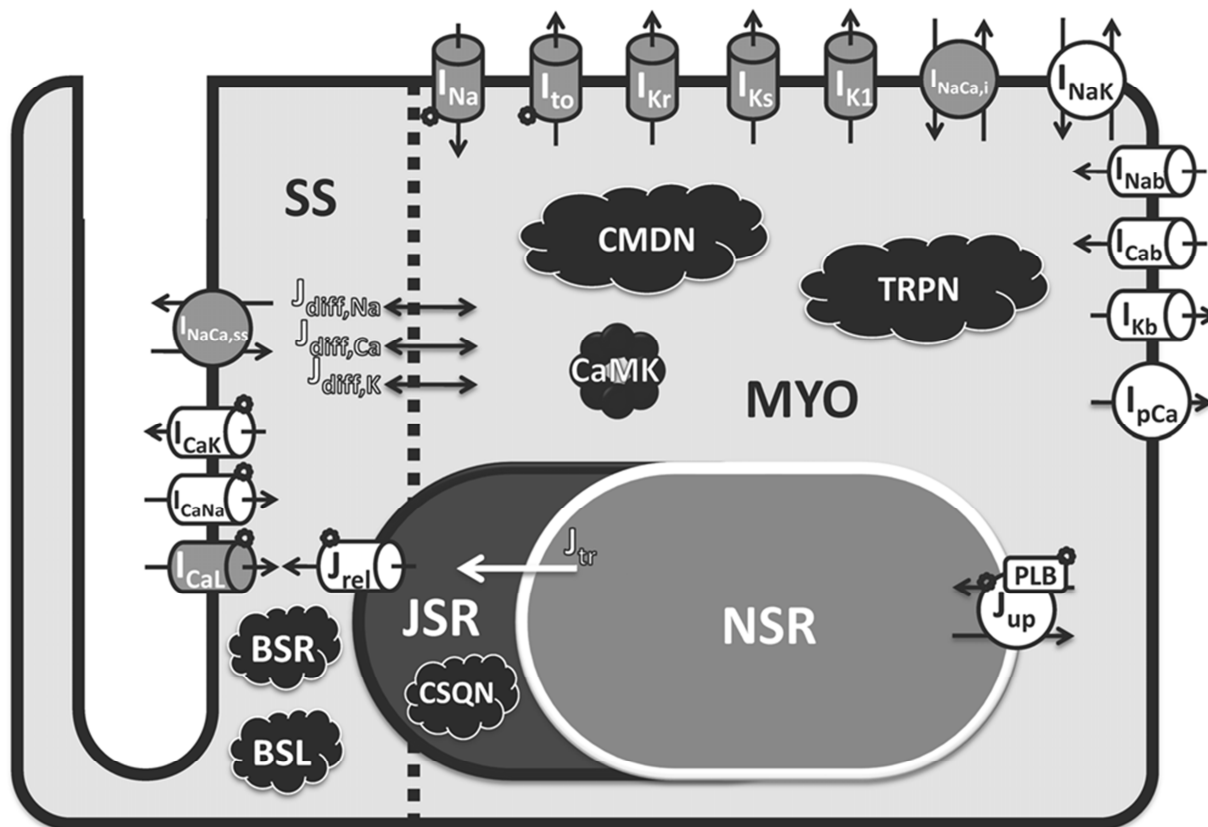


Figura 3.4: Schema del miocita ventricolare utilizzato nel modello ORd.

Dal punto di vista computazionale il modello ORd è descritto da 41 equazioni differenziali ordinarie di cui 10 sono necessarie per riprodurre gli effetti della CaMK. Gli autori hanno concepito il modello senza alcuna formulazione markoviana dei gates dei canali, utilizzando il formalismo adottato da Hodgkin e Huxley.

Pur derivando dal modello di Decker [16], le equazioni delle correnti presenti in ORd sono state ampiamente riadattate (I_{Na} rapida, I_{to} , I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1} , I_{NaCa} , I_{NaK}), ad eccezione dei buffer per Ca^{2+} e le correnti di background, che utilizzano le formulazioni di Decker con l'aggiustamento delle conduttanze; si evince rispetto al modello GB la presenza di una nuova corrente di Na ad attivazione lenta I_{NaL} , che avrà un ruolo importante nei processi di ripolarizzazione ed adattamento del PA.

Un'altra peculiarità del modello è la separazione dell'inattivazione calcio-dipendente (CDI) dall'inattivazione voltaggio-dipendente (VDI) per quanto riguarda la corrente I_{Ca_L} ; per modulare l'interazione fra questi due meccanismi è stata introdotta la variabile di gate n , il cui valore rappresenta la frazione di canali operanti in modalità CDI. In condizioni fisiologiche, l'inattivazione della corrente I_{Ca_L} è dovuta alla combinazione di CDI e VDI, quindi n è compresa tra 0 (completa VDI) e 1 (completa CDI). Sia per VDI che CDI le inattivazioni sono caratterizzate da due costanti di tempo pesate.

Per quanto concerne la dinamica del Ca^{2+} , essa non si discosta da ciò che avviene nel modello GB; l'azione di CaMK qui introdotta influenza la dipendenza dalla frequenza del ciclo del Ca^{2+} nel modello. Il silenziamento di questa proteina riduce l'ampiezza dei transienti di Ca^{2+} , così come l'intensità dei flussi di riassorbimento (J_{up}) e di rilascio (J_{rel}) di Ca^{2+} , ma aumenta la concentrazione diastolica di tale ione (fig. 3.5).

Un'ulteriore innovazione di questo modello è la sua capacità di riproduzione di post-depolarizzazioni precoci (EADs), che come è stato già descritto sono importanti meccanismi aritmogenici. Le EADs si sono ottenute applicando un parziale blocco (85%) della corrente rettificante ritardata I_{K_r} (a rapida apertura); la loro comparsa è collegata alla velocità di ripolarizzazione e ai suoi effetti sulla I_{Ca_L} , aspetto quest'ultimo in cui il modello GB peccava, sia per una forse inaccurata formulazione dell'inattivazione di I_{Ca_L} , sia per la mancanza di un adeguato set di dati proveniente da cuori sani, come quello disponibile per la realizzazione di questo modello.

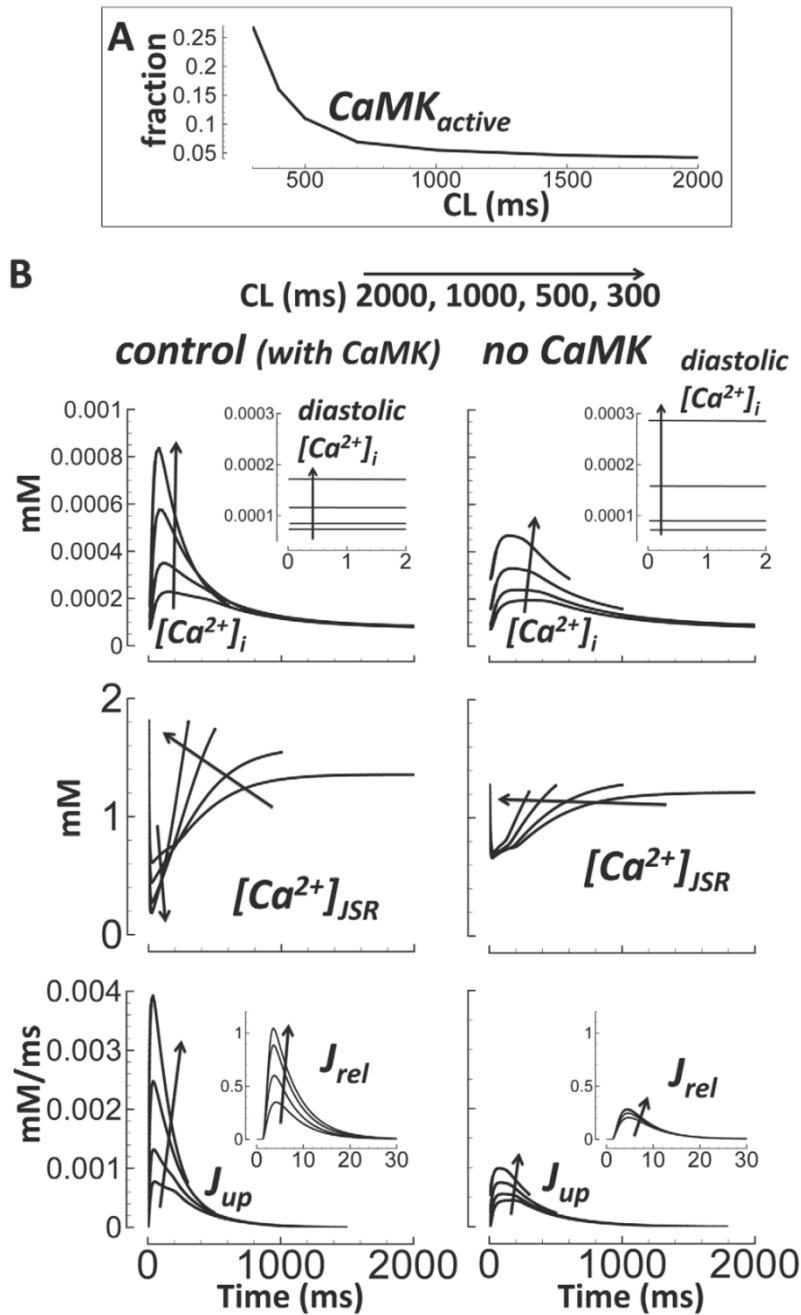


Figura 3.5: (A) Dipendenza dalla frequenza della frazione di CaMK attiva. (B) Cicli del Ca^{2+} in condizioni di controllo (sinistra) e senza CaMK (destra); i cambiamenti nella lunghezza degli intervalli di stimolazione sono rappresentati dalle frecce. In basso sono riportati gli andamenti dei flussi di riassorbimento (J_{up}) e di rilascio (J_{rel}) di Ca^{2+} dal SR.

Il modello ORd è stato fortemente validato, utilizzando numerosi dati sperimentali, in particolare sulla durata del PA a diversi livelli di ripolarizzazione (APD30, APD50, APD70 e APD90), e con diverse frequenze di stimolazione.

Si definisce APD restitution (restituzione della durata del potenziale d'azione) la curva che rappresenta la durata del PA in funzione della frequenza di stimolazione o meglio del basic cycle length (BCL), la lunghezza del ciclo di stimolazione: la riduzione del BCL, o equivalentemente un aumento della frequenza di stimolazione, causa una diminuzione della durata del PA; le curve dell'APD restitution sono importanti poiché un loro andamento non corretto può essere collegato ad un maggiore rischio aritmico.

In sintesi il modello O'Hara-Rudy riproduce importanti comportamenti fisiologici:

- CDI vs VDI della ICa_L
- cinetiche dettagliate ed accurate per tutte le maggiori correnti inward ed outward (I_{to} , $INaCa$, IK_1 , IK_r , IK_s , INa e INa_L)
- Riproduzione dell'effetto sul PA del blocco delle principali correnti
- Durata del PA a tutte le frequenze fisiologiche di stimolazione con o senza il blocco delle maggiori correnti.
- Ripristino della durata del PA con o senza il blocco delle correnti rettificanti ritardate
- Riproduzione delle post-depolarizzazioni precoci (EADs)

- Inclusione degli effetti della CaMK sui transienti del Ca^{2+}

E' da sottolineare l'importanza avuta nella progettazione dal set di dati provenienti da soggetti umani sani, elemento che rende questo modello molto robusto.

3.3 IL MODELLO ORk (2013)

Il modello ORk sviluppato da Passini e Severi (2013 [15]) utilizza come base il modello ORd, soffermandosi però sull'analisi dei cambiamenti del PA in relazione alla variazione del calcio extracellulare $[\text{Ca}^{2+}]_o$, aspetto che il modello ORd e quelli precedenti non avevano appropriatamente riprodotto.

Infatti è stato appurato sia *in vivo* che *in vitro* che la variazione di $[\text{Ca}^{2+}]_o$ influenza la durata del potenziale d'azione (APD), in modo inversamente proporzionale: un aumento di $[\text{Ca}^{2+}]_o$ accorcia il PA, mentre una diminuzione ne incrementa la lunghezza; questa dipendenza va tenuta in considerazione in tutti i contesti clinici in cui avvengono variazioni elettrolitiche, come per esempio la terapia dialitica o esperimenti di *bed-rest* in cui vengono simulate le condizioni di microgravità a cui sono sottoposti gli astronauti e i relativi effetti sul sistema cardiovascolare.

Studi recenti hanno dimostrato come uno dei maggiori responsabili della dipendenza APD- $[\text{Ca}^{2+}]_o$ sia la corrente I_{Ca_L} ; questo modello si è proposto quindi di correggere il modello ORd modificandone proprio questa corrente di Ca^{2+} in modo da riprodurre la corretta dipendenza tra APD e $[\text{Ca}^{2+}]_o$,

senza tuttavia alterare il comportamento del modello in condizioni di controllo.

Sono i meccanismi di inattivazione calcio-dipendente CDI e voltaggio-dipendente VDI ad avere un ruolo importante in questo fenomeno: all'aumentare del Ca^{2+} extracellulare, infatti, si ottiene un corrispondente incremento della driving force, che tende ad aumentare l'ampiezza della ICa_L e quindi ad allungare il PA. Tuttavia, l'ingresso di Ca^{2+} nella cellula incrementa il meccanismo CDI mediante un sistema a feedback negativo che tende a ridurre la ICa_L stessa e ad accorciare il PA. Dal momento che sperimentalmente viene misurata una riduzione della durata del PA, è evidente come sia questo secondo meccanismo, ovvero l'incremento di CDI, ad avere un ruolo predominante.

Proprio per questo motivo la riformulazione di ICa_L è stata fatta cercando di aumentare la CDI, probabilmente sottostimata nel modello ORD originale. La formulazione di tale corrente, in precedenza costruita con un formalismo alla Hodgkin e Huxley, è stata sostituita con un modello markoviano la cui struttura è simile a quella utilizzata da Decker *et al.* (2009 [16]) per cellule epicardiche canine.

Questo modello markoviano ha una struttura cubica costituita da due *loop* interconnessi (fig. 3.6), ognuno contenente 4 transizioni: attivazione (da C ad O), inattivazione veloce (da O a I1), inattivazione lenta (da I1 a I2) e recupero dall'inattivazione (da I2 a C).

I ratei di attivazione e recupero sono gli stessi nei due loop e sono stati ricavati direttamente utilizzando le costanti di tempo e i valori di equilibrio delle corrispondenti variabili di gating nel modello ORD.

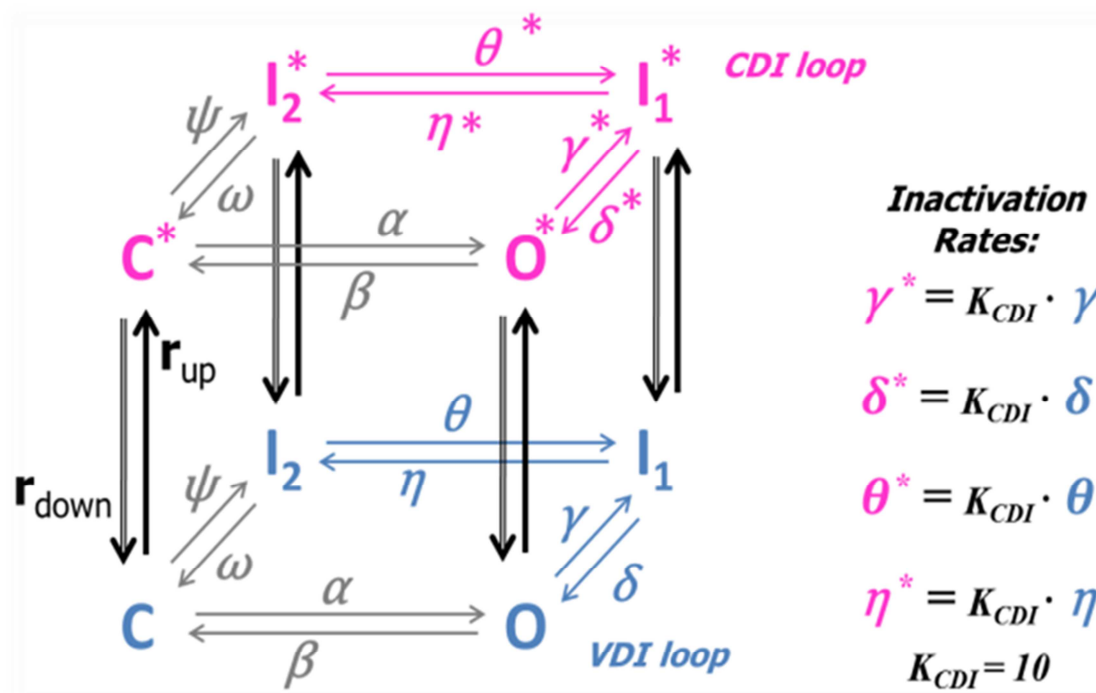


Figura 3.6: Il nuovo modello markoviano di ICa_L . VDI e CDI sono implementati in due loop voltaggio-dipendenti, connessi da ratei di transizione; CDI è 10 volte più veloce di VDI.

I ratei di inattivazione invece sono stati completamente riformulati, in particolare sia per l'inattivazione veloce sia per quella lenta il processo calcio-dipendente risulta 10 volte più veloce di quello voltaggio-dipendente. Questa formulazione rispecchia la teoria elaborata da Kim et al. (2004 [17]), secondo la quale in realtà tutti i ratei di transizione, compresi quelli sul loop CDI, sono in realtà voltaggio-dipendenti: la concentrazione di Ca^{2+} modula unicamente le transizioni fra i loop CDI e VDI tramite il gate n, utilizzato per calcolare i ratei r_{up}/r_{down} .

Nel modello ORD il gate n rappresenta la frazione di canali operanti in modalità CDI ed è l'unica variabile di stato fra quelle agenti sulle cinetiche di ICa_L che è direttamente dipendente dal Ca^{2+} intracellulare; la sua formulazione è basata sull'interazione fra il Ca^{2+} e la Calmodulina (CaM)

legata ai canali L-type per il Ca^{2+} ed è stata preservata in questo modello, anche se le cinetiche sono state leggermente modificate per incrementare la sua sensibilità alle variazioni di Ca^{2+} (fig. 3.7).

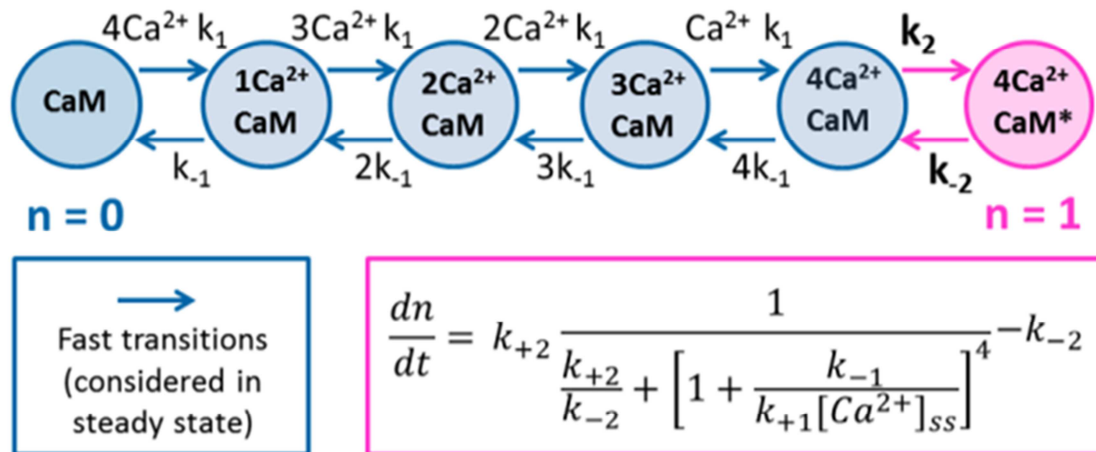


Figura 3.7: Cinetiche del gate n (modificate rispetto a ORd) e corrispondente equazione differenziale.

Oltre alla riformulazione di ICa_L , sono state apportate altre piccole modifiche al sistema del Ca^{2+} , in particolare è stata velocizzata la diffusione di questo ione all'interno del SR, che nel modello ORd sembra essere troppo lenta.

Il modello ORk è quindi stato validato utilizzando i protocolli sperimentali proposti per la corrente ICa_L nel modello ORd, verificandone la coerenza con il modello originale; allo stesso tempo, il nuovo modello riesce a riprodurre la corretta dipendenza $\text{APD}-[\text{Ca}^{2+}]_o$.

Quando il Ca^{2+} extracellulare è stato settato al valore di controllo (1.8 mM) i modelli ORd e ORk mostrano gli stessi risultati di simulazione, con correnti ioniche e PA molto simili in forma e lunghezza, anche se in ORk la ICa_L durante il plateau risulta leggermente inferiore, a causa dell'incremento della CDI. Variando il livello di $[\text{Ca}^{2+}]_o$,

invece, i due modelli mostrano comportamenti opposti: in ORD l'aumento di Ca^{2+} porta ad una I_{CaL} più ampia, che causa un PA più lungo; in ORk invece l'incremento del meccanismo CDI prevale, riducendo la I_{CaL} e di conseguenza l'APD (fig. 3.8).

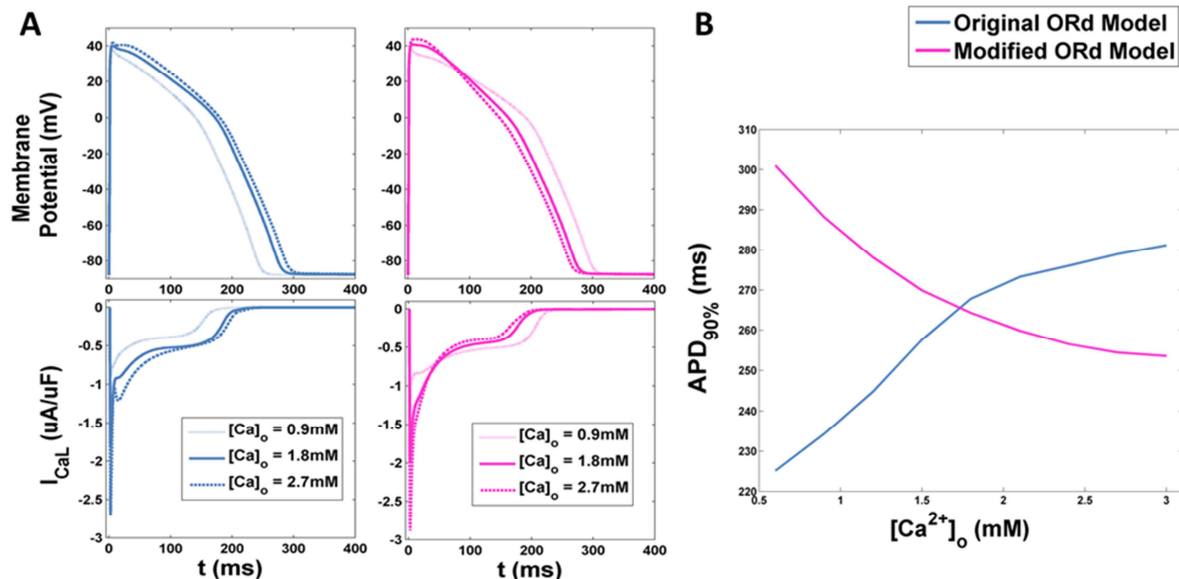


Figura 3.8: Comparazione della relazione APD- $[Ca^{2+}]_o$ per il modello ORD originale e quello ORk modificato. (A) PA e I_{CaL} nei due modelli, utilizzando tre diverse concentrazioni di Ca^{2+} extracellulare. (B) la relazione APD- $[Ca^{2+}]_o$ nel range di rilevanza clinica 0.6-3 mM.

Il modello ORk quindi estende la validità del modello ORD e rappresenta un ottimo strumento per valutare potenziali rischi di aritmia in tutti i contesti clinici dove si hanno variazioni elettrolitiche non trascurabili: un tipico caso di studio è la terapia emodialitica, dove i pazienti sono sottoposti a rilevanti cambiamenti elettrolitici (in special modo di K^+ e Ca^{2+}) in poche ore.

Tuttavia anche questo modello presenta delle limitazioni: la curva di restituzione dell'APD in funzione degli intervalli diastolici (ovvero il protocollo di restitution S1S2) non è correttamente riprodotta; essa infatti mostra un andamento diverso rispetto ai dati sperimentali. Tale comportamento

sembra essere correlato ad una diffusione lenta di Ca^{2+} all'interno della cellula, in particolare nel SR e ad un rilascio che risulta fortemente dipendente dalla frequenza cardiaca.

Per questo motivo lo scopo di questo elaborato è stato quello di modificare il modello ORk per riuscire a riprodurre correttamente l'andamento dell'APD in funzione della frequenza, agendo sulle dinamiche del Ca^{2+} intracellulare, seppur mantenendo il nuovo modello markoviano di ICa_L e quindi la corretta dipendenza APD- $[\text{Ca}^{2+}]_o$. I metodi adottati per raggiungere tale obiettivo e i risultati conseguiti verranno discussi nei capitoli successivi.

Capitolo 4

METODI

4.1 INNOVAZIONI E LIMITI DEL MODELLO ORk

Questo lavoro di tesi si è sviluppato a partire dal modello ORk, già introdotto nel capitolo precedente. In particolare, questo modello è stato sviluppato partendo dal modello ORd e introducendo alcune modifiche alla corrente di Ca^{2+} I_{Ca_L} , per riprodurre la dipendenza inversa tra la durata del potenziale d'azione APD e la concentrazione di Ca^{2+} extracellulare $[\text{Ca}^{2+}]_o$: infatti, all'aumentare di $[\text{Ca}^{2+}]_o$ il PA si accorcia, in accordo con i risultati degli esperimenti *in vivo* (fig. 4.1).

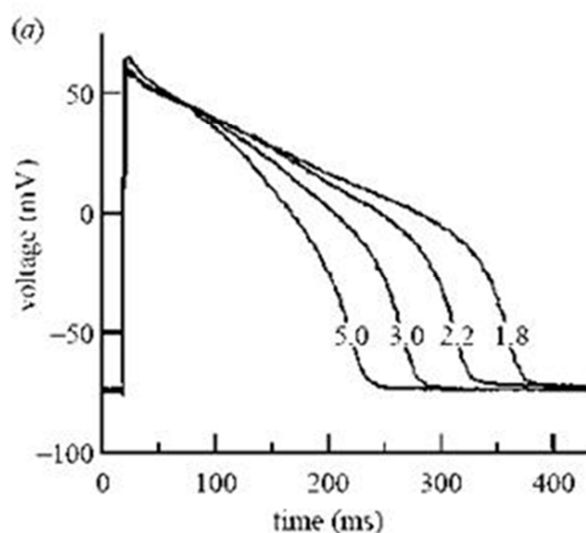


Figura 4.1: Registrazioni sovrapposte di PA ventricolare in corrispondenza di diversi livelli di concentrazione di $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (da 1.8 a 5 mM) in una cavia animale (Leitch-Brown, 1996 [18]).

Per riprodurre questo risultato, quindi, la I_{CaL} è stata completamente riformulata: in particolare, l'inattivazione calcio-dipendente (CDI) è stata rinforzata rispetto a quella voltaggio-dipendente (VDI).

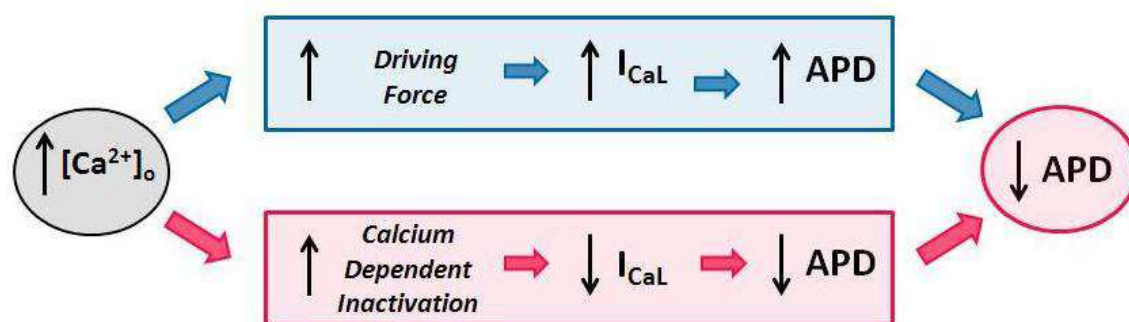


Figura 4.2: Schema che descrive i meccanismi ionici che legano la durata del PA alla concentrazione di $[Ca^{2+}]_o$.

Infatti, all'aumentare del Ca^{2+} extracellulare, all'interno del cardiomiocita si verificano due meccanismi contrastanti, come si può vedere dalla figura 4.2.

Da un lato si ha un aumento della *driving force*, ovvero la differenza tra il potenziale di membrana e il potenziale di inversione del Ca^{2+} , strettamente legato alla variazione di concentrazione tra i compartimenti intra ed extracellulare; tale aumento si riflette in un sostanziale aumento di corrente, e tenderà quindi ad allungare il PA.

Contemporaneamente, tuttavia, l'aumento di corrente porta ad un aumento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare, attivando un meccanismo a feedback negativo della corrente I_{CaL} , la CDI, che tenderà ad inattivare maggiormente la corrente, e quindi ad accorciare il PA. Dal momento che gli esperimenti mostrano che la somma di questi due effetti

comporta una complessiva diminuzione dell'APD, è ovvio che sia la CDI ad avere un peso maggiore. Purtroppo, tale meccanismo è spesso sottovalutato nei modelli umani ventricolari pubblicati, ed è proprio in questo senso che sono state apportate le modifiche al modello ORd.

In questo nuovo modello l'originale formulazione della I_{Ca_L} , di tipo Hodgkin-Huxley, è stata sostituita da un nuovo modello markoviano a stati, tenendo sempre in considerazione la validazione con i dati disponibili per tale corrente, in particolare per quanto riguarda le curve di attivazione e inattivazione ottenute con protocolli di voltage-clamp (fig. 4.3).

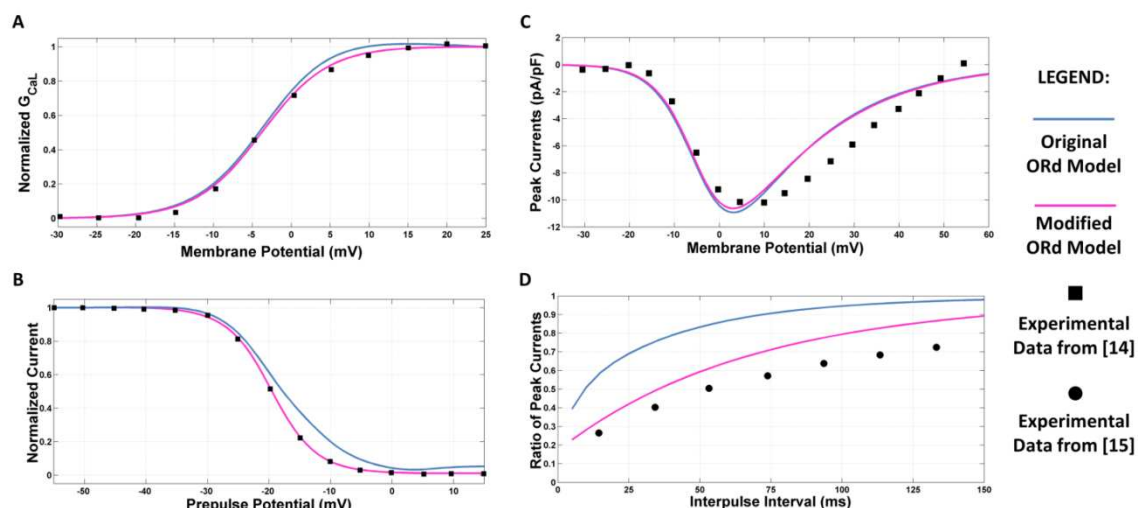


Figura 4.3: Simulazioni di protocolli in voltage-clamp relativi alla I_{Ca_L} per confrontare i risultati dei modelli ORd (in azzurro) e ORk (in rosa) con i dati sperimentali (quadrati da Magyar et al. [19], cerchi da Fulop et al. [20]). A) Steady state activation B) Steady state inactivation C) curve I_{Ca_L} -potenziale di membrana D) recupero dall'inattivazione (protocollo P1P2).

Tuttavia il modello ORk presenta una limitazione per quanto riguarda la relazione tra l'APD e la frequenza. Nel dettaglio, nel modello ORd vengono riportati i dati ottenuti applicando un protocollo di tipo S1S2, in cui si evidenzia una dipendenza diretta tra APD e intervallo diastolico (DI), ovvero il tempo che intercorre tra la fine di un PA e lo stimolo successivo. Nel modello ORk, soprattutto in corrispondenza di DI molto piccoli, il PA tende infatti ad allungarsi rispetto alla stimolazione di controllo, settata a frequenza costante di 1 Hz (fig. 4.4). Poiché l'accorciamento del PA per frequenze elevate è di fondamentale importanza per prevenire l'insorgenza di aritmie cardiache, un comportamento opposto costituisce una grande limitazione per il possibile utilizzo del modello in nuovi contesti e per lo studio dei rischi aritmici.

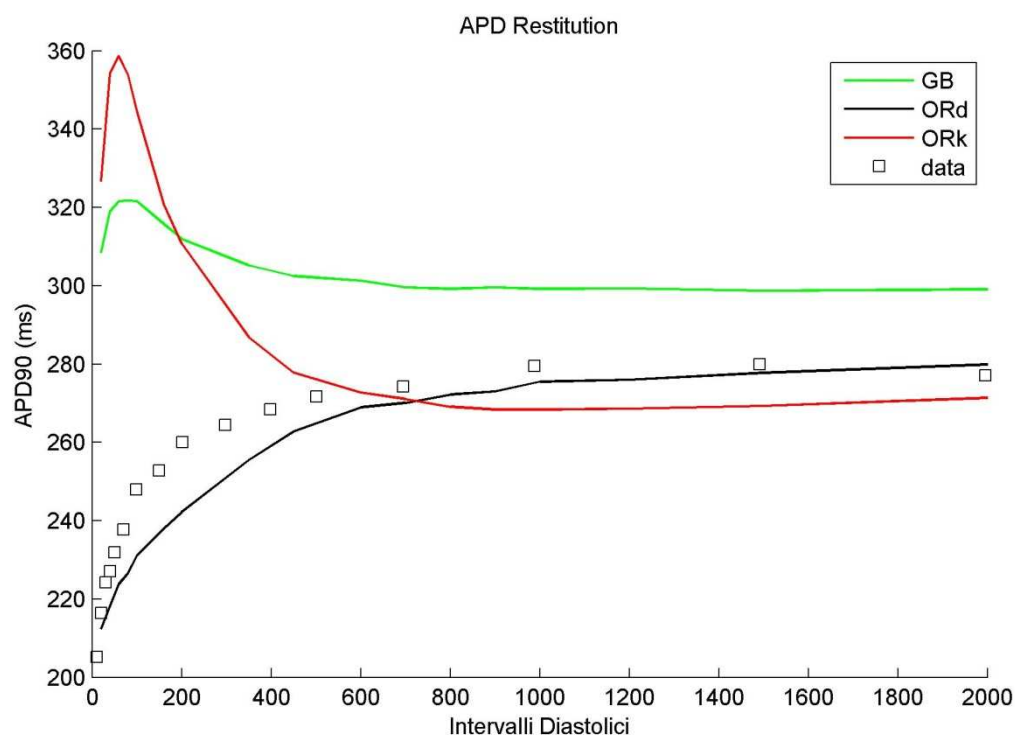


Figura 4.4: Protocollo di restituzione S1S2 ottenuto con $Ca^{2+} = 1.8 \text{ mM}$ per i 3 modelli precedentemente descritti. Si vede chiaramente come il modello ORd sia l'unico a riprodurre correttamente l'andamento dei dati (simboli, come in [14]), mentre nella sua versione modificata ORk e nel modello GB per DI piccoli il PA tende ad allungarsi.

Le cause di questo comportamento non fisiologico per il modello ORk sembrano essere legate al *calcium handling* del modello ORd, costituito da tutti i meccanismi che regolano il trasporto di Ca^{2+} all'interno della cellula e il suo rilascio dal reticolo sarcoplasmatico (SR): in particolare, i fenomeni di riassorbimento (re-uptake) e rilascio (release) da parte del SR sembrano essere molto lenti in questi modello, dove abbiamo un reticolo diviso in due compartimenti e un'equazione di trasporto che gestisce la diffusione del Ca^{2+} dall'uno all'altro. Inoltre la quantità di Ca^{2+} rilasciata dall'SR è fortemente dipendente dalla frequenza: per DI piccoli, solo una piccola quantità di Ca^{2+} riesce ad essere ripristinata all'interno del reticolo, e il successivo PA avrà un transiente di Ca^{2+} molto ridotto. Questo meccanismo, che non ha un grande effetto nel modello ORd originale, diventa più importante nel modello ORk, dove la CDI è stata rinforzata; qui infatti un transiente di Ca^{2+} di ampiezza inferiore porta ad una minore inattivazione della corrente di Ca^{2+} , con un conseguente allungamento del PA.

Dal momento che i dati sperimentali disponibili su cellule umane riguardanti il calcium handling non raggiungono il livello di dettaglio che viene descritto in questi modelli computazionali, è stato possibile mettere in discussione la struttura di tali meccanismi e cercare di modificarli per riprodurre i dati sperimentali relativi al protocollo S1S2.

Una prima fase di questo lavoro di tesi è quindi stata dedicata allo studio del calcium handling nei modelli GB, ORd e ORk per cercare di confrontare eventuali differenze e soprattutto per identificare quelle che sono le variabili che contribuiscono maggiormente all'adattamento dell'APD in risposta a variazioni di frequenza.

4.2 IL CALCIUM HANDLING NEL MODELLO ORD

Con *calcium handling* si indicano tutti quei meccanismi ionici che all'interno della cellula si occupano appunto della gestione del Ca^{2+} intra ed extracellulare. Per riassumere, il Ca^{2+} entra nella cellula dall'esterno, nella fase 2 del PA e la corrente di Ca^{2+} L-type ICa_L è quella che in gran parte ne determina la durata. L'ingresso di Ca^{2+} nella cellula provoca un significativo rilascio di tale ione dal SR che costituisce un vero e proprio deposito di Ca^{2+} : proprio questo rilascio è alla base della contrazione muscolare. Al termine del PA la situazione di equilibrio deve essere ristabilita e il Ca^{2+} intracellulare viene riportato in parte all'interno del SR e in parte all'esterno, grazie a pompe e scambiatori specifici.

Vediamo quindi nel dettaglio i meccanismi coinvolti, basandoci sulla struttura del modello ORD:

- J_{rel} : rappresenta il flusso di Ca^{2+} uscente rilasciato attraverso i canali RyRs (recettori della Rianodina) dal SR; questi canali sono stati divisi nel modello O'Hara-Rudy in due popolazioni in base allo stato di fosforilazione del buffer del calcio CaMK, ovvero la Calmodulina protein-kinasi II- Ca^{2+} dipendente. Nel modello abbiamo quindi un rilascio non-fosforilato ($J_{\text{rel, NP}}$) e un rilascio fosforilato dalla CaMK ($J_{\text{rel, CaMK}}$), i cui effetti sono sommati tra loro. Quando i canali RyRs sono fosforilati dalla CaMK, l'ampiezza di rilascio è di 1.25 volte più grande e la costante di tempo di decadimento è 1.25 volte maggiore, quindi il processo risulta più lento. La proporzione dei canali RyRs che agisce nello stato fosforilato è regolata dalla CaMK attiva ($\text{CaMK}_{\text{active}}$). Il flusso J_{rel} quindi è

quello che determina l'ampiezza del transiente di Ca^{2+} all'interno della cellula.

- **J_{leak}** : rappresenta il flusso di perdita (*leakage*) di Ca^{2+} dal NSR (Network Sarcoplasmic Reticulum) verso il citoplasma intracellulare, attraverso i canali RyRs.
- **J_{up}** : rappresenta il flusso di riassorbimento di Ca^{2+} nel SR, attraverso la *SERCA pump*. Anche in questo caso abbiamo due componenti, quella normale e quella fosforilata. Il funzionamento della J_{up} determina quindi la velocità con cui il Ca^{2+} viene rimosso dal compartimento intracellulare per rientrare nel reticolo, pronto per essere rilasciato di nuovo al successivo PA. Se questa pompa è troppo lenta, allora il Ca^{2+} tenderà a rientrare lentamente nel reticolo, e potrà essere eliminato dalla cellula attraverso altri meccanismi, diretti verso il compartimento extracellulare.
- **J_{tr}** : rappresenta il trasporto di Ca^{2+} all'interno del SR, che nel modello ORD è diviso in due compartimenti: il NSR e il JSR. È da questo JSR, dove *J* indica *Junctional*, che avviene il rilascio di Ca^{2+} attraverso i canali RyRs. Se questo trasporto è troppo lento, il Ca^{2+} tenderà ad accumularsi nel compartimento NSR ad esso adiacente, e l'ampiezza del transiente di Ca^{2+} nel PA successivo sarà ridotta.
- **$J_{\text{diff,Ca}}$** : è il flusso di diffusione di Ca^{2+} all'interno della cellula, dal subspace al bulk cytosol.

Infine, anche i volumi dei compartimenti hanno un ruolo molto importante nel calcium handling, perché da essi dipendono le concentrazioni nelle varie zone della cellula. Sperimentalmente, non si hanno misure dirette dei volumi intracellulari, e di nuovo ritroviamo nei modelli una certa

libertà. Ad esempio, confrontando il modello ORd con il modello GB (tabella 1) vediamo che nel primo il compartimento giunzionale è di dimensioni molto più grandi, così come il SR.

		ORd	GB	
Volumi cellulari (pL)	CYTO	25.85	21.45	
	SSL		0.66	
	JS	0.7603	0.0178	
	SR	NSR	2.1	1.16
		JSR	0.18	
	TOT		28.89	23.29

Tabella 1: *Confronto dei volumi cellulari nei modelli GB e ORd.*

4.3 MODIFICHE al MODELLO ORk

Tutte le modifiche e le prove esplorative effettuate in questo elaborato sono state effettuate in ambiente MATLAB (Mathworks Inc., Natick, MA, USA) a partire dal codice del modello ORk, che a sua volta è basato su quello fornito da O'Hara-Rudy nel loro lavoro. Nei paragrafi successivi verranno quindi analizzati i diversi passaggi che hanno portato alla modifica del modello ORk per ottenere una corretta riproduzione del protocollo S1S2, senza perdere la dipendenza inversa tra $[Ca^{2+}]_o$ e APD, che costituisce il punto di forza del modello ORk.

4.3.1 Modifiche alla SERCA pump

La prima cosa che è stata analizzata è proprio il trasporto del Ca^{2+} all'interno del SR: infatti la differenza di ampiezza riscontrata nei transienti al variare della frequenza è senza dubbio legata ad un trasporto lento del Ca^{2+} , che non riesce a raggiungere la concentrazione ottimale quando i battiti sono molto ravvicinati. Velocizzando tale trasporto, infatti, la curva di restituzione S1S2 migliora immediatamente, anche se si hanno poi delle conseguenze a livello dell'intera cellula che stravolgono il suo funzionamento in condizioni di controllo.

Come primo tentativo per velocizzare questo trasporto, sono state effettuate delle modifiche alla distribuzione della pompa J_{up} . In particolare, nel modello ORd tale pompa agisce solo dal compartimento intracellulare al primo compartimento del SR. Ipotizzando invece una distribuzione della SERCA pump su tutta la membrana del reticolo, è stato aggiunta una parte di questo flusso (in percentuali variabili tra il 10% e il 20%) tra il compartimento giunzionale della cellula

(SS) e il JSR. Questo ha portato ad un incremento del flusso in entrata nel SR, soprattutto dato che il Ca^{2+} è presente in concentrazioni più elevate proprio nel SS, ma non ha portato a variazioni sufficienti da riprodurre correttamente il protocollo S1S2.

Inoltre, velocizzando il trasporto di Ca^{2+} all'interno del SR si ottiene un rilascio "non controllato" di Ca^{2+} che prosegue durante tutta la durata del PA: se il Ca^{2+} rientra nel reticolo troppo presto, viene nuovamente rilasciato nel SS, e quindi non produce l'effetto desiderato di un rilascio più sostanzioso al successivo stimolo.

4.3.2 Modifiche al modello dei canali RyRs

La seconda possibilità è stata quella di modificare direttamente la formulazione del rilascio di Ca^{2+} dal SR, attraverso i canali RyRs. Nei modelli ORd/ORk, infatti, questo rilascio è formulato in modo del tutto algebrico, senza una propria dinamica di apertura e chiusura dei canali. Nel modello GB, invece, viene utilizzato un modello markoviano apposito, in cui i canali una volta richiusi devono recuperare prima di potersi aprire nuovamente. In questo modo, dovrebbe essere possibile velocizzare il recupero del Ca^{2+} all'interno del SR, senza tuttavia averne un rilascio continuo dai canali RyRs.

L'idea è stata quindi quella di ibridare il modello GB e il modello ORk, sostituendo la formulazione originale con il modello markoviano di rilascio di Ca^{2+} dal reticolo. Importando un nuovo modello di rilascio di Ca^{2+} , sono state necessarie ulteriori modifiche per avvicinare il calcium

handling a quello del modello GB, seppur mantenendo la coerenza con il modello ORk, in particolare:

- Sono state modificate la formulazione e la posizione per il flusso di perdita (J_{leak}), che nel modello GB porta il Ca^{2+} rilasciato direttamente nel compartimento giunzionale e non nel cytosol come invece avviene in ORd/ORk. Dal momento che questo flusso simula proprio una perdita dei canali RyRs, è dunque più fisiologico considerare questa ipotesi.
- J_{tr} : poiché il modello GB non prevede la divisione in due compartimenti del SR, si è cercato di simulare questa assenza velocizzando il trasporto di Ca^{2+} da un subcompartimento all'altro.
- NCX: lo scambiatore Na^+/Ca^{2+} è strettamente collegato al calcium handling, in quanto piccole variazioni della sua conduttanza si riflettono in cambiamenti anche significativi di concentrazione all'interno della cellula, con effetti rilevanti su tutti i meccanismi sopra descritti.

Il modello markoviano utilizzato per il rilascio di Ca^{2+} in GB è stato in realtà derivato dal modello ventricolare di coniglio di Shannon *et al.* [11], adattato per la cellula ventricolare umana. Trapiantando questa formulazione nel modello ORk, è stato necessario adattare anche i ratei che governano le transizioni tra i diversi stati, in quanto la grandezze coinvolte presentavano in alcuni casi differenze significative. Ad esempio, la concentrazione massima di Ca^{2+} nel modello GB raggiunge un valore quasi 10 volte superiore a quello raggiunto nel modello ORk. Le variazioni sono state introdotte sia tutte insieme, sia una per volta, per cercare di separare gli effetti ed analizzare i mutamenti apportati da ogni singola modifica al PA e alle correnti ioniche.

4.3.3 Variazioni volumetriche

Dal momento che sia il SR che il compartimento giunzionale presentano notevoli differenze di volume fra i modelli GB e ORk/ORd e che le concentrazioni sono direttamente collegate ai volumi, sono stati esplorati gli effetti che tali variazioni (in percentuale variabile tra -20% e -80%) producono sul PA.

4.3.4 Modifiche alle correnti ioniche

Come già accennato in precedenza, lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ gioca un ruolo importante nel calcium handling, ed è quindi stato valutato l'effetto che variazioni della sua corrente massima producono sul PA e sulle concentrazioni intracellulari. Inoltre la corrente di Ca^{2+} I_{Ca_L} e la corrente ripolarizzante I_{K_r} sono direttamente collegate all'APD e in alcuni casi le loro conduttanze sono state modificate per mantenere un APD coerente con quello del modello originale.

4.3.5 Dipendenza dell'APD da $[\text{Ca}^{2+}]_o$

Una caratteristica che è stata costantemente monitorata in questo studio è la dipendenza dell'APD dalla concentrazione di Ca^{2+} extracellulare. Questa proprietà del PA, accertata dai risultati sperimentali, è una delle più importanti innovazioni apportate dal modello ORk, per cui ogni modifica apportata al modello è stata validata anche con diverse concentrazioni di Ca^{2+} extracellulare (fig. 4.7).

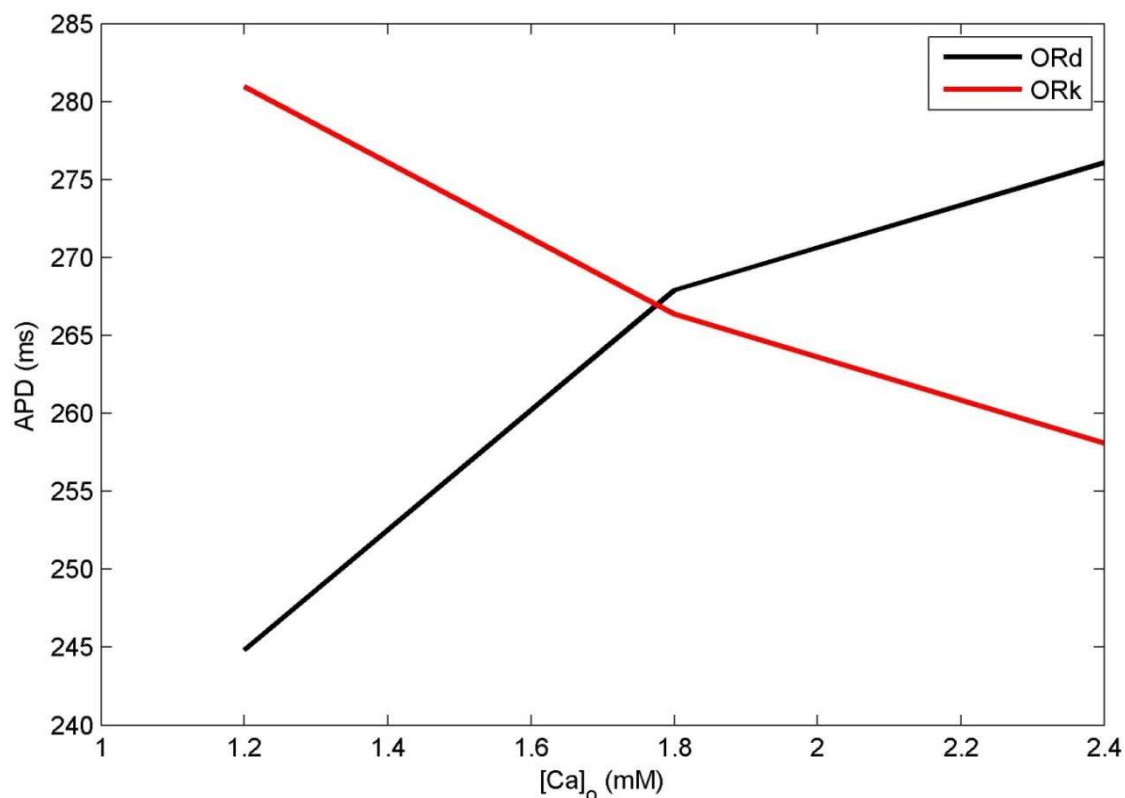


Figura 4.7: Relazione APD- $[Ca]_0$ per i modelli ORd e ORk, simulazione sui 300 battiti.

Facendo un'analisi di sensitività per tutti i parametri sopra descritti, si è quindi gradualmente ottenuto quello che verrà in seguito chiamato modello **newORk**, che mantiene le caratteristiche del modello ORk, migliorandone però la risposta al protocollo S1S2 e raggiungendo quindi l'obiettivo di questo lavoro di tesi. I parametri finali del modello sono stati ottenuti attraverso un processo di "identificazione manuale", ma in futuro sarà possibile automatizzare la procedura e, a partire dai valori modificati del modello newORk, ottenere una versione ottimizzata.

Capitolo 5

RISULTATI

5.1 IL MODELLO newORk

Il modello newORk è stato sviluppato apportando alcune modifiche al modello ORk, in particolare per quanto riguarda la dinamica del Ca^{2+} , seguendo le ipotesi di lavoro descritte nel capitolo precedente e confrontando le formulazioni di altri modelli pubblicati. Per ogni parametro modificato è stata eseguita un'analisi di sensitività, analizzando un range di valori nell'intorno del valore di partenza, e scegliendo poi quello più adatto a riprodurre il comportamento desiderato.

Nei paragrafi successivi verranno descritte le principali modifiche inserite in questo modello, e i risultati di simulazione verranno confrontati con quelli del modello ORk di partenza.

5.1.1 Il reticolo sarcoplasmatico

Il reticolo sarcoplasmatico (SR) è stato modificato sia per quanto riguarda le caratteristiche che le dimensioni; alla struttura a due compartimenti presente nel modello ORd/ORk (denominati NSR e JSR) è stato preferito un sistema a camera unica, così come ritrovato ad esempio nel modello GB. Questa divisione infatti era responsabile del rallentamento osservato nel riempimento del reticolo nel modello ORd/ORk, problema che è stato risolto unendo i due compartimenti. A

questa modifica è stata aggiunta anche una riduzione del volume complessivo del SR del 5%, per avvicinarsi alle dimensioni del modello GB.

Questa è la formulazione originale del modello ORd per la geometria della cellula cardiaca, approssimata ad un cilindro:

$$\begin{aligned}L &= 0.01 \text{ cm} && \% \text{ lunghezza della cellula} \\r &= 0.0011 \text{ cm} && \% \text{ raggio della cellula} \\v_{\text{cell}} &= \pi \cdot r^2 \cdot L = 38 \cdot 10^{-6} \mu\text{L} && \% \text{ volume totale della cellula} \\v_{\text{myo}} &= 0.68 \cdot v_{\text{cell}} = 25.84 \cdot 10^{-6} \mu\text{L} && \% \text{ volume del bulk cytosol} \\v_{\text{nsr}} &= 0.0552 \cdot v_{\text{cell}} = 2.098 \cdot 10^{-6} \mu\text{L} && \% \text{ volume del NSR} \\v_{\text{jsr}} &= 0.0048 \cdot v_{\text{cell}} = 0.182 \cdot 10^{-6} \mu\text{L} && \% \text{ volume del JSR} \\v_{\text{ss}} &= 0.02 \cdot v_{\text{cell}} = 0.76 \cdot 10^{-6} \mu\text{L} && \% \text{ volume del SS}\end{aligned}$$

Nel modello newORk è stato introdotto il volume complessivo del SR, dato dalla somma dei due compartimenti precedenti, e scalato per cV_{sr} , fattore fissato a 0.95, in modo da diminuire il volume totale del SR del 5%:

$$v_{\text{sr}} = cV_{\text{sr}} \cdot (v_{\text{jsr}} + v_{\text{nsr}})$$

La modifica del SR in struttura e dimensioni ha comportato una variazione della formulazioni dei flussi ionici di Ca^{2+} coinvolti nel calcium handling e una modifica della variabile rappresentante la concentrazione di Ca^{2+} del SR, poiché quest'ultimo non è più suddiviso in due compartimenti

come in ORk: per esempio, nelle formulazioni di J_{rel} e J_{leak} non compaiono più le variabili rappresentanti le concentrazioni di Ca^{2+} rispettivamente nel JSR e nel NSR ma la variabile **casr** rappresentante la concentrazione di Ca^{2+} complessiva di tutto il SR; di conseguenza anche i transienti di Ca^{2+} dal citoplasma verso il SR e dal SR verso il SS sono stati modificati in seguito all'introduzione di **casr**. Inoltre il flusso di trasporto J_{tr} è stato annullato, poiché il SR non è più diviso in due compartimenti e quindi non vi è più necessità di rappresentare tale variabile.

5.1.2 Lo scambiatore Na^+/Ca^{2+}

La corrente massima dello scambiatore Na^+/Ca^{2+} I_{NaCa} è stata innalzata aumentando la conduttanza ad essa associata, G_{ncx} . In ORd/ORk la conduttanza per questo scambiatore è espressa come:

$$G_{NaCa} = 0.0008 \mu A/\mu F$$

In newORk tale conduttanza è stata moltiplicata per un parametro **bGncx**, fissato a 1.2 in modo da accrescere la corrente massima passante del 20%.

5.1.3 La corrente I_{Ca_L}

La corrente di calcio I_{Ca_L} è stata modificata variando la costante di tempo relativa al recupero dall'inattivazione. In generale questa costante è stata aumentata sotto potenziale d'azione (PA), rallentando quindi il processo,

mentre ne è stato ridotto il valore basale per migliorare il comportamento in risposta al protocollo P1P2, che valuta appunto la velocità di recupero di questa corrente. (fig. 5.1).

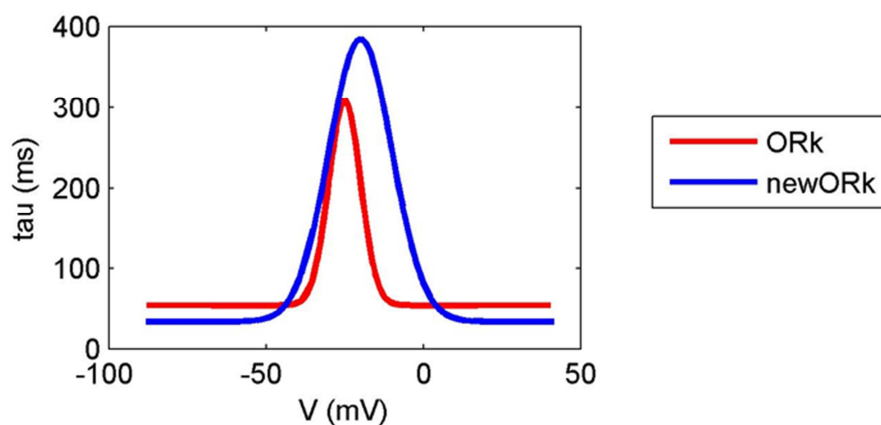


Figura 5.1: L'andamento della costante di tempo di I_{Ca_L} per il recupero dall'inattivazione in funzione del potenziale.

5.1.4 I flussi ionici J_{up} e $J_{diff,Ca}$

Il flusso di re-uptake di Ca^{2+} attraverso la SERCA pump (J_{up}) e il flusso di diffusione di Ca^{2+} dal SS al cytosol ($J_{diff,Ca}$) stati aumentati, per velocizzare il trasporto del Ca^{2+} all'interno della cellula. In particolare, la massima corrente della SERCA pump è stata aumentata di 10 volte, mentre la costante di tempo del flusso di diffusione è stata dimezzata. Queste modifiche portano ad avere una dinamica del Ca^{2+} intracellulare nettamente più rapida, che si traduce in un diverso comportamento del modello in steady-state, soprattutto per quanto riguarda le concentrazioni intracellulari.

5.2 RISULTATI DELLE SIMULAZIONI

Tutte le simulazioni descritte in seguito sono state eseguite in ambiente MATLAB, in parte modificando il codice già implementato per i modelli ORd/ORk e in parte implementando nuovi script per eseguire di volta in volta i protocolli richiesti.

I modelli sono costituiti da un set di equazioni differenziali (circa 40), che sono state risolte mediante un solutore numerico della OdeSuite di Matlab (ode15s).

Le simulazioni di test sono state effettuate stimolando i modelli di cardiomiocita a frequenza di 1 Hz (Basic Cycle Length o BCL pari a 1000 ms) e per un numero di battiti variabile, tra i 15 e i 500. I risultati presentati si riferiscono a simulazioni di 300 battiti, ovvero 300 s, perché si è visto corrispondere al tempo necessario per raggiungere lo stato stazionario.

Le simulazioni sono state inizialmente eseguite con una concentrazione di Ca^{2+} pari al valore di controllo, ovvero 1.8 mM; in seguito sono stati testati valori di Ca^{2+} extracellulari compresi tra 0.9 e 2.7 mM, per verificare che fosse mantenuta la corretta dipendenza inversa $\text{APD}-[\text{Ca}^{2+}]_o$.

5.2.1 Potenziale d'azione

Il PA del modello newORk risulta simile in durata e forma al PA del modello di partenza, con una durata di circa 270 ms (calcolata al 90% della ripolarizzazione), e quindi in linea con i valori fisiologici riportati in letteratura (fig. 5.2).

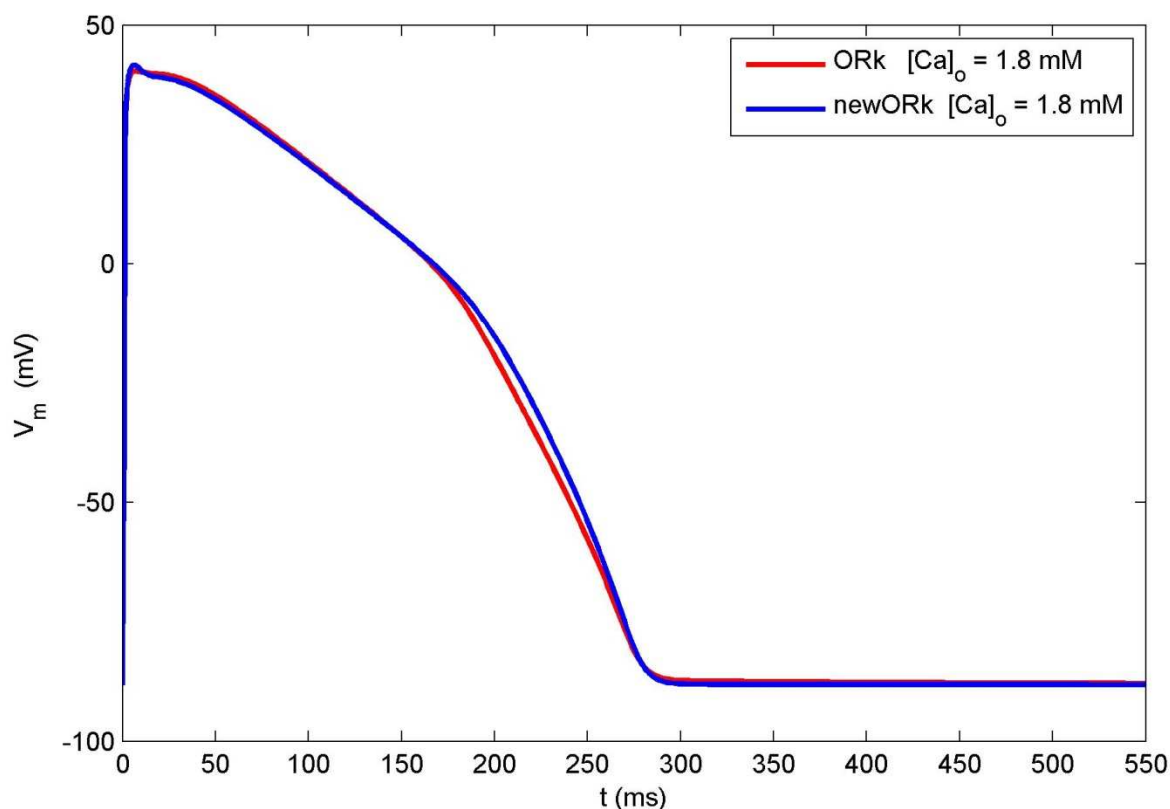


Figura 5.2: PA ventricolare simulato per i modelli ORk e newORk: le due curve risultano molto simili.

5.2.2 Transienti e flussi di Ca^{2+} intracellulari

La modifica dei volumi compartimentali e di alcuni tra i principali flussi ionici ha causato modifiche al calcium handling e alle concentrazioni di Ca^{2+} intracellulare.

Nel dettaglio i transienti di Ca^{2+} (fig. 5.3) sono più ampi nel cytosol e nel SS rispetto al modello ORk, ma allo stesso tempo il livello a regime di $[\text{Ca}]_i$ è più basso, così come la

quantità di Ca^{2+} nel SR. I valori del modello newORk risultano comunque in linea con le misure sperimentali riportate in letteratura, e quindi sono fisiologicamente accettabili.

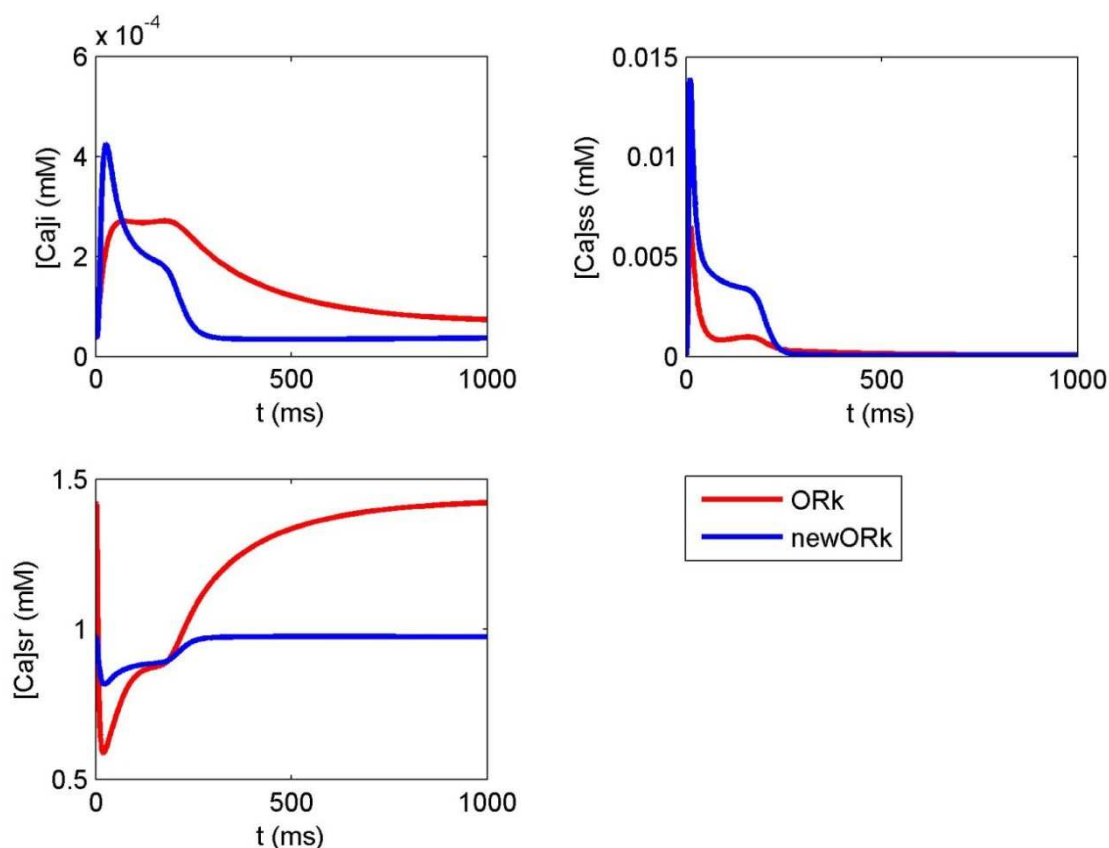


Figura 5.3: Concentrazioni di Ca^{2+} intracellulari: nel cytosol (in alto a sinistra), nel SS (in alto a destra) e nel SR (in basso a sinistra); poiché il modello ORk prevede la divisione del SR in due compartimenti, la sua concentrazione è riferita al JSR.

Per quanto riguarda i flussi di Ca^{2+} (fig. 5.4), nel modello newORk risultano tutti più elevati, in modo coerente con le modifiche volte a velocizzare la dinamica del Ca^{2+} all'interno della cellula. In particolare, si può notare un maggiore re-uptake di Ca^{2+} all'interno del reticolo (dovuto all'aumento di J_{up}) e un flusso maggiore di Ca^{2+} dal SS al cytosol (dovuto all'aumento di $J_{diff,Ca}$). Il flusso in uscita

dal reticolo J_{rel} , invece, risulta leggermente ridotto a causa di una concentrazione inferiore al suo interno.

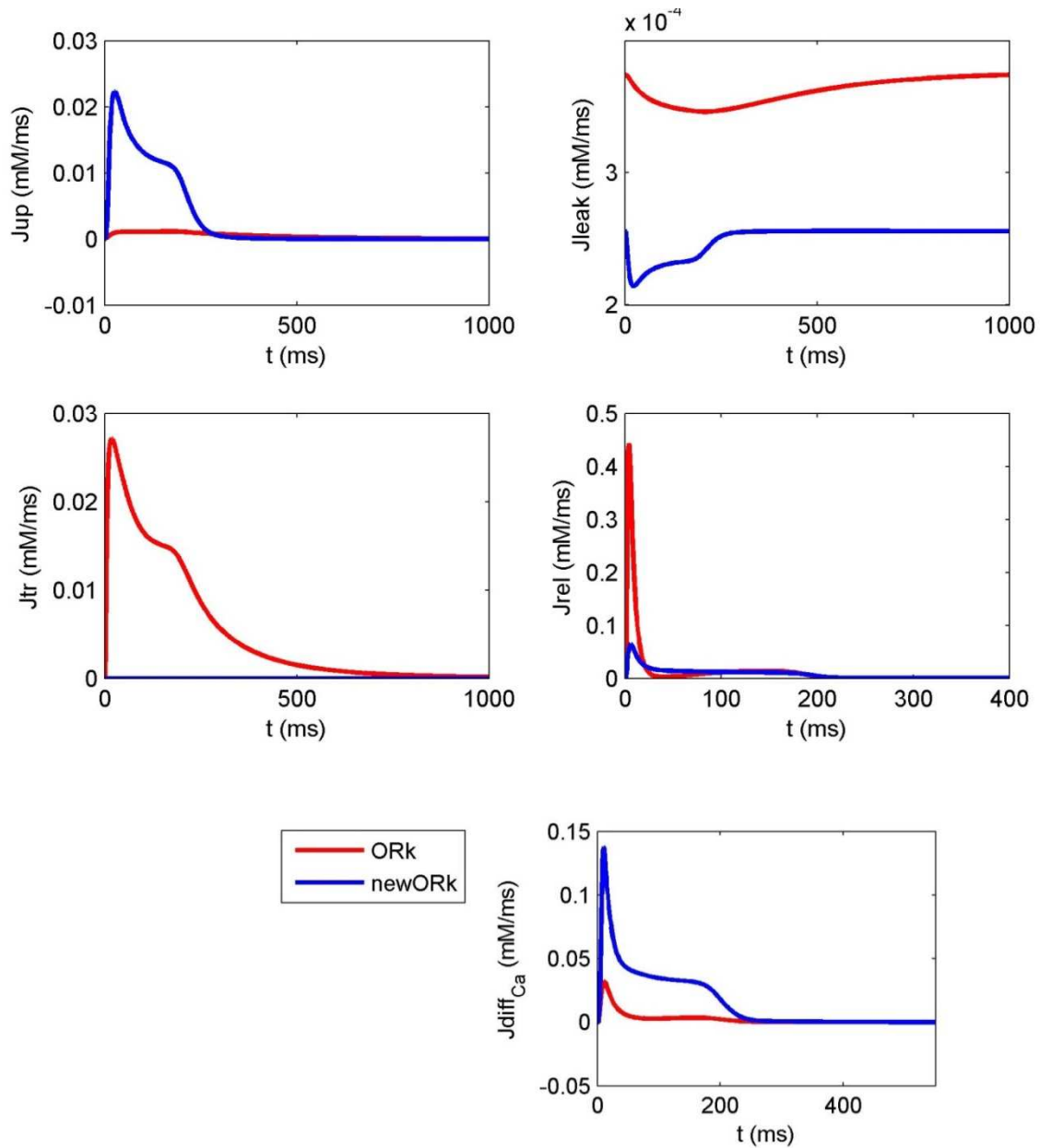


Figura 5.4: *Flussi di Ca^{2+} intracellulare.*

5.2.3 I_{CaL}

In seguito alle modifiche effettuate al calcium handling, la corrente I_{CaL} presenta una dinamica un poco diversa rispetto al modello ORk, con un picco iniziale leggermente più negativo e un'inattivazione più lenta; la driving force, invece, non mostra sostanziali variazioni (fig. 5.5).

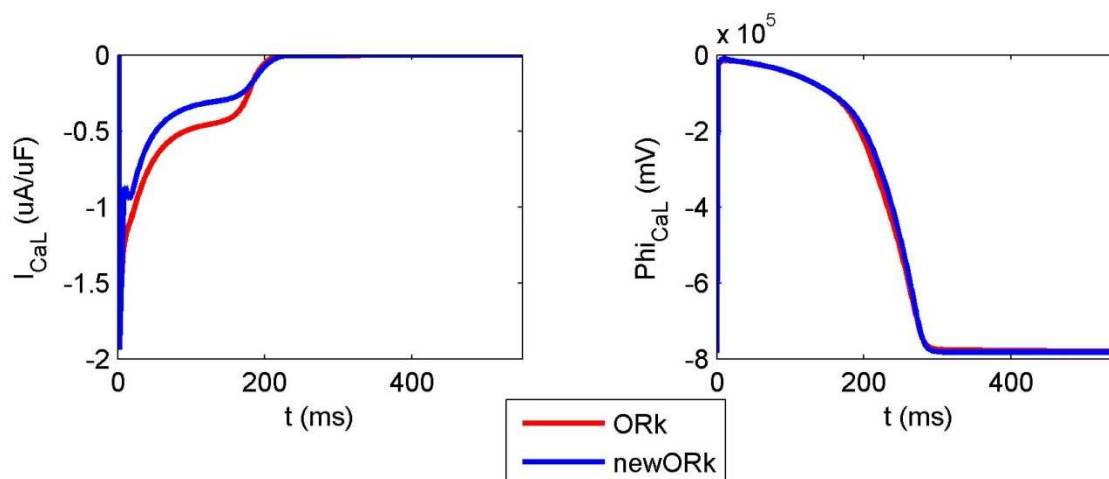


Figura 5.5: I_{CaL} (a sinistra) e driving force (a destra).

5.2.4 Correnti di scambiatore

In seguito all'aumento della conduttanza G_{ncx} , la corrente dello scambiatore Na^+/Ca^{2+} risulta incrementata, sia nel cytosol che nel compartimento SS; La corrente della pompa Na^+/K^+ (I_{NaK}) risulta modificata di conseguenza, in particolare leggermente diminuita, mentre la corrente legata alla pompa Ca^{2+} -ATPase (I_{pCa}) ha un andamento che risulta più alto sotto potenziale e inferiore a regime (fig. 5.6).

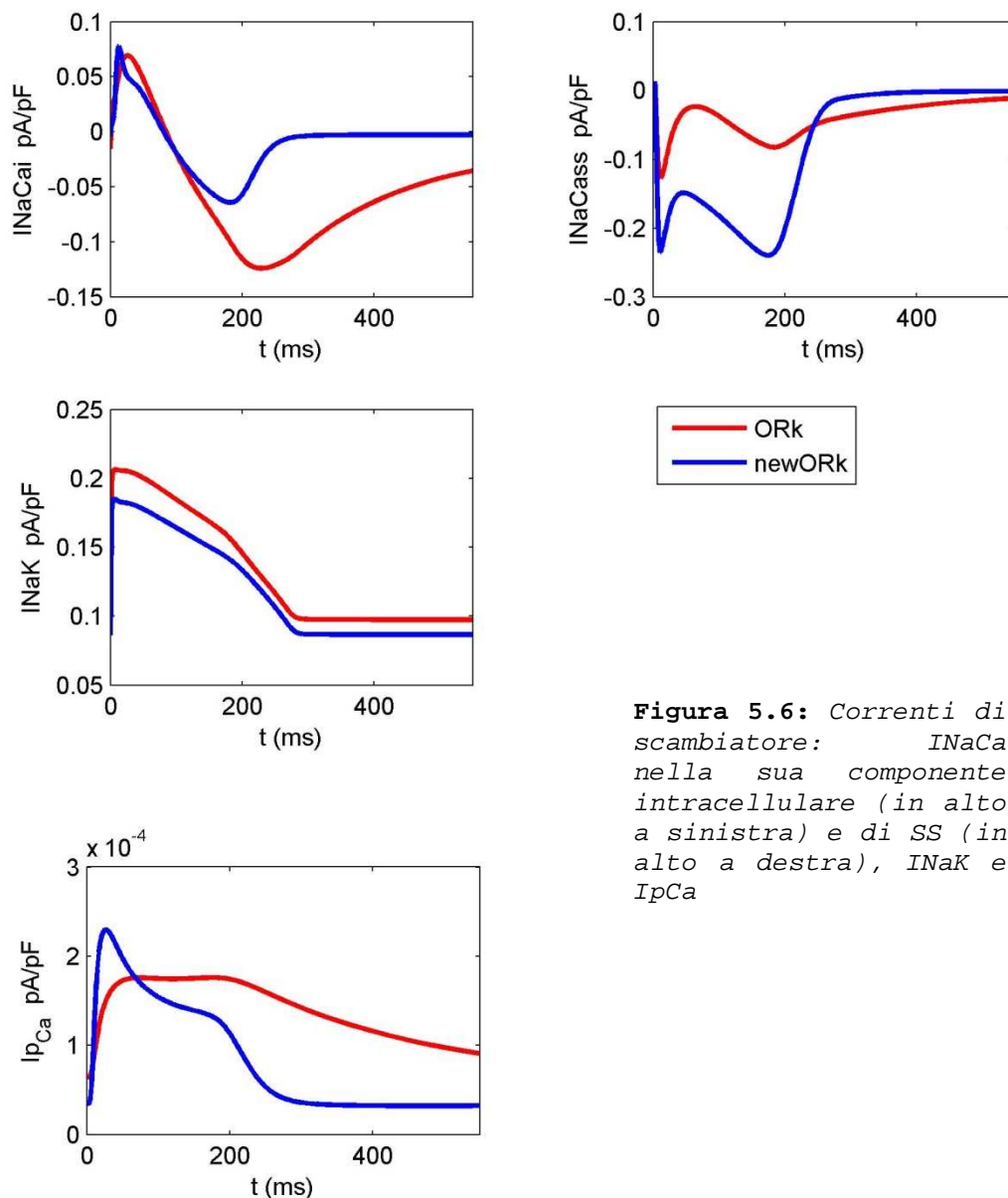


Figura 5.6: Correnti di scambiatore: I_{NaCa} nella sua componente intracellulare (in alto a sinistra) e di SS (in alto a destra), I_{NaK} e I_{pCa}

5.2.5 Dipendenza dal calcio

Seppur con le modifiche sopra descritte, il modello newORk mantiene la corretta relazione $APD-[Ca^{2+}]_o$, che costituisce il punto di forza del modello ORk rispetto all'originale ORd; tale dipendenza è stata verificata considerando tre livelli di Ca^{2+} e i risultati di simulazione mostrano in effetti un accorciarsi progressivo del PA all'aumentare della concentrazione di $[Ca^{2+}]_o$ (fig. 5.7).

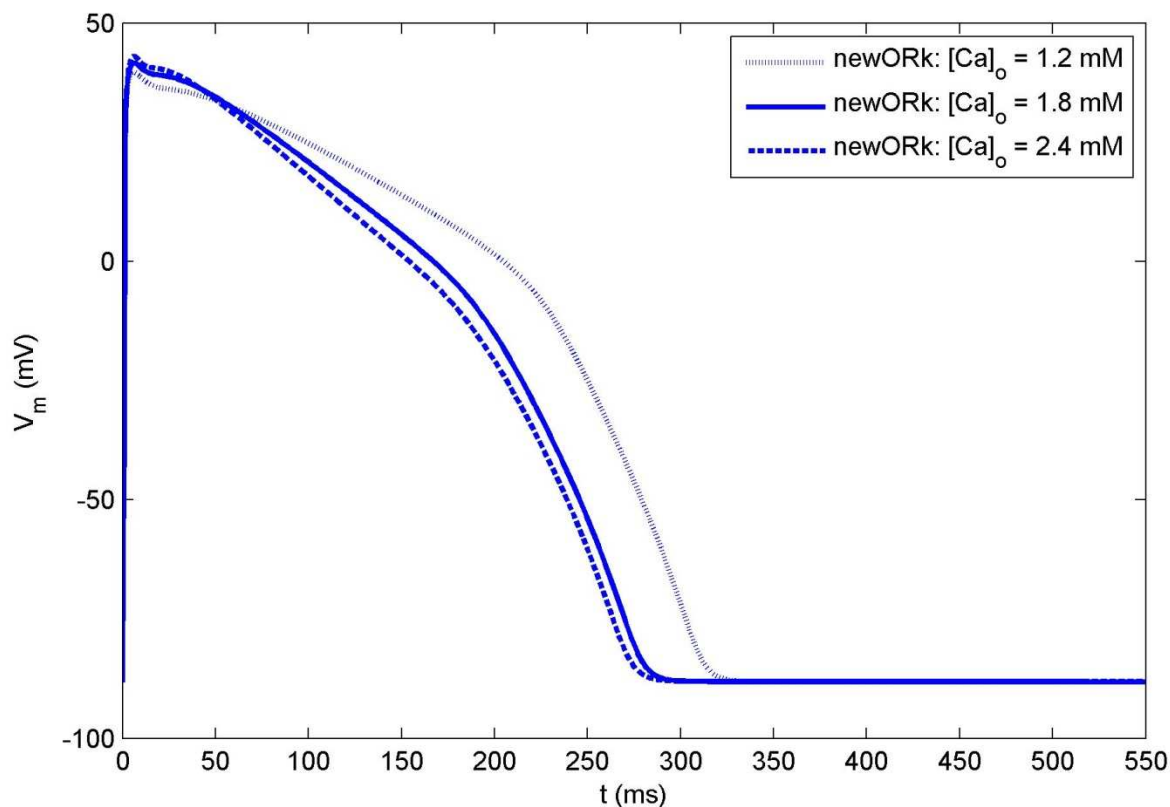


Figura 5.7: andamento del PA nel modello newORk per tre concentrazioni di Ca^{2+} extracellulare differenti.

Come si può notare dalla figura 5.8, la dipendenza dal Ca^{2+} risulta addirittura più marcata nel nuovo modello per i valori di Ca^{2+} inferiori (tra 1.2 e 1.8 mM), che sono anche quelli di maggior interesse in ambito clinico.

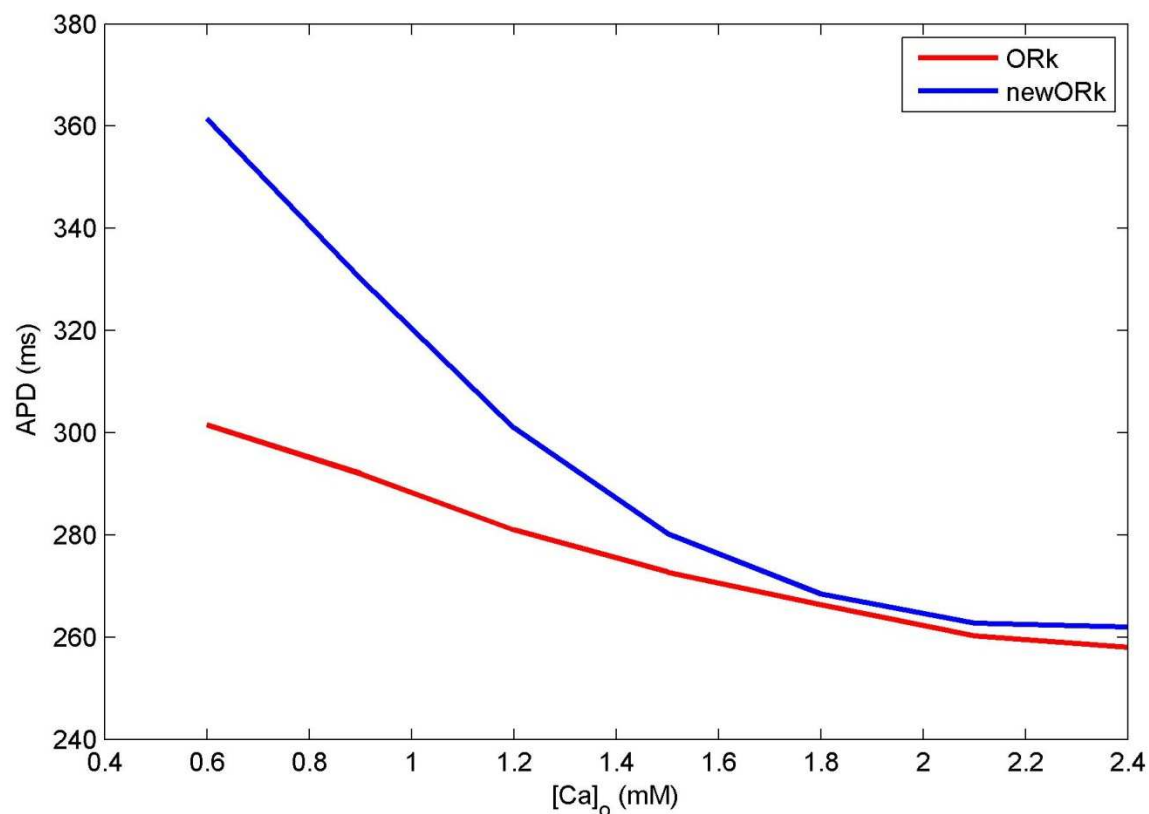


Figura 5.8: curve di relazione APD-[Ca]_o all'aumentare della concentrazione di Ca²⁺ extracellulare.

5.2.6 Altri protocolli sperimentali

Per valutare le caratteristiche della corrente di Ca²⁺ di tipo L, il modello ORk era stato confrontato con i risultati sperimentali ottenuti con protocolli di voltage-clamp da Magyar *et al.* (2002 [19]) e Fulop *et al.* (2004 [20]). Tale validazione è stata ripetuta anche per il nuovo modello, per verificarne la consistenza.

La curva I-V della I_{Ca_L} (fig. 5.9) è stata ottenuta sperimentalmente applicando una serie di gradini di tensione crescenti fino a +40 mV, con passo 5 mV, e misurando i corrispondenti picchi di I_{Ca_L}.

Le simulazioni in newORk rivelano un andamento in linea con il modello precedente, con la curva I-V che tocca valori di corrente lievemente superiori, legati al picco iniziale più negativo.

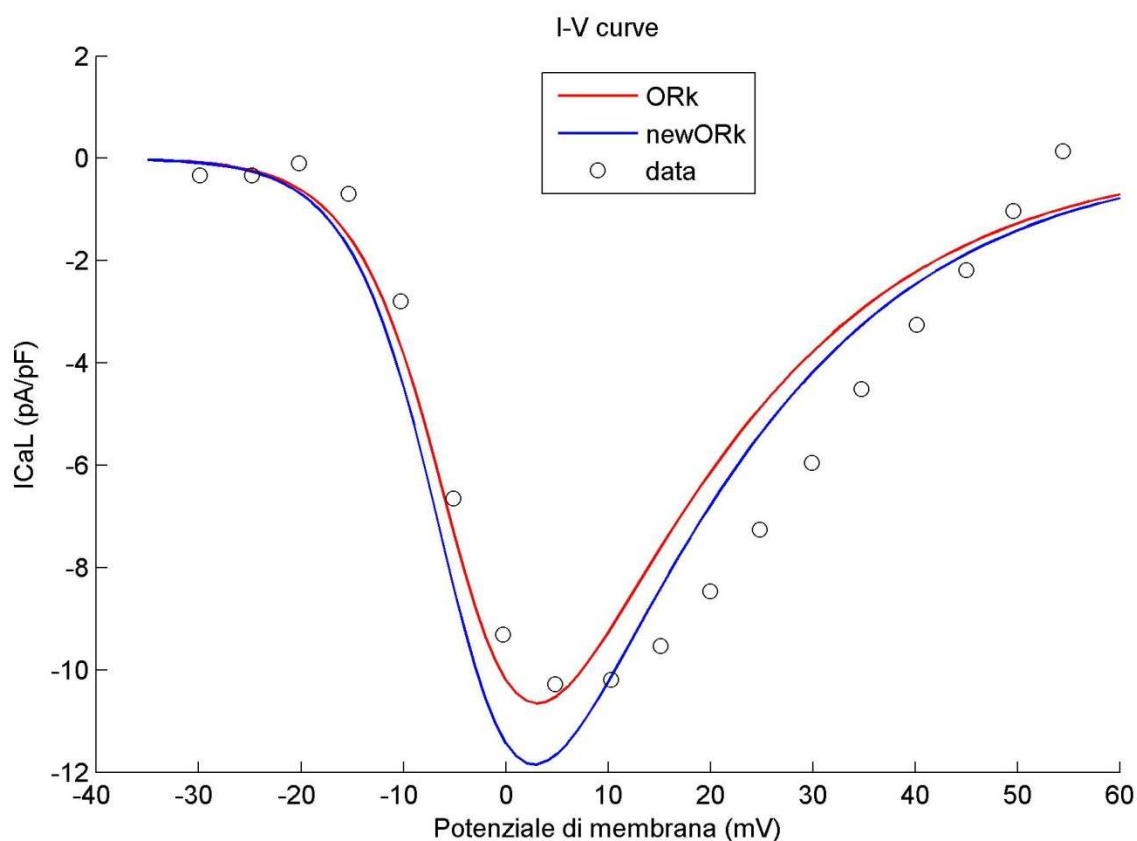


Figura 5.9: Curve che mostrano le relazioni ICa_L -potenziale di membrana ottenute in V-clamp; i simboli rappresentano i risultati sperimentali [19].

Oltre alla curva I-V sono state calcolate le curve di attivazione e inattivazione in stato stazionario.

La curva di attivazione (fig. 5.10) si ottiene con lo stesso protocollo utilizzato per la curva I-V, ma visualizza le variazioni relative della conduttanza di ICa_L per ogni valore di tensione considerato; tale conduttanza è stata calcolata dividendo il picco di corrente per la sua driving

force (ovvero la differenza fra il potenziale di membrana e il potenziale di inversione per I_{CaL} , di circa +55 mV).

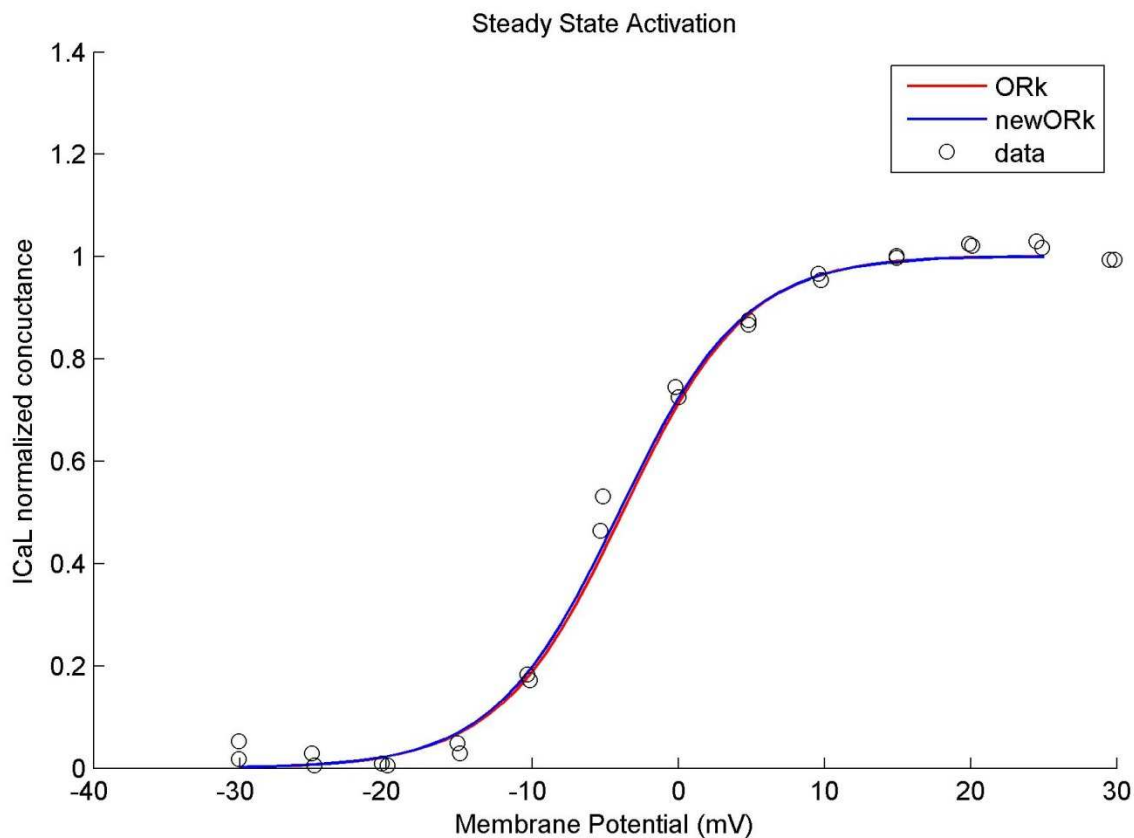


Figura 5.10: Curva di attivazione per la corrente I_{CaL} (normalizzata al valore massimo); i simboli sono i risultati sperimentali [19].

La curva di inattivazione (fig. 5.11), invece, è stata ottenuta con un protocollo leggermente diverso, sempre di voltage-clamp, che comprende sempre la stimolazione della cellula con gradini di tensione variabili.

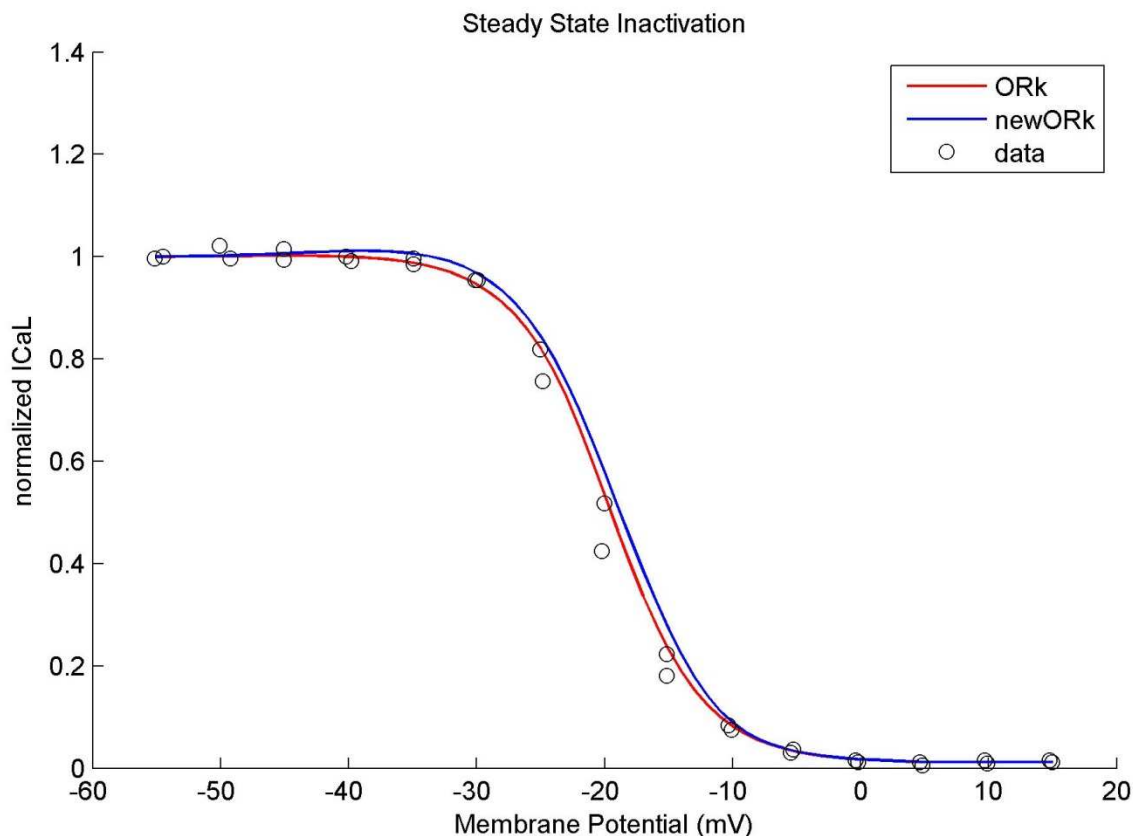


Figura 5.11: Curva di inattivazione per la corrente I_{CaL} (normalizzata); i simboli rappresentano i risultati sperimentali [19].

Il recupero della corrente I_{CaL} dall'inattivazione è stato valutato utilizzando il protocollo P1P2 come in Fulop *et al.* [20]; in questo protocollo di voltage-clamp la cellula viene stimolata con un gradino costante di tensione P1 e quindi dopo un breve intervallo di riposo con un altro gradino P2: l'intervallo P1-P2 viene gradualmente incrementato, e si valutano le variazioni che questo comporta nei picchi della corrente; infine il picco ottenuto in corrispondenza di P2 viene normalizzato rispetto a quello ottenuto per P1, ottenendo la curva in figura. In questo caso i risultati per il modello newORk sono risultati addirittura migliori rispetto al modello ORk, e infatti la curva si avvicina maggiormente all'andamento dei dati sperimentali (fig. 5.12).

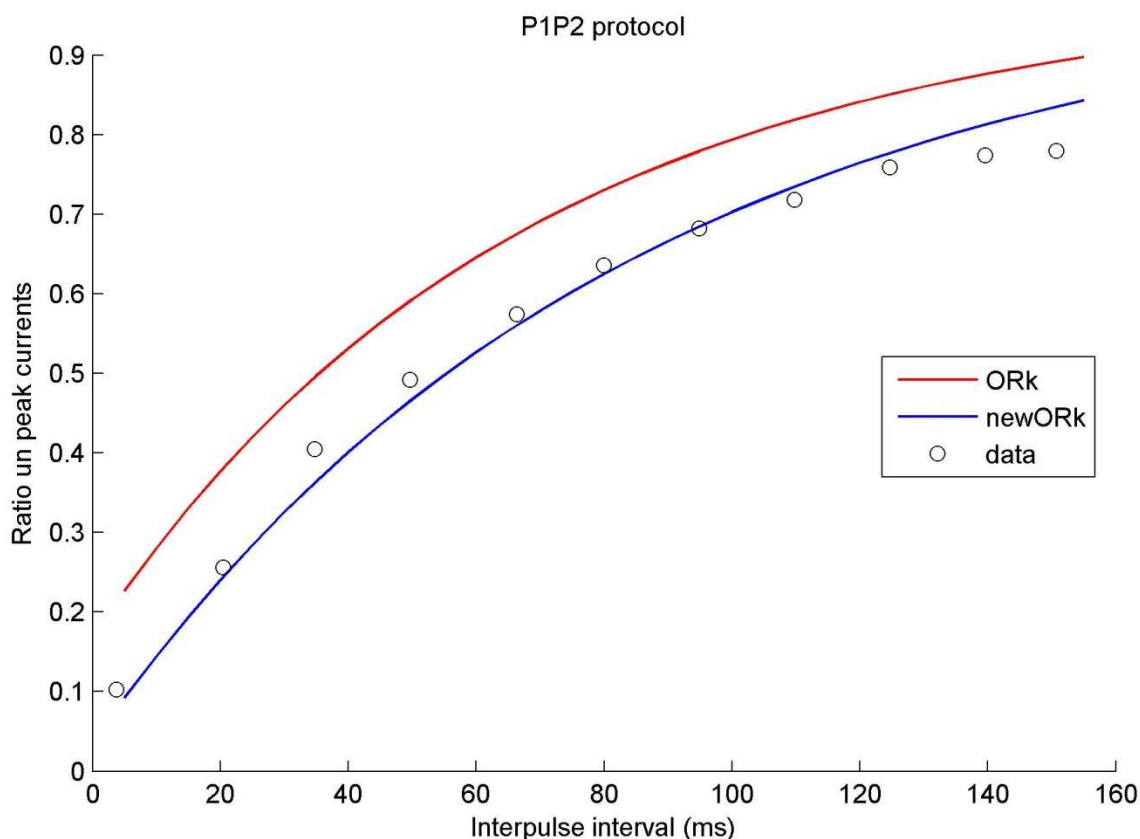


Figura 5.12: Curve ottenute applicando ai modelli il protocollo P1P2; i simboli rappresentano i risultati sperimentali [20].

Tutte le modifiche sopra descritte sono stata apportate per risolvere la principale limitazione del modello ORk, ovvero per riprodurre correttamente il protocollo S1S2.

Tale protocollo prevede la stimolazione del miocita con un treno di impulsi di corrente (S1) a BCL (lunghezza del ciclo di stimolazione) fissato (in questo caso 1 s), seguito da uno stimolo prematuro S2 applicato a intervalli diastolici variabili ($BCL - APD = DI$ intervallo diastolico). In questo modo si può valutare la risposta istantanea del modello a variazioni di frequenza, in base alla durata del PA corrispondente ai diversi stimoli S2.

Come si può osservare nella figura 5.13, l'obiettivo principale di questo elaborato, ovvero invertire la tendenza

della curva APD-DI del modello ORk, è stato raggiunto e la nuova curva è ora più vicina ai dati sperimentali presentati per il modello originale ORD; in particolare, l'allungamento del PA che si aveva per DI piccoli, non fisiologico, è stato qui corretto.

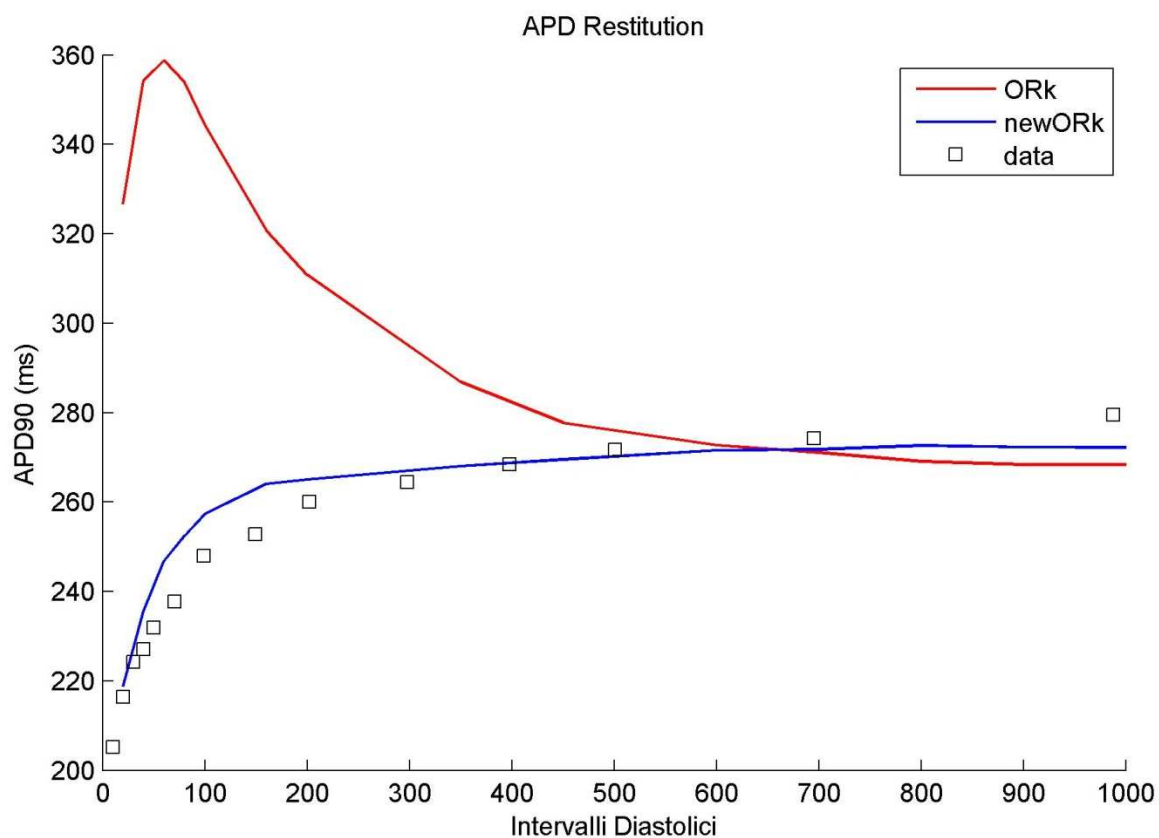


Figura 5.13: Curve ottenute in risposta al protocollo di restitution S1S2; i simboli rappresentano i dati sperimentali [14].

CONCLUSIONI

Questo elaborato ha avuto come obiettivo la modifica di un modello matematico di potenziale d'azione ventricolare umano per migliorare la relazione che lega la durata del potenziale d'azione all'incremento degli intervalli diastolici, al fine di riprodurre correttamente i risultati sperimentali noti in letteratura.

Ruolo principe nell'analisi e nell'implementazione di tale modello è stato quello dello ione calcio, coinvolto in numerosi processi chimici all'interno della cellula cardiaca, e responsabile anche della sua contrazione.

Tutte le modifiche effettuate sono state fatte preservando la dipendenza inversa tra la durata del potenziale d'azione e le variazioni di calcio extracellulare, che costituiva il punto di forza del modello considerato rispetto alla sua versione originale. Le modifiche effettuate hanno riguardato in parte la struttura del modello (compartimenti, volumi) e in parte il calcium handling, ovvero la gestione del Ca^{2+} all'interno della cellula, in termini di flussi e correnti.

Il modello così ottenuto, denominato "newORk", è stato validato rispetto a numerosi protocolli sperimentali (sia di voltage-clamp, sia di current-clamp) presenti in letteratura e i risultati di simulazione hanno dimostrato un comportamento coerente con i risultati *in vitro*. In particolare la risposta del modello al protocollo S1S2, che non era fisiologica nel modello precedente, viene adesso riprodotta correttamente dal nuovo modello, presentando un aumento dell'APD all'aumentare dell'intervallo diastolico considerato.

Il modello qui descritto può quindi essere ritenuto un importante, per quanto specifico, miglioramento nella descrizione matematica della elettrofisiologia cardiaca umana e potrà essere utilizzato per esplorare contesti clinici in cui le concentrazioni di calcio nel sistema cardiocircolatorio si modificano, come per esempio la terapia dialitica.

APPENDICE: CODICE MATLAB

In rosso sono evidenziate le parti del codice MATLAB di newORk modificate rispetto al modello ORK.

A) FILE DEI PARAMETRI

```

global ORDor kCDI k1r_down k1r_up k2r_up tau_tr cJup cVss cPCa bJdiff
bGncx bGKr...
    jncass_n jncass_s jncass_d jncass_k... % nca
    tau_nca Km_nca k2n_nca km2n_nca... % nca
    dss_n dss_k dss_s dss_d... % activation
    taud_k taud_k1 taud_k2 taud_s1 taud_s2... %activation
    jrecss_n jrecss_s jrecss_d jrecss_k... % recovery
    tjrec_max tjrec_min tjrec_media tjrec_sd... % recovery
    flss_n flss_s flss_d flss_k... % flss inactivation
    tf1_kk tf1_n tf1_k tf1_k1 tf1_k2 tf1_s1 tf1_s2 tf1_d1 tf1_d2... %
tauf1 inactivation
    tf2_kk tf2_n tf2_k tf2_k1 tf2_k2 tf2_s1 tf2_s2 tf2_d1 tf2_d2... %
tauf2 inactivation
    sp1 sp2 s11 s12 s13 ... % Speed-Ups
    cVsr IC1Ca_si IC1b_si a2_rel n_rel s_rel exp_rel ntaul_rel
ntau2_rel n2_rel
%% modello
modello = @newORk;
ORDor = 'ORk_HJ';
bGKr = 1;
bGncx = 1.2;
bJdiff = 2;
IC1Ca_si = 0;
IC1b_si = 0;
%% Fosforillazione
% annullo_p = 1;
%% Jrel
a2_rel = 1;
n_rel = 1.5;
n2_rel = 1;
s_rel = 0;
exp_rel = 8;
ntaul_rel = 1;
ntau2_rel = 0.0123;
%% CDI vs VDI
% annullo_CDI = 0;
%% kCDI & kslow
kCDI = 10;
%% r_up & down
k1r_up = 3;      k2r_up = 6e-3;      k1r_down = 1e-1;
%% nca & jnca
jncass_n = 1;
jncass_s = 19.58+25;

```



```

jncass_d = 3.696;
jncass_k = 0;
tau_nca = 1;
Kmn_nca = 0.025;
k2n_nca = 1000;
km2n_nca = 1*150;
%% Activation d
dss_n = 1;
dss_s = 3.940;
dss_d = 4.230;
dss_k = 0;
taud_k = 0.6;
taud_k1 = -0.05;
taud_s1 = 6;
taud_k2 = 0.09;
taud_s2 = 14;
%% Recovery jrec -> jss
jrecss_n = 1;
jrecss_s = 19.58;
jrecss_d = 3.696;
jrecss_k = 0;
%% Recovery jrec -> tau
tjrec_min = 35;
tjrec_max = 350;
tjrec_media = -20;
tjrec_sd = 10;
%% Fast Inactivation f1 -> tau
tf1_kk = 1;           % costante moltiplicativa
tf1_k  = 70;         % valore basale
tf1_n  = 1.2;        % numeratore
% metà con il - (v-vm)
tf1_k1 = 0.0045; % metà decrescente
tf1_s1 = 20;      % shift
tf1_d1 = -50;    % denominatore
%metà con il + (v-vm)
tf1_k2 = 0.0045; % metà crescente
tf1_s2 = 30;     % shift
tf1_d2 = 10;    % denominatore
%% Fast Inactivation f1 -> flss
flss_n=0.8; % numeratore
flss_s=19.58; % shift
flss_d=3.696; % denominatore
flss_k=0.2; % valore costante
%% tau f2
tf2_kk = 1;           % costante moltiplicativa
tf2_k  = 100;        % valore basale
tf2_n  = 0;          % numeratore
% metà con il - (v-vm)
tf2_k1 = 0.0035; % metà decrescente
tf2_s1 = 5;       % shift
tf2_d1 = -84;    % denominatore
%metà con il + (v-vm)
tf2_k2 = 0.0035; % metà crescente
tf2_s2 = 5;      % shift
tf2_d2 = 4;     % denominatore
%% Slow Inactivation f2 -> f2ss
% Calcolata con la reversibilità
%% SpeedUps
s11 = 1;   s12 = 1;   s13 = 1;   sp1 = 1;   sp2 = 1;
%% Other Variables
tau_tr = 30;   cJup = 10;   cVss = 1;   cPCa = 1;   cVsr=0.95;

```

B) SCRIPT DEL MODELLO newORk

```

function output = newORk(t,X,varargin)
global annullo_p annullo_CDI annullo_ICab cPCa...
    kCDI klr_down check_reversibility tau_tr cJup cVss...
    jncass_n jncass_s jncass_d jncass_k... % nca
    tau_nca Km_nca k2n_nca km2n_nca... % nca
    dss_n dss_k dss_s dss_d... % activation
    taud_k taud_k1 taud_k2 taud_s1 taud_s2... %activation
    jrecss_n jrecss_s jrecss_d jrecss_k...
    tjrec_max tjrec_min tjrec_media tjrec_sd... % recovery
    flss_n flss_s flss_d flss_k... % flss inactivation
    tf1_kk tf1_n tf1_k tf1_k1 tf1_k2 tf1_s1 tf1_s2 tf1_d1 tf1_d2... %
tauf1 inactivation
    tf2_kk tf2_n tf2_k tf2_k1 tf2_k2 tf2_s1 tf2_s2 tf2_d1 tf2_d2... %
tauf2 inactivation
    sp1 sp2 sl1 sl2 sl3 ... %Speed-Ups
    cVsr IC1Ca_si IC1b_si bJdiff bGncx bGKr...
    a2_rel n_rel s_rel exp_rel ntaul_rel ntau2_rel n2_rel
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%
% O'Hara-Rudy Human Ventricular Model (2011)
%
% Original Matlab file from:
% http://rudylab.wustl.edu/research/cell/code/AllCodes.html
%
% Related Article
% http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21637795
%
%
%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%
%% Optional Inputs:
% (Default values *)
% 1) flag_ode:
% - flag_ode=0 -> "computed variables" output
% - flag_ode=1* -> dX output
% 2) celltype:
% - celltype=0* -> endo
% - celltype=1 -> epi
% - celltype=2 -> M
% 3) pstim: stimulation protocol and parameters
% - pstim=1* -> I-clamp, single beat
% - pstim=[2 CL] -> I-clamp, multiple beats with CL as input
% - pstim=[3 vclamp] -> Ely V-clamp, single V-step
% - pstim=[4 vclamp] -> Grandi V-clamp, single V-step
% 4) Extracellular Ionic Concentrations [cCao cNao cKo] mM:
% default values: Cao = 1.8mM*; Nao = 140mM*; cKo = 5.4mM*
% - if length=1 -> [cCao] only
% - if length=2 -> [cCao cNao]
% - if length=3 -> [cCao cNao cKo]
% 5) bn: ICaL CDI block (VDI-only ICaL)
% - bn=1* -> no CDI block
% - bn=0 -> CDI total block
% 6) Ib: currents block -> [0-1] for each current/flux (11):
% Ib=[bINa bINaL bIto bICaL bIKr bIKs bIKl bINaCa bINaK bJup bJrel];
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%

```

```

%% Optional Inputs setting:
% Set default values for optional inputs
cEx0 = [1.8, 140.0, 5.4];
Ib0 = ones(11,1);
maxEGTA0 = 0;
ki_cost0 = 0;
optargs = {1,0,1,cEx0,1,Ib0,maxEGTA0,ki_cost0};
% skip any new inputs, if empty
newVals = cellfun(@(x) ~isempty(x), varargin);
% overwrite inputs specified in varargin
optargs(newVals) = varargin(newVals);
% [optargs{1:length(varargin)}] = varargin{:};
[flag_ode, celltype, pstim, cEx, bn, Ib,maxEGTA,ki_cost]=optargs{:};
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% State Variables
if size(X,2)==55
    X(56)=0;
end
% Membrane Potential V
v = X(1);
% Ionic Concentrations
nai = X(2);  nass = X(3);
if ki_cost==0
ki = X(4);  kss = X(5);
else
ki = ki_cost;  kss = ki_cost;
end
cai = X(6);  cass = X(7);
%cansr = X(8);
casr = X(9);
% INa gv
m = X(10);    hf = X(11);    hs = X(12);
j = X(13);    hsp = X(14);    jp = X(15);
% INaL gv
mL = X(16);    hL = X(17);    hLp = X(18);
% Ito gv
a = X(19);    iF = X(20);    iS = X(21);
ap = X(22);    iFp = X(23);    iSp = X(24);
% ICaL
% d = X(25);    ff = X(26);    fs = X(27);
% fcaf = X(28);    fcas = X(29);    jca = X(30);
nca = bn*X(31);    %ffp = X(32);    fcafp = X(33);
% IKr
xrf = X(34);    xrs = X(35);
% IKs
xs1 = X(36);    xs2 = X(37);
% IK1
xk1 = X(38);
% Fluxes
Jrelnp = X(39);Jrelp = X(40);
% CaMKt
CaMKt = X(41);
% ICaL Markov
I1k = X(42); I2k = X(43); Ck = X(44);
I1kp = X(45); I2kp = X(46); Ckp = X(47);
I1Cak = X(48); I2Cak = X(49); CCak = X(50);
I1Cakp = X(51); I2Cakp = X(52); CCakp = X(53);
jnca = X(54); Ok = X(26); Okp = X(27);
% EGTA
EGTA=X(55); EGTAi=X(56);

```

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% Controllo Markov States > 0
pM=0;
if pM==1
if I1k<0; I1k=0; disp('1'); end; if I1Cak<0; disp(I1Cak); I1Cak=0;
disp('5'); end;
if I2k<0; I2k=0; disp('2');end; if I2Cak<0; I2Cak=0; disp('6');end;
if I1kp<0; I1kp=0; disp('3');end; if I1Cakp<0; disp(I1Cakp); I1Cakp=0;
disp('7'); end;
if I2kp<0; I2kp=0; disp('4');end; if I2Cakp<0; I2Cakp=0; disp('8');end;
if Ck<0; Ck=0; disp('1a'); end; if CCak<0; disp('5a'); CCak=0; end;
if Ckp<0; Ckp=0; disp('2a'); end; if CCakp<0; disp('6a'); CCakp=0; end;
if Ok<0; Ok=0; disp('3a'); end;
if Okp<0; Okp=0; disp('4a'); end;
end;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% Extracellular Ionic Concentrations [mM]
if length(cEx)==1
    nao = cEx0(2);    %[Na]o mM
    cao = cEx;       %[Ca]o mM
    ko  = cEx0(3);   %[K]o  mM
elseif length(cEx)==2
    nao = cEx(2);    %[Na]o mM
    cao = cEx(1);   %[Ca]o mM
    ko  = cEx0(3);   %[K]o  mM
elseif length(cEx)==3
    nao = cEx(2);    %[Na]o mM
    cao = cEx(1);   %[Ca]o mM
    ko  = cEx(3);   %[K]o  mM
else
    error('Extracellular Concentrations Error!!!');
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% Physical Constants:
R = 8314.0;    % J/kmol/K
T = 310.0;    % K
F = 96485.0;  % C/mol
vffrt = v*F*F/(R*T);
vfirt  = v*F/(R*T);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% Cell Geometry
% Cell geometry was approxymate by a cylinder of length L and radius r
L = 0.01;                % cm
rad = 0.0011;           % cm
vcell = 1000*pi*rad^2*L; % 38e-6 uL
% Geometric Area
Ageo = 2*pi*rad^2 + 2*pi*rad*L; % cm^2
% Capacitive Area
Acap = 2*Ageo;           % cm^2
% Compartment Volumes (4)
vmyo = 0.68*vcell;      % uL
vnsr = 0.0552*vcell;    % uL
vjsr = 0.0048*vcell;    % uL
vsr  = cVsr*(vnsr+vjsr); % uL
vss  = cVss*0.02*vcell; % uL
%
%
```

```

%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% CaMK Constants
KmCaMK = 0.15;  aCaMK  = 0.05;  bCaMK  = 0.00068;
CaMKo  = 0.05;
KmCaM  = 0.0015;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% update CaMK -> X(41)
CaMKb  = CaMKo*(1.0-CaMKt) / (1.0+KmCaM/cass);
CaMKa  = CaMKb+CaMKt;
dCaMKt = aCaMK*CaMKb*(CaMKb+CaMKt) - bCaMK*CaMKt;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% Reversal Potentials
ENa    = (R*T/F)*log(nao/nai);
EK     = (R*T/F)*log(ko/ki);
PKNa   = 0.01833;
EKs    = (R*T/F)*log((ko+PKNa*nao)/(ki+PKNa*nai));
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% INa current
mss=1.0/(1.0+exp(-(v+39.57)/9.871));
tm=1.0/(6.765*exp((v+11.64)/34.77)+8.552*exp(-(v+77.42)/5.955));
dm=(mss-m)/tm;
hss=1.0/(1+exp((v+82.90)/6.086));
thf=1.0/(1.432e-5*exp(-(v+1.196)/6.285)+6.149*exp((v+0.5096)/20.27));
ths=1.0/(0.009794*exp(-(v+17.95)/28.05)+0.3343*exp((v+5.730)/56.66));
Ahf=0.99;
Ahs=1.0-Ahf;
dhf=(hss-hf)/thf;
dhs=(hss-hs)/ths;
h=Ahf*hf+Ahs*hs;
jss=hss;
tj=2.038+1.0/(0.02136*exp(-
(v+100.6)/8.281)+0.3052*exp((v+0.9941)/38.45));
dj=(jss-j)/tj;
hssp=1.0/(1+exp((v+89.1)/6.086));
thsp=3.0*ths;
dhsp=(hssp-hsp)/thsp;
hp=Ahf*hf+Ahs*hs;
tjp=1.46*tj;
djp=(jss-jp)/tjp;
GNa=75;
fINap=(1.0/(1.0+KmCaMK/CaMKa));
INa=Ib(1)*GNa*(v-ENa)*m^3.0*((1.0-fINap)*h*j+fINap*hp*jp);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% INaL current
mLss=1.0/(1.0+exp(-(v+42.85)/5.264));
tmL=tm;
dmL=(mLss-mL)/tmL;
hLss=1.0/(1.0+exp((v+87.61)/7.488));
thL=200.0;
dhL=(hLss-hL)/thL;
hLssp=1.0/(1.0+exp((v+93.81)/7.488));
thLp=3.0*thL;
dhLp=(hLssp-hLp)/thLp;
GNaL=0.0075;
if celltype==1

```

```

    GNAL=GNAL*0.6;
end
fINaLp=(1.0/(1.0+KmCaMK/CaMKa));
INaL=Ib(2)*GNAL*(v-ENa)*mL*((1.0-fINaLp)*hL+fINaLp*hLp);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%
%% Ito current
ass=1.0/(1.0+exp((-v-14.34)/14.82));
ta=1.0515 / (1.0/(1.2089*(1.0+exp(-(v-18.4099)/29.3814)))+...
            3.5/(1.0+exp((v+100.0)/29.3814)));
da=(ass-a)/ta;
iss=1.0/(1.0+exp((v+43.94)/5.711));
if celltype==1
    delta_epi=1.0-(0.95/(1.0+exp((v+70.0)/5.0)));
else
    delta_epi=1.0;
end
tiF=4.562+1/(0.3933*exp((-
(v+100.0))/100.0)+0.08004*exp((v+50.0)/16.59));
tiS=23.62+1/(0.001416*exp((-v+96.52)/59.05)+...
            1.780e-8*exp((v+114.1)/8.079));
tiF=tiF*delta_epi;
tiS=tiS*delta_epi;
AiF=1.0/(1.0+exp((v-213.6)/151.2));
AiS=1.0-AiF;
diF=(iss-iF)/tiF;
diS=(iss-iS)/tiS;
i=AiF*iF+AiS*iS;
assp=1.0/(1.0+exp((-v-24.34)/14.82));
dap=(assp-ap)/ta;
dti_develop=1.354+1.0e-4/(exp((v-167.4)/15.89)+exp(-(v-12.23)/0.2154));
dti_recover=1.0-0.5/(1.0+exp((v+70.0)/20.0));
tiFp=dti_develop*dti_recover*tiF;
tiSp=dti_develop*dti_recover*tiS;
diFp=(iss-iFp)/tiFp;
diSp=(iss-iSp)/tiSp;
ip=AiF*iFp+AiS*iSp;
Gto=0.02;
if celltype==1
    Gto=Gto*4.0;
elseif celltype==2
    Gto=Gto*4.0;
end
fItop=(1.0/(1.0+KmCaMK/CaMKa));
Ito=Ib(3)*Gto*(v-EK)*((1.0-fItop)*a*i+fItop*ap*ip);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%
%% ICaL, ICaNa, ICaK current
%
% p vs np ICaL
fICaLp=(1.0/(1.0+KmCaMK/CaMKa))*(1-annullo_p);
% CDI SpeedUps:
% 1) sp1 acts on gamma & delta
% 2) sp2 acts on eta & theta
% 3) sp3 acts on gamma & theta -> NO!!!
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%
%% up/down rates
r_down = bn*(klr_down)*(1-annullo_CDI);
% r_up = (klr_up/(1+(k2r_up/cass)^4))*(1-annullo_CDI);
r_up = bn*(r_down*nca/(1-nca))*(1-annullo_CDI);

```

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% n gate -> usato per calcolare nca
jncass = jncass_n/(1.0+exp((v+jncass_s)/jncass_d))+jncass_k;
% fss=1.0/(1.0+exp((v+19.58)/3.696));
tjnca = tau_nca;
djncass = (jncass-tjnca)/tjnca;
Kmn = Kmn_nca;
k2n = k2n_nca;
km2n = km2n_nca*jnca;
anca=1/(k2n/km2n+(1.0+Kmn/cass)^4.0);
dnca=bn*(anca*k2n-nca*km2n);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
% Activation (d)
% dss = 1.0/(1.0+exp((-v+3.940)/4.230));
% td = 0.6+1.0/(exp(-0.05*(v+6.0))+exp(0.09*(v+14.0)));
dss = dss_n/(1.0+exp((-v+dss_s)/dss_d))+dss_k;
td = (taud_k+1.0/(exp(taud_k1*(v+taud_s1))+exp(taud_k2*(v+taud_s2))
));
alpha = dss/td;
beta = (1-dss) / td;
% dss = alpha / (alpha+beta);
% td = 1 / (alpha+beta);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% Recovery (jca)
jcass_new= jrecss_n/(1.0+exp((v+jrecss_s)/jrecss_d)) + jrecss_k;
jcass_VD = jcass_new;
jcass_CD = jcass_new;
jcass_VDp = jcass_new;
jcass_CDP = jcass_new;
tjca_new = tjrec_min + tjrec_max*exp(-(v-tjrec_media)^2/(2*tjrec_sd^2));
tjca_VD = tjca_new;
tjca_VDp = tjca_new;
tjca_CD = tjca_new;
tjca_CDP = tjca_new;
% psi and omega rates
psi_VD=jcass_VD/tjca_VD;
psi_VDp=jcass_VDp/tjca_VDp;
psi_CD=jcass_CD/tjca_CD;
psi_CDP=jcass_CDP/tjca_CDP;
omega_VD=(1-jcass_VD)/tjca_VD;
omega_VDp=(1-jcass_VDp)/tjca_VDp;
omega_CD=(1-jcass_CD)/tjca_CD;
omega_CDP=(1-jcass_CDP)/tjca_CDP;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
% Fact Inactivation (f1)
% flss = 1.0 / (1.0+exp((v+19.58)/3.696));
% tff = 7.0 + 1.0/(0.0045*exp(-
(v+20.0)/10.0)+0.0045*exp((v+20.0)/10.0));
% tfcaf = 7.0 + 1.0/(0.04*exp(-(v-4.0)/7.0)+0.04*exp((v-4.0)/7.0));
flss_0 = flss_n / (1.0+exp((v+flss_s)/flss_d)) + flss_k;
tf1_0 = tf1_kk*(tf1_k + tf1_n./
(tf1_k1*exp((v+tf1_s1)/tf1_d1)+tf1_k2*exp((v+tf1_s2)/tf1_d2)));
ktaup = 2.5;
gamma_VD = s11*s13*(1-flss_0)/ tf1_0;
delta_VD = s11* flss_0 / tf1_0;
gamma_VDp = gamma_VD/ktaup;
delta_VDp = delta_VD/ktaup;

```

```

gamma_CD=sp1*gamma_VD*kCDI;
delta_CD=sp1*delta_VD*kCDI;
gamma_CDp=sp1*gamma_VDp*kCDI;
delta_CDp=sp1*delta_VDp*kCDI;
tf1_VD = 1/(gamma_VD+delta_VD);
tf1_CD = 1/(gamma_CD+delta_CD);
flss_VD = gamma_VD / (gamma_VD+delta_VD);
flss_CD = gamma_CD / (gamma_CD+delta_CD);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
% Slow Inactivation (f2)
% fss=1.0/(1.0+exp((v+19.58)/3.696));
% tfs=1000.0+1.0/(0.000035*exp(-(v+5.0)/4.0)+0.000035*exp((v+5.0)/6.0));
% tfcas=100.0+1.0/(0.00012*exp(-v/3.0)+0.00012*exp(v/7.0));
tf2_new = tf2_kk*(tf2_k + tf2_n./
(tf2_k1*exp((v+tf2_s1)/tf2_d1)+tf2_k2*exp((v+tf2_s2)/tf2_d2)));
tf2_VD = tf2_new;
tf2_CD = tf2_VD/kCDI;
tf2_VDp = tf2_new*ktaup;
tf2_CDp = tf2_VD/kCDI*ktaup;
% Reversibility
theta_VD =
alpha*gamma_VD*psi_VD/tf2_VD/(alpha*gamma_VD*psi_VD+beta*delta_VD*omega_VD);
theta_CD =
alpha*gamma_CD*psi_CD/tf2_CD/(alpha*gamma_CD*psi_CD+beta*delta_CD*omega_CD);
theta_VDp =
alpha*gamma_VDp*psi_VDp/tf2_VDp/(alpha*gamma_VDp*psi_VDp+beta*delta_VDp*omega_VDp);
theta_CDp =
alpha*gamma_CDp*psi_CDp/tf2_CDp/(alpha*gamma_CDp*psi_CDp+beta*delta_CDp*omega_CDp);
eta_VD=1/tf2_VD - theta_VD;
eta_VDp=1/tf2_VDp - theta_VDp;
eta_CD=1/tf2_CD - theta_CD;
eta_CDp=1/tf2_CDp - theta_CDp;
% Speed Ups
eta_VD=eta_VD*s12;
eta_VDp=eta_VDp*s12;
theta_VD=theta_VD*s12;
theta_VDp=theta_VDp*s12;
eta_CD=eta_CD*sp2;
eta_CDp=eta_CDp*sp2;
theta_CD=theta_CD*sp2;
theta_CDp=theta_CDp*sp2;
tf2_VD = 1/(eta_VD+theta_VD);
tf2_CD = 1/(eta_CD+theta_CD);
f2ss_VD=eta_VD/(eta_VD+theta_VD);
f2ss_CD=eta_CD/(eta_CD+theta_CD);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
% Driving Forces
PhiCaL=4.0*vffrt*(cass*exp(2.0*vfrt)-0.341*cao)/(exp(2.0*vfrt)-1.0);
PhiCaNa=1.0*vffrt*(0.75*nass*exp(1.0*vfrt)-0.75*nao)/(exp(1.0*vfrt)-1.0);
PhiCaK=1.0*vffrt*(0.75*kss*exp(1.0*vfrt)-0.75*ko)/(exp(1.0*vfrt)-1.0);
PCa=0.0001*cPCa;
if celltype==1
    PCa=PCa*1.2;
elseif celltype==2

```



```

    PCa=PCa*2.5;
end
PCap=1.1*PCa;
PCaNa=0.00125*PCa;
PCaK=3.574e-4*PCa;
PCaNap=0.00125*PCap;
PCaKp=3.574e-4*PCap;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
% Markov Model: VDI states
OCak = 1-CCak-I1Cak-I2Cak-Ck-I1k-I2k-Ok;
OCakp = 1-CCakp-I1Cakp-I2Cakp-Ckp-I1kp-I2kp-Okp;
dOk = alpha*Ck + delta_VD*I1k - (beta+gamma_VD)*Ok -
r_up*Ok + r_down*OCak;
dI2k = eta_VD*I1k + omega_VD*Ck - (theta_VD+psi_VD)*I2k -
r_up*I2k + r_down*I2Cak;
dI1k = theta_VD*I2k + gamma_VD*Ok - (eta_VD+delta_VD)*I1k -
r_up*I1k + r_down*I1Cak;
dCk = beta*Ok + psi_VD*I2k - (omega_VD+alpha)*Ck -
r_up*Ck + r_down*CCak;
dOkp = alpha*Ckp + delta_VDp*I1kp - (beta+gamma_VDp)*Okp -
r_up*Okp + r_down*OCakp;
dI2kp = eta_VDp*I1kp + omega_VDp*Ckp - (theta_VDp+psi_VDp)*I2kp -
r_up*I2kp + r_down*I2Cakp;
dI1kp = theta_VDp*I2kp + gamma_VDp*Okp - (eta_VDp+delta_VDp)*I1kp -
r_up*I1kp + r_down*I1Cakp;
dCkp = beta*Okp + psi_VDp*I2kp - (omega_VDp+alpha)*Ckp -
r_up*Ckp + r_down*CCakp;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
% Markov Model: CDI states
dI2Cak = eta_CD*I1Cak + omega_CD*CCak - (theta_CD+psi_CD)*I2Cak +
r_up*I2k - r_down*I2Cak;
dI1Cak = theta_CD*I2Cak + gamma_CD*OCak - (eta_CD+delta_CD)*I1Cak +
r_up*I1k - r_down*I1Cak;
dCCak = beta*OCak + psi_CD*I2Cak - (omega_CD+alpha)*CCak +
r_up*Ck - r_down*CCak;
dI2Cakp = eta_CDP*I1Cakp + omega_CDP*CCakp -
(theta_CDP+psi_CDP)*I2Cakp + r_up*I2kp - r_down*I2Cakp;
dI1Cakp = theta_CDP*I2Cakp + gamma_CDP*OCakp -
(eta_CDP+delta_CDP)*I1Cakp + r_up*I1kp - r_down*I1Cakp;
dCCakp = beta*OCakp + psi_CDP*I2Cakp - (omega_CDP+alpha)*CCakp +
r_up*Ckp - r_down*CCakp;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
% Reversibility
if check_reversibility > 0
revTol = check_reversibility;
rev1=abs(alpha*gamma_VD*eta_VD*psi_VD-beta*delta_VD*theta_VD*omega_VD);
rev2=abs(alpha*gamma_VDp*eta_VDp*psi_VDp-
beta*delta_VDp*theta_VDp*omega_VDp);
rev3=abs(alpha*gamma_CD*eta_CD*psi_CD-beta*delta_CD*theta_CD*omega_CD);
rev4=abs(alpha*gamma_CDP*eta_CDP*psi_CDP-
beta*delta_CDP*theta_CDP*omega_CDP);
if rev1>revTol || rev2>revTol || rev3>revTol || rev4>revTol
disp('REVERSIBILITY FAILED');
end
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
% ICaL ICaNa ICaK currents

```

```

ICaL_VD = Ib(4)*PCa *PhiCaL *Ok;
ICaL_VDp = Ib(4)*PCap *PhiCaL *Okp;
ICaL_CD = Ib(4)*PCa *PhiCaL *OCak;
ICaL_CDP = Ib(4)*PCap *PhiCaL *OCakp;
ICaNa_VD = Ib(4)*PCaNa *PhiCaNa *Ok;
ICaNa_VDp = Ib(4)*PCaNap *PhiCaNa *Okp;
ICaNa_CD = Ib(4)*PCaNa *PhiCaNa *OCak;
ICaNa_CDP = Ib(4)*PCaNap *PhiCaNa *OCakp;
ICaK_VD = Ib(4)*PCaK *PhiCaK *Ok;
ICaK_VDp = Ib(4)*PCaKp *PhiCaK *Okp;
ICaK_CD = Ib(4)*PCaK *PhiCaK *OCak;
ICaK_CDP = Ib(4)*PCaKp *PhiCaK *OCakp;
% ICaL VD vs CD & ICaL p vs np
ICaLnp = ICaL_VD + ICaL_CD;
ICaLp = ICaL_VDp + ICaL_CDP;
ICaLVD = ICaL_VD*(1-fICaLp) + ICaL_VDp*fICaLp;
ICaLCD = ICaL_CD*(1-fICaLp) + ICaL_CDP*fICaLp;

ICaNanp = ICaNa_VD + ICaNa_CD;
ICaNap = ICaNa_VDp + ICaNa_CDP;
ICaKnp = ICaK_VD + ICaK_CD;
ICaKp = ICaK_VDp + ICaK_CDP;

ICaL = ICaLp*fICaLp + ICaLnp*(1-fICaLp);
ICaNa = ICaNap*fICaLp + ICaNanp*(1-fICaLp);
ICaK = ICaKp*fICaLp + ICaKnp*(1-fICaLp);

% ICaL conductance*
gICaL = ICaL/PhiCaL;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% IKr current
xrss=1.0/(1.0+exp((-v+8.337)/6.789));
txrf=12.98+1.0/(0.3652*exp((v-31.66)/3.869)+...
4.123e-5*exp((-v-47.78)/20.38));
txrs=1.865+1.0/(0.06629*exp((v-34.70)/7.355)+...
1.128e-5*exp((-v-29.74)/25.94));
Axrf=1.0/(1.0+exp((v+54.81)/38.21));
Axrs=1.0-Axrf;
dxrf=(xrss-xrf)/txrf;
dxrs=(xrss-xrs)/txrs;
xr=Axrf*xrf+Axrs*xrs;
rkr=1.0/(1.0+exp((v+55.0)/75.0))*1.0/(1.0+exp((v-10.0)/30.0));
GKr=0.046*bGKr;
if celltype==1
    GKr=GKr*1.3;
elseif celltype==2
    GKr=GKr*0.8;
end
IKr=Ib(5)*GKr*sqrt(ko/5.4)*xr*rkr*(v-EK);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% IKs current
xslss=1.0/(1.0+exp((-v+11.60)/8.932));
txs1=817.3+1.0/(2.326e-4*exp((v+48.28)/17.80)+...
0.001292*exp((-v+210.0)/230.0));
dxs1=(xslss-xsl)/txs1;
xs2ss=xslss;
txs2=1.0/(0.01*exp((v-50.0)/20.0)+0.0193*exp((-v+66.54)/31.0));
dxs2=(xs2ss-xsl)/txs2;
KsCa=1.0+0.6/(1.0+(3.8e-5/cai)^1.4);

```

```

GKs=0.0034;
if celltype==1
    GKs=GKs*1.4;
end
IKs=Ib(6)*GKs*KsCa*xs1*xs2*(v-EKs);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% IK1 current
xk1ss=1.0/(1.0+exp(-(v+2.5538*ko+144.59)/(1.5692*ko+3.8115)));
txk1=122.2/(exp(-(v+127.2)/20.36)+exp((v+236.8)/69.33));
dxk1=(xk1ss-xk1)/txk1;
rk1=1.0/(1.0+exp((v+105.8-2.6*ko)/9.493));
GK1=0.1908;
if celltype==1
    GK1=GK1*1.2;
elseif celltype==2
    GK1=GK1*1.3;
end
IK1=Ib(7)*GK1*sqrt(ko)*rk1*xk1*(v-EK);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% INaCa current
kna1=15.0;      kna2=5.0;      kna3=88.12;      kasymm=12.5;
wna=6.0e4;     wca=6.0e4;     wnaca=5.0e3;     KmCaAct=150.0e-6;
kcaon=1.5e6;   kcaoff=5.0e3;   qna=0.5224;     qca=0.1670;
zna=1.0;      Gncx=0.0008*bGncx;   zca=2.0;
if celltype==1
    Gncx=Gncx*1.1;
elseif celltype==2
    Gncx=Gncx*1.4;
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
% INaCa_i current
hca=exp((qca*v*F)/(R*T));      hna=exp((qna*v*F)/(R*T));
h1=1+nai/kna3*(1+hna);         h2=(nai*hna)/(kna3*h1);
h3=1.0/h1;                     h4=1.0+nai/kna1*(1+nai/kna2);
h5=nai*nai/(h4*kna1*kna2);     h6=1.0/h4;
h7=1.0+nao/kna3*(1.0+1.0/hna); h8=nao/(kna3*hna*h7);
h9=1.0/h7;                     h10=kasymm+1.0+nao/kna1*(1.0+nao/kna2);
h11=nao*nao/(h10*kna1*kna2);   h12=1.0/h10;

k1=h12*cao*kcaon;   k2=kcaoff;      k3p=h9*wca;      k3pp=h8*wnaca;
k3=k3p+k3pp;       k4p=h3*wca/hca; k4pp=h2*wnaca;  k4=k4p+k4pp;
k5=kcaoff;         k6=h6*cai*kcaon; k7=h5*h2*wna;   k8=h8*h11*wna;

x1=k2*k4*(k7+k6)+k5*k7*(k2+k3); x2=k1*k7*(k4+k5)+k4*k6*(k1+k8);
x3=k1*k3*(k7+k6)+k8*k6*(k2+k3); x4=k2*k8*(k4+k5)+k3*k5*(k1+k8);

E1=x1/(x1+x2+x3+x4);   E2=x2/(x1+x2+x3+x4);
E3=x3/(x1+x2+x3+x4);   E4=x4/(x1+x2+x3+x4);

allo=1.0/(1.0+(KmCaAct/cai)^2.0);
JncxNa=3.0*(E4*k7-E1*k8)+E3*k4pp-E2*k3pp;
JncxCa=E2*k2-E1*k1;
%
INaCa_i=Ib(8)*0.8*Gncx*allo*(zna*JncxNa+zca*JncxCa);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
% INaCa_ss current

```

|Appendice: Codice MATLAB

```

h1=1+nass/kna3*(1+hna);          h2=(nass*hna)/(kna3*h1);
h3=1.0/h1;                       h4=1.0+nass/kna1*(1+nass/kna2);
h5=nass*nass/(h4*kna1*kna2);     h6=1.0/h4;
h7=1.0+nao/kna3*(1.0+1.0/hna);   h8=nao/(kna3*hna*h7);
h9=1.0/h7;                       h10=kasymm+1.0+nao/kna1*(1+nao/kna2);
h11=nao*nao/(h10*kna1*kna2);    h12=1.0/h10;

k1=h12*cao*kcaon;   k2=kcaoff;   k3p=h9*wca;   k3pp=h8*wnaca;
k3=k3p+k3pp;       k4p=h3*wca/hca; k4pp=h2*wnaca; k4=k4p+k4pp;
k5=kcaoff;         k6=h6*cass*kcaon; k7=h5*h2*wna; k8=h8*h11*wna;

x1=k2*k4*(k7+k6)+k5*k7*(k2+k3);  x2=k1*k7*(k4+k5)+k4*k6*(k1+k8);
x3=k1*k3*(k7+k6)+k8*k6*(k2+k3);  x4=k2*k8*(k4+k5)+k3*k5*(k1+k8);

E1=x1/(x1+x2+x3+x4);   E2=x2/(x1+x2+x3+x4);
E3=x3/(x1+x2+x3+x4);   E4=x4/(x1+x2+x3+x4);

allo=1.0/(1.0+(KmCaAct/cass)^2.0);
JncxNa=3.0*(E4*k7-E1*k8)+E3*k4pp-E2*k3pp;
JncxCa=E2*k2-E1*k1;
%
INaCa_ss=Ib(8)*0.2*Gncx*allo*(zna*JncxNa+zca*JncxCa);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%
%% INaK current
k1p=949.5;   k1m=182.4;   k2p=687.2;   k2m=39.4;
k3p=1899.0; k3m=79300.0; k4p=639.0;   k4m=40.0;
Knaio=9.073; Knao0=27.78; delta2=-0.1550;
Knaio=Knaio*exp((delta2*v*F)/(3.0*R*T));
Knao0=Knao0*exp(((1.0-delta2)*v*F)/(3.0*R*T));
Kki=0.5;      Kko=0.3582;   MgADP=0.05;   MgATP=9.8;
Kmgatp=1.698e-7; H=1.0e-7;   eP=4.2;      Khp=1.698e-7;
Knap=224.0;   Kxkur=292.0;
P=eP/(1.0+H/Khp+nai/Knap+ki/Kxkur);

a1=(k1p*(nai/Knaio)^3.0)/((1.0+nai/Knaio)^3.0+(1.0+ki/Kki)^2.0-1.0);
b1=k1m*MgADP;
a2=k2p;
b2=(k2m*(nao/Knao)^3.0)/((1.0+nao/Knao)^3.0+(1.0+ko/Kko)^2.0-1.0);
a3=(k3p*(ko/Kko)^2.0)/((1.0+nao/Knao)^3.0+(1.0+ko/Kko)^2.0-1.0);
b3=(k3m*P*H)/(1.0+MgATP/Kmgatp);
a4=(k4p*MgATP/Kmgatp)/(1.0+MgATP/Kmgatp);
b4=(k4m*(ki/Kki)^2.0)/((1.0+nai/Knaio)^3.0+(1.0+ki/Kki)^2.0-1.0);

x1=a4*a1*a2+b2*b4*b3+a2*b4*b3+b3*a1*a2;
x2=b2*b1*b4+a1*a2*a3+a3*b1*b4+a2*a3*b4;
x3=a2*a3*a4+b3*b2*b1+b2*b1*a4+a3*a4*b1;
x4=b4*b3*b2+a3*a4*a1+b2*a4*a1+b3*b2*a1;

E1=x1/(x1+x2+x3+x4);   E2=x2/(x1+x2+x3+x4);
E3=x3/(x1+x2+x3+x4);   E4=x4/(x1+x2+x3+x4);
zk=1.0;   JnakNa=3.0*(E1*a3-E2*b3);   JnakK=2.0*(E4*b1-E3*a1);
Pnak=30;
if celltype==1
    Pnak=Pnak*0.9;
elseif celltype==2
    Pnak=Pnak*0.7;
end
INaK=Ib(9)*Pnak*(zna*JnakNa+zk*JnakK);

```

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% CaCl current:
Cli = 15; % Intracellular Cl [mM]
Clo = 150; % Extracellular Cl [mM]
ecl = (R*T/F)*log(Cli/Clo); % [mV]
GClCa = 0.5* 0.109625; % [mS/uF]
GClB = 1*9e-3; % [mS/uF]
KdClCa = 100e-3; % [mM]
IClCa = IClCa_si*GClCa/(1+KdClCa/cass)*(v-ecl);
IClBk = IClb_si*GClB*(v-ecl);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% Background currents: IKb, INab, ICab
% IKb current
xkb = 1.0 / (1.0+exp(-(v-14.48)/18.34));
GKb = 0.003;
if celltype==1
    GKb = GKb*0.6;
end
IKb = GKb*xkb*(v-EK);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
% INab current
PNab = 3.75e-10;
INab = PNab*vffrt*(nai*exp(vfirt)-nao)/(exp(vfirt)-1.0);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
% ICab current
PCab = 2.5e-8;
ICab = (1-annullo_ICab)*PCab*4.0*vffrt*(cai*exp(2.0*vfirt)-
0.341*cao)/(exp(2.0*vfirt)-1.0);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% IpCa current
GpCa = 0.0005;
IpCa = GpCa*cai/(0.0005+cai);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% Simulation Procotols
switch pstim(1)
    case 1
        % 1 - Current_Clamp -> Single Istim current
        amp = -80.0;
        duration = 0.5;
        if t <= duration
            Istim = amp;
        else
            Istim = 0.0;
        end
        % update V -> X(1)
        dv = - (INa+INaL+Ito+ICaL+ICaNa+ICaK+IKr+IKs+IKl+...
INaCa_i+INaCa_ss+INaK+INab+IKb+IpCa+ICab+Istim+IClCa+IClBk);
    case 2
        % 2 - Current_Clamp -> Istim current with fixed CL
        CL = pstim(2);
        amp = -80.0;
        duration = 0.5;
        trem = rem(t,CL);
        if trem <= duration

```

```

        Istim = amp;
    else
        Istim = 0.0;
    end
    % update V -> X(1)
    dv = - (INa+INaL+Ito+ICaL+ICaNa+ICaK+IKr+IKs+IKl+...
INaCa_i+INaCa_ss+INaK+INab+IKb+IpCa+ICab+Istim+IClCa+IClbc);
    case 3
        % 3 - Voltage_Clamp (Ely), with single Vclamp-step
        Istim = 0;
        % update V -> X(1)
        dv = 0;
    case 4
        % 4 - Voltage_Clamp (Grandi), with single Vclamp-step
        Rclamp=0.02;
        Istim = (v-pstim(2))/Rclamp;
        % update V -> X(1)
        dv = - (INa+INaL+Ito+ICaL+ICaNa+ICaK+IKr+IKs+IKl+...
INaCa_i+INaCa_ss+INaK+INab+IKb+IpCa+ICab+Istim+IClCa+IClbc);
    end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% Diffusion Fluxes
JdiffNa = (nass-nai) /2.0;
JdiffK = (kss-ki) /2.0;
Jdiff = (cass-cai) *bJdiff/0.2;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
% RyRs CICR from JSR
bt=4.75; a_rel=a2_rel*0.5*bt;
Jrel_inf=a_rel*(-ICaL)/(n2_rel+(n_rel/(casr+s_rel))^exp_rel);
if celltype==2
    Jrel_inf=Jrel_inf*1.7;
end
tau_rel=ntaul_rel*bt/(1.0+ntau2_rel/casr);
if tau_rel<0.001
    tau_rel=0.001;
end
dJrelnp=(Jrel_inf-Jrelnp)/tau_rel;

btp=1.25*bt; a_relp=a2_rel*0.5*btp;
Jrel_infp=a_relp*(-ICaL)/(n2_rel+(n_rel/(casr+s_rel))^exp_rel);
if celltype==2
    Jrel_infp=Jrel_infp*1.7;
end
tau_relp=ntaul_rel*btp/(1.0+ntau2_rel/casr);
if tau_relp<0.001
    tau_relp=0.001;
end
dJrelnp=(Jrel_infp-Jrelnp)/tau_relp;
fJrelnp=(1.0/(1.0+KmCaMK/CaMKa));
Jrel=Ib(11)*((1.0-fJrelnp)*Jrelnp+fJrelnp*Jrelnp);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
% Ca2+ Uptake Flux
Jupnp=0.004375*cai/(cai+0.00092);
Jupp=2.75*0.004375*cai/(cai+0.00092-0.00017);
if celltype==1
    Jupnp=Jupnp*1.3;
    Jupp=Jupp*1.3;

```

```

end
fJupp=(1.0/(1.0+KmCaMK/CaMKa));
Jleak=0.0039375*casr/15.0;
Jup = cJup*Ib(10)*((1.0-fJupp)*Jupnp+fJupp*Jupp-Jleak);
Vmax_SRCaP = 1.0*5.3114e-3; % [mM/msec] (286 umol/L cytosol/sec)
Kmf = 0.246e-3; % [mM] default
Kmr = 1.7; % [mM]L cytosol
hillSRCaP = 1.787; % [mM]
Jup2=Vmax_SRCaP*((cai/Kmf)^hillSRCaP-(casr/Kmr)^hillSRCaP)...
/(1+(cai/Kmf)^hillSRCaP+(casr/Kmr)^hillSRCaP);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% Tranlocation Flux
Jtr=0;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% Calcium Buffer Constants
cmdnmax=0.05;
if celltype==1
    cmdnmax=cmdnmax*1.3;
end
kmcmdn=0.00238; trpnmax=0.07; kmtrpn=0.0005;
BSRmax=0.047; KmBSR=0.00087;
BSLmax=1.124; KmBSL=0.0087;
csqnmax=10.0; kmcsqn=0.8;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% EGTA
if maxEGTA==0
    dEGTA=0;
    dEGTAi=0;
else
    % Hellam & Podolsky Values
    kon=2; %mM^-1 ms^-1
    koff=4.0e-4; %ms^-1
    dEGTA=kon*cass*(maxEGTA-EGTA)-koff*EGTA;
    dEGTAi=0;
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%
%% update intracellular [Na], [K] and [Ca]
% [Na]
dnai=-
(INa+INaL+3.0*INaCa_i+3.0*INaK+INab)*Acap/(F*vmyo)+JdiffNa*vss/vmyo;
dnass=-(ICaNa+3.0*INaCa_ss)*Acap/(F*vss)-JdiffNa;
% [K]
if ki_cost==0
dki=- (Ito+IKr+IKs+IKl+IKb+Istim-2.0*INaK)*Acap/(F*vmyo)+JdiffK*vss/vmyo;
dkss=-(ICaK)*Acap/(F*vss)-JdiffK;
else
dki=0;
dkss=0;
end
% [Ca]
Bcai = 1.0 / (1.0+cmdnmax*kmcmdn/(kmcmdn+cai)^2.0 + ...
trpnmax*kmtrpn/(kmtrpn+cai)^2.0);
dcai = Bcai*(-(IpCa+ICab-2.0*INaCa_i)*Acap/(2.0*F*vmyo) - ...
Jup*vsr/vmyo+Jdiff*vss/vmyo-dEGTAi);
Bcass = 1.0/(1.0+BSRmax*KmBSR/(KmBSR+cass)^2.0 + ...
BSLmax*KmBSL/(KmBSL+cass)^2.0);

```

```

dcass = Bcass*(-(ICaL-2.0*INaCa_ss)*Acap/(2.0*F*vss) +...
        Jrel*vsr/vss-Jdiff-dEGTA);
Bcasr = 1.0/(1.0+csqnmmax*kmcsqn/(kmcsqn+casr)^2.0);
dcasr = Bcasr*(Jup-Jrel);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%
%% Output Computation
% When flag==1 -> dX
if flag_ode==1
    output=[dv          dnai      dnass      dki        dkss...      % 1
            dcai      dcass      0          dcasr      dm...        % 2
            dhf       dhs       dj         dhsp       djp...       % 3
            dmL       dhL       dhLp       da         diF...       % 4
            diS       dap       diFp       diSp       0 ...       % 5
            dOk       dOkp      0          0          0 ...       % 6
            dnca      0         0          dxrf       dxrs...      % 7
            dxs1      dxs2      dxk1      dJrelnp    dJrelp...    % 8
            dCaMKt    dI1k     dI2k      dCk        dI1kp...     % 9
            dI2kp     dCkp     dI1Cak    dI2Cak     dCCak...     % 10
            dI1Cakp   dI2Cakp  dCCakp    djnca      dEGTA...     % 11
            dEGTAi    0         0          0          0]';
% When flag==0 -> Computed Variables: currents, concentrations and
fluxes
else
    output=[INa        INaL      Ito        ICaL        IKr...      % 1
            IKs        IK1       INaCa_i    INaCa_ss    INaK...     % 2
            IKb        INab     ICab       IpCa        Jdiff...    % 3
            JdiffNa    JdiffK    Jup        Jleak       Jtr...      % 4
            Jrel       CaMKa     Istim      ICaK        ICaNa...    % 5
            fICaLp     PhiCaL    KmN        k2n         km2n...     % 6
            Jup        Jup2     anca       r_up        dss...      % 7
            r_up       r_down   eta_VDp    eta_CDp     td...       % 8
            tjca_VD    tf1_VD   tf2_VD     tf1_CD      tf2_CD...   % 9
            alpha      beta     theta_VDp  theta_CDp   omega_VD... % 10
            omega_VDp  omega_CD  omega_CDp  psi_VD      psi_VDp...  % 11
            psi_CD     psi_CDp   gamma_VD   gamma_VDp   gamma_CD... % 12
            gamma_CDp  delta_VD  delta_VDp  delta_CD    delta_CDp... % 13
            eta_VD     eta_CD   theta_VD   theta_CD    flss_VD...  % 14
            flss_CD    f2ss_VD  f2ss_CD    jcass_VD    jcass_CD... % 15
            tjca_VD    tjca_CD  jcass_VDp  jcass_CDp   gICaL...    % 16
            ICaLVD     ICaLCD   ICaLp      ICaLnp     OCak...     % 17
            ICaL_VDp   ICaL_CDp ICaL_VD    ICaL_CD     OCakp...    % 18
            IC1Ca     IC1bk    0 0 0]';
end

```


BIBLIOGRAFIA

- [1] A. L. Hodgkin and A. F. Huxley, "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve," *J. Physiol.*, vol. 117, pp. 500-544, 1952.
- [2] A. L. Hodgkin and A. F. Huxley, "The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of loligo," *J. Physiol.*, vol. 116, pp. 497-506, 1952.
- [3] A. L. Hodgkin and A. F. Huxley, "Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of loligo," *J. Physiol.*, vol. 116, pp. 449-472, 1952.
- [4] W. F. Ganong, *Fisiologia Medica*, 9a edizion. 2001.
- [5] A. Guidotti, "Modelli matematici della eccitabilità cellulare," Università di Bologna, 2005.
- [6] R. M. Berne, *Fisiologia*. 2010.
- [7] D. M. Bers, "Cardiac excitation-contraction coupling," *Nature*, vol. 415, no. 6868, pp. 198-205, 2002.
- [8] D. Noble, "A modification of the Hodgkin-Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pacemaker potentials," *J. Physiol.*, vol. 160, pp. 317-352, 1962.
- [9] D. Di Francesco and D. Noble, "A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes.," *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 307, no. 1133, pp. 353-98, Jan. 1985.
- [10] L. Priebe and D. J. Beuckelmann, "Simulation study of cellular electric properties in heart failure," *Circ. Res.*, vol. 82, no. 11, pp. 1206-1223, 1998.
- [11] T. R. Shannon, F. Wang, J. Puglisi, C. Weber, and D. M. Bers, "A mathematical treatment of integrated Ca dynamics within the ventricular myocyte.," *Biophys. J.*, vol. 87, no. 5, pp. 3351-71, Nov. 2004.

- [12] K. H. W. J. Ten Tusscher and a V Panfilov, "Cell model for efficient simulation of wave propagation in human ventricular tissue under normal and pathological conditions.," *Phys. Med. Biol.*, vol. 51, no. 23, pp. 6141-56, Dec. 2006.
- [13] E. Grandi, F. S. Pasqualini, and D. M. Bers, "A novel computational model of the human ventricular action potential and Ca transient.," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 48, no. 1, pp. 112-21, Jan. 2010.
- [14] T. O'Hara, L. Virág, A. Varró, and Y. Rudy, "Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: model formulation and experimental validation.," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 7, no. 5, p. e1002061, May 2011.
- [15] E. Passini and S. Severi, "Extracellular Calcium and L-Type Calcium Current Inactivation Mechanisms: a Computational Study," *Comput. Cardiol.*, vol. 40, 2013.
- [16] K. F. Decker, J. Heijman, J. R. Silva, T. J. Hund, and Y. Rudy, "Properties and ionic mechanisms of action potential adaptation, restitution, and accommodation in canine epicardium," *Am J Physiol Hear. Circ. Physiol.*, vol. 296, pp. H1017-H1026, 2009.
- [17] J. Kim, S. Ghosh, D. A. Nunziato, G. S. Pitt, and N. York, "Identification of the Components Controlling Inactivation of Voltage-Gated Ca²⁺ Channels," *Neuron*, vol. 41, pp. 745-754, 2004.
- [18] S. P. Leitch and H. F. Brown, "Effect of raised extracellular calcium on characteristics of the guinea-pig ventricular action potential.," *J Mol Cell Cardiol.*, vol. 28, no. 3, pp. 541-551, 1996.
- [19] J. Magyar, N. Szentandrassy, T. Banyász, et al., "Effects of thymol on calcium and potassium currents in canine and human ventricular cardiomyocytes," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 136, pp. 330-338, 2002.
- [20] L. Fülöp, T. Bányász, J. Magyar, N. Szentandrassy, a Varró, and P. P. Nánási, "Reopening of L-type calcium channels in human ventricular myocytes during applied epicardial action potentials.," *Acta Physiol. Scand.*, vol. 180, no. 1, pp. 39-47, Jan. 2004.

RINGRAZIAMENTI

Voglio innanzitutto ringraziare di cuore il Prof. Stefano Severi e la Dott.ssa Elisa Passini per la disponibilità, la pazienza e l'aiuto fornitomi nel redigere questa tesi. Senza il loro contributo non sarei sicuramente riuscito ad affrontare questa interessante sfida e raggiungere gli obiettivi di questo lavoro.

Il ringraziamento più grande va alla mia famiglia, che mi ha sopportato nei momenti di crisi, rincorato in quelli di difficoltà e sempre sostenuto in questo mio tortuoso cammino universitario: il mio affetto per voi non è descrivibile a parole. Questo traguardo è anche vostro.

Infine un grazie va ai miei amici.

Quelli nuovi che ho incontrato all'università, i miei compagni di corso con i quali ho condiviso pressioni e tensioni pre-esami nelle interminabili sessioni di studio e i successivi festeggiamenti fino all'alba. Tutte cose che non si dimenticano.

E quelli storici, che nonostante gli anni passino sono sempre lì, pronti ad ascoltarmi, a spronarmi, a farmi ridere, ad assecondare i miei stati d'animo e il mio (a volte) brutto carattere.

Con tutti voi voglio condividere questo momento di grande gioia.

Che la festa abbia inizio!

Matteo Facciani

Cesena, 27/03/2014