

**ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITA' DI  
BOLOGNA**

**CAMPUS DI CESENA**

**SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA**

**CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**TITOLO DELL'ELABORATO:**

**Analisi computazionale e confronto con dati sperimentali della  
corrente rapida di potassio nei modelli di cardiomiocita  
ventricolare umano**

Elaborato in

**Laboratorio di strumentazione biomedica**

**Relatore:**

Prof. Ing. Stefano Severi

**Presentata da:**

Giacomo Benedetti

**Correlatrice:**

Dott.sa Elisa Passini

**Sessione Prima**

**Anno accademico 2013/2014**



# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b> .....	pag. 1
<b>1. ELETTROFISIOLOGIA CARDIACA</b> .....	pag. 2
1.1. Il potenziale della cellula cardiaca	
1.2. La corrente $I_{Kr}$	
1.3. Tecniche Sperimentali: il Voltage-clamp	
<b>2. MODELLISTICA DEL POTENZIALE D'AZIONE</b> .....	pag. 10
2.1. Modelli matematici del potenziale d'azione	
2.2. Il modello O'Hara Rudy (ORd)	
2.3. Il modello Ten Tusscher 2006 (TT06)	
2.4. Il modello Grandi Pasqualini Bers (GPB)	
<b>3. DATI SPERIMENTALI DELLA CORRENTE <math>I_{Kr}</math></b> .....	pag. 19
3.1. Articolo 1: "O'Hara - Rudy" 2011	
3.2. Articolo 2: "Iost – Papp" 1998	
3.3. Articolo 3: "Jost – Nattel" 2008	
3.4. Articolo 4: "Zhou – January" 1998	
3.5. Articolo 5: "Johnson – Bennet" 1999	
<b>4. METODI</b> .....	pag. 29
<b>5. RISULTATI</b> .....	pag. 32
5.1. Confronto dei modelli	
5.2. Implementazione del protocollo per il voltage-clamp della $I_{Kr}$	
<b>CONCLUSIONI</b> .....	pag. 41
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	pag. 42
<b>APPENDICE</b> .....	pag. 43





## INTRODUZIONE

Il presente lavoro di tesi consiste nell'analisi e dello studio delle diverse formulazioni della corrente di ripolarizzazione rapida di  $K^+$  ( $I_{Kr}$ ) nei tre più recenti modelli matematici di potenziale d'azione di cardiomiocita ventricolare umano.

Questa corrente svolge un ruolo molto importante all'interno della dinamica cardiaca, essendo fondamentale nella cosiddetta fase di ripolarizzazione, durante la quale il potenziale di membrana torna al valore di riposo originale dopo il picco raggiunto nella fase di depolarizzazione. Alterazioni di questa corrente, infatti, portano ad un allungamento del potenziale di azione, con conseguente aumento del rischio di aritmie per il paziente.

Nei modelli, la formulazione della corrente è basata su dati sperimentali raccolti in esperimenti di voltage-clamp, effettuati *in vitro*. Tali esperimenti non sono sempre concordi tra loro, e questo si riflette in diverse formulazioni nei modelli, a seconda dai dati sperimentali che sono stati usati per identificare i rispettivi parametri.

L'obiettivo della tesi è stato quindi quello di studiare e confrontare i dati sperimentali umani presenti in letteratura relativi alla corrente  $I_{Kr}$ , per poi cercare di riprodurre tali esperimenti in simulazione per i tre modelli matematici ventricolari considerati, analizzando analogie e differenze: il modello O'Hara Rudy (ORD), il modello Ten Tusscher 2006 (TT06) ed il modello Grandi Pasqualini Bers (GPB)

Una prima fase del lavoro ha riguardato quindi lo studio della letteratura scientifica relativa alla corrente  $I_{Kr}$ , durante la quale sono state raccolte le informazioni sugli esperimenti e i relativi dati umani pubblicati. In seguito, è stato scelto un protocollo sperimentali tra quelli riportati, e ne sono stati riprodotti i risultati in simulazione.

La tesi è quindi strutturata in una parte introduttiva, contenente gli elementi base dell'elettrofisiologia cardiaca e della modellistica matematica corrispondente, insieme ad una sintesi degli articoli scientifici considerati. In seguito è presentata una sezione di metodi, contenente i dettagli dell'implementazione in ambiente Matlab, e infine i risultati ottenuti confrontando i dati sperimentali e i modelli ventricolari tra loro. Il codice utilizzato è riportato in appendice.

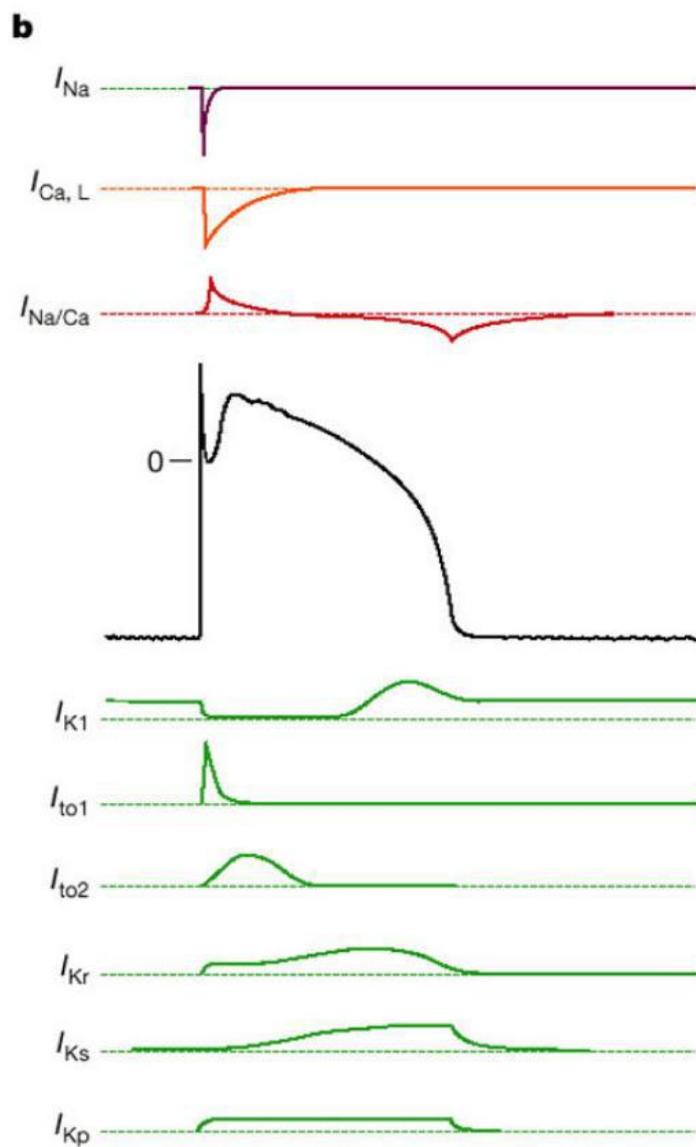
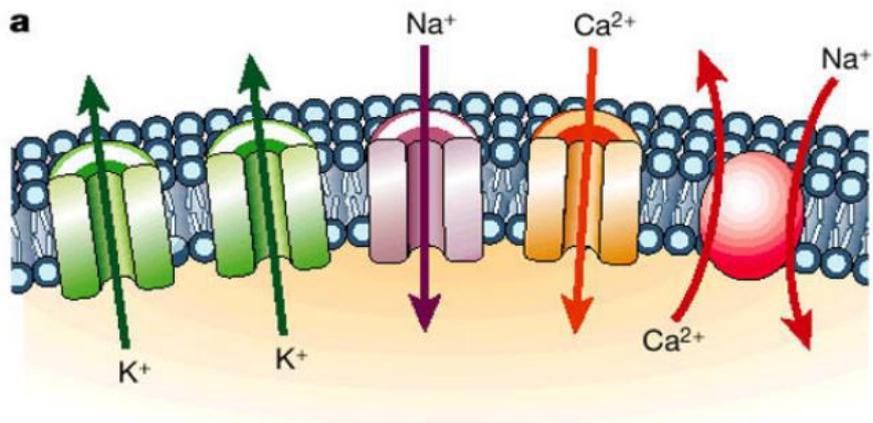
# **1. ELETTROFISIOLOGIA CELLULARE**

## **1.1 Il potenziale della cellula cardiaca**

La funzione cardiaca dipende strettamente dai processi chimici e biologici che avvengono all'interno delle singole cellule, i cardiomiociti, e pertanto è importante comprenderne le funzioni e le caratteristiche.

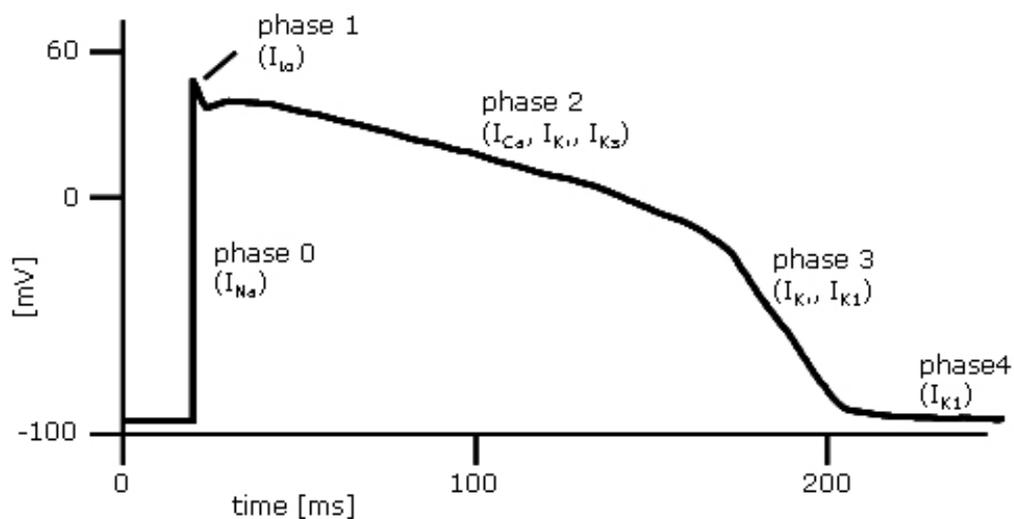
Le cellule presentano tutte una membrana cellulare, composta di acidi fosfolipidici disposti a costituire un doppio strato, che rappresenta una barriera selettivamente permeabile per l'ambiente extracellulare e quello interno, e regola il passaggio di molecole e ioni tra un ambiente e l'altro. Questo passaggio è governato principalmente da alcune proteine specifiche, dette canali ionici. Queste proteine infatti permettono agli ioni di attraversare la membrana cellulare, che altrimenti risulterebbe impermeabile alla maggior parte di essi. Un canale ionico è costituito da una proteina altamente specializzata che permette il passaggio di ioni attraverso la membrana cellulare: tale proteina è intrinseca di membrana, ossia possiede dei segmenti che attraversano la membrana cellulare e che presentano, quindi, una porzione extra- ed una intra-cellulare. Alcuni di essi possono essere sempre aperti, come alcuni canali per gli ioni  $K^+$ , altri generalmente chiusi, che si possono aprire in base a specifici segnali, come un gradiente elettrico o di concentrazione attraverso la membrana, oppure interagendo con molecole specifiche, che si legano al canale stesso e ne modificano la configurazione.

In generale quindi, la permeabilità selettiva della membrana permette la formazione di due ambienti, quello intra ed extra cellulare, in cui concentrazioni diverse di ioni comportano una differenza di carica elettrica ai margini della membrana stessa; questa differenza prende il nome di potenziale di membrana. In questo modo, con il passaggio di ioni attraverso i canali da un ambiente all'altro, ovvero correnti ioniche, si hanno variazioni di potenziale. Una rappresentazione della struttura della membrana cellulare e dei principali canali di interesse è riportata in fig.[1.1], insieme alle diverse correnti che contribuiscono alla generazione del potenziale cardiaco.



**Figura 1.1:** a) canali ionici di membrana. b) le correnti ioniche depolarizzanti, il potenziale d'azione e le correnti ripolarizzanti

Il potenziale d'azione (AP) è una depolarizzazione transitoria della membrana della cellula. L'AP delle cellule cardiache ha la caratteristica peculiare di avere una durata superiore di un centinaio di millisecondi rispetto quello di altre cellule: in base alle variazioni della conduttanza della membrana cellulare, principalmente agli ioni sodio, potassio e calcio, esso si può suddividere in alcune fasi caratteristiche, come mostrato in fig.[1.2]. All'inizio si ha una fase di depolarizzazione estremamente rapida (fase 0), seguita da due fasi che non sono sempre osservabili in tutte le cellule (ad esempio nelle cellule nervose e nei muscoli scheletrici): la ripolarizzazione transiente (fase 1), che gioca un ruolo importante nel determinare la durata del potenziale d'azione (APD), ed il plateau (fase 2), che è caratteristico del potenziale d'azione cardiaco, ed è il principale responsabile del prolungamento del potenziale del cuore. Infine, una fase di ripolarizzazione (fase 3) riporta il potenziale di membrana al suo valore di riposo originario, dove rimane (fase 4) fino al successivo stimolo che produrrà un nuovo potenziale d'azione.



**Figura 1.2:** le fasi del potenziale d'azione cardiaco

Il *potenziale di riposo* della cellula cardiaca ha un valore pari a circa -90 mV; questo valore è influenzato dal gradiente elettrochimico del potassio (ioni K<sup>+</sup>), e dalla permeabilità della membrana a questo ione. La sua concentrazione è molto maggiore all'interno della cellula piuttosto che all'esterno, così che il gradiente chimico favorisce l'uscita di ioni potassio dalla cellula, ma esso è contrastato dal

gradiente elettrico della membrana che fa sì che, anche con i canali del  $K^+$  aperti, la sua fuori uscita sia minimale. La membrana è permeabile anche ad altri ioni, come ad esempio quelli del sodio, il quale è molto più abbondante in ambiente extracellulare; in questo modo, all'apertura dei canali del sodio, si assiste ad una copiosa entrata di ioni  $Na^+$  all'interno della cellula.

La *depolarizzazione rapida (fase 0)* consiste in una riduzione improvvisa del potenziale d'azione della cellula, che lo porta ad un valore soglia (-50 mV), causando così la propagazione del potenziale d'azione. Questa depolarizzazione è dovuta quasi esclusivamente all'entrata nella cellula di una corrente di ioni  $Na^+$ , i quali portano rapidamente il potenziale a valori meno negativi, in un processo autosostenuto durante il quale aumentano sempre di più i canali del sodio che si aprono (si parla di *feedback positivo*). Questa corrente ha una grande ampiezza, ma si arresta molto in fretta (circa 1-2 ms), a causa dell'inattivazione dei canali del sodio che piano piano si richiudono, e non riescono a riaprirsi fino a che il potenziale non raggiunge nuovamente il valore di riposo.

Subito dopo la fine della depolarizzazione, si assiste ad una breve fase in cui si ha una leggera ripolarizzazione dovuta all'apertura di canali del potassio che permettono l'uscita di una corrente di piccola intensità, detta  $I_{to}$  (*transient outward*), che riporta il potenziale a valori leggermente più negativi (fase 1). Dopo questa fase, inizia il periodo di depolarizzazione tipico delle cellule miocardiche, il cosiddetto *plateau* (fase 2): in questa fase si osserva l'entrata nella cellula di una corrente lenta di ioni di calcio  $Ca^{2+}$ . Questa corrente viene definita lenta a causa dei particolari canali ionici che la regolano, che hanno periodi di attivazione, inattivazione e recupero più lenti del normale (sono detti *long-lasting*, o *L-type*). Essi si attivano durante la fase 0, causando l'aumento della conduttanza del calcio, e favoriscono l'entrata della corrente, detta  $I_{CaL}$ , anche grazie al gradiente chimico che ne facilita l'ingresso nella cellula. Essendo in presenza di potenziali più positivi, gli ioni di potassio  $K^+$  presenti in ambiente intracellulare, vengono spinti al contrario fuori dal cardiomiocita. In questo modo, all'inizio del plateau si osserva un andamento costante del potenziale d'azione, mentre piano piano la corrente in uscita risulta maggiore di quella in ingresso, a causa della lenta inattivazione dei canali del calcio: in questo modo ha inizio il processo di ripolarizzazione.

L'efflusso di ioni  $K^+$  fuori dalla cellula, insieme all'arresto della corrente di calcio in entrata, provoca il ritorno del potenziale a valori molto negativi (*fase 3*); questo cambiamento è favorito dal parallelo aumento della conduttanza della cellula al potassio: questa conduttanza è voltaggio-dipendente, ossia più il valore del potenziale diventa negativo, più essa aumenta, facilitando la fuoriuscita di potassio ed il ritorno del potenziale di membrana ai valori negativi di riposo (è un processo di *feedback negativo*). La ripolarizzazione delle cellule cardiache è influenzata da due correnti di potassio principali, la  $I_{Ks}$  e la  $I_{Kr}$ , correnti ripolarizzanti rapida e lenta, rispettivamente. Vi sono altri due meccanismi che offrono una corrente favorevole alla ripolarizzazione del potenziale di membrana. Il primo è la pompa  $Na^+-K^+$ , che porta tre ioni  $Na^+$  fuori dalla cellula ogni due ioni  $K^+$  che vengono trasportati all'interno, generando una corrente netta uscente, che contribuisce al mantenimento del potenziale di riposo. Questa corrente di ripolarizzazione, pur non essendo molto intensa, aumenta quando la cellula è sovraccarica di sodio, ad esempio quando la frequenza cardiaca viene accelerata. Il secondo meccanismo è lo scambiatore  $Na^+-Ca^{2+}$ , che scambia uno ione  $Ca^{2+}$  per tre ioni  $Na^+$  e che sostiene una piccola corrente uscente durante la sistole e entrante durante la diastole.

Subito dopo la fine del potenziale d'azione, risulta impossibile originarne uno nuovo per un piccolo intervallo di tempo, che prende il nome di *periodo refrattario*. Esso si divide in periodo refrattario assoluto e refrattario relativo. Il periodo refrattario assoluto, che va dalla fase 0 alla fase 3 del potenziale, rappresenta il lasso di tempo nel quale i canali del sodio sono inattivi, rendendo quindi impossibile l'inizio di una nuova depolarizzazione. Dopo la fase 3, invece, inizia il periodo refrattario relativo, durante il quale si può stimolare la cellula affinché produca un nuovo potenziale d'azione, che avrà però un'intensità ed una durata molto minori di quelle normali, a causa dei canali del sodio non ancora del tutto rientrati dalla fase di inattivazione.

Esiste comunque la possibilità di osservare insorgenze anomale di potenziale: queste vengono dette *post-depolarizzazioni* (ADs), e sono depolarizzazioni anomale dei miociti che possono presentarsi durante la Fase 2, la Fase 3 o la Fase 4 del potenziale d'azione cardiaco.

Esse si distinguono in post-depolarizzazioni precoci (early after-depolarizations o EADs) e in post-depolarizzazioni tardive (delayed after-depolarizations o DADs).

Le prime interessano la fase 2 e 3 del potenziale, mentre le DADs interessano l'ultima fase, durante la quale il potenziale di membrana ha ormai raggiunto il valore di riposo. Entrambi i tipi di ADs possono provocare due effetti diversi: quando la depolarizzazione non raggiunge un'ampiezza tale da superare il valore di soglia, si ha la propagazione di un semplice stimolo sottosoglia; quando invece la depolarizzazione è sufficientemente ampia, si innesca un nuovo potenziale d'azione, detto Triggered Activity (TA), il quale necessita di un innesco, costituito da una depolarizzazione ausiliaria a monte.

### **1.2 La corrente $I_{Kr}$**

La  $I_{Kr}$  è la corrente rapida di potassio, che si occupa, assieme alla  $I_{Ks}$  (corrente lenta), della fuoriuscita di potassio dalla cellula durante la fase di ripolarizzazione finale. La sua caratteristica principale è quella di essere una corrente rettificata, ossia la conduttanza di membrana a questa corrente dipende strettamente dal potenziale di membrana. Grazie a questa proprietà dei canali di membrana, nella fase di ripolarizzazione, man mano che il potenziale assume valori sempre più negativi, un maggior numero di canali di potassio si apriranno favorendo l'uscita di questa corrente. L'interesse per questa corrente di potassio è anche dovuto agli effetti pro-aritmici che può avere un suo eventuale blocco, anche parziale. Infatti, il blocco della  $I_{Kr}$  favorisce l'insorgenza di depolarizzazioni anomale anticipate (EADs), ed inoltre provoca l'allungamento della durata del potenziale d'azione (APD).

### **1.3 Tecniche sperimentali: il voltage-clamp**

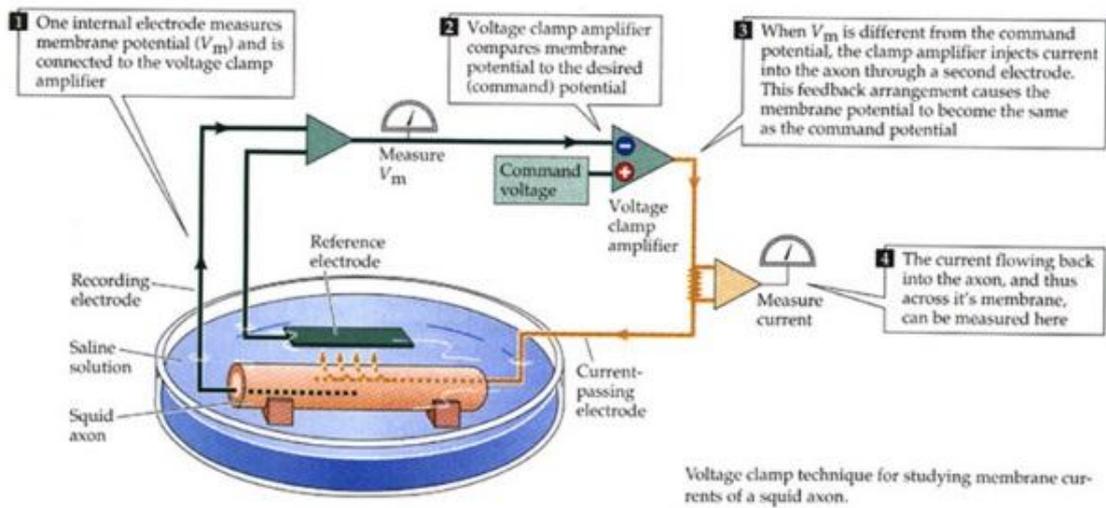
Il voltage-clamp (letteralmente "blocco di voltaggio") è un test di laboratorio molto usato per valutare l'apertura e la chiusura di canali ionici di membrana; questa tecnica consiste nel misurare la corrente che attraversa una membrana cellulare dopo che ad essa vengono applicate delle tensioni note, solitamente impulsi a gradini.

Generalmente la corrente che attraversa la membrana a potenziale imposto è costituita di due componenti elettriche, una ionica ed una capacitiva, inoltre, essendo il valore  $V_m$  della tensione applicata proporzionale alla capacità di membrana  $C_m$ , si avrà un flusso di corrente soltanto a seguito di un andamento

variabile della tensione: ciò significa che, applicando un gradino di tensione alla membrana, si avranno dei flussi di corrente soltanto al inizio e alla fine del gradino. La componente capacitiva della corrente è molto rapida, pertanto, ad eccezione dei punti di inizio e fine del gradino di tensione, la corrente generata sarà prevalentemente ionica, permettendo quindi lo studio della cinetica dei vari canali ionici di membrana ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ).

L'idea iniziale fu concepita da Kenneth Cole e George Marmont negli anni 40: essi ipotizzarono infatti l'opportunità di mantenere il potenziale di membrana a determinati livelli, utilizzando due elettrodi ed un circuito di feedback; a partire da questa idea, Alan Hodgkin, pensò di poter arrivare alla misura di correnti ioniche transmembrana utilizzando questo procedimento, ma valutando la necessità di mantenere il potenziale di membrana uguale ad uno noto, applicato dall'esterno.

La tecnica (fig.[1.3]) prevede l'utilizzo di un generatore di corrente collegato a due elettrodi: il primo, detto "di voltaggio" è posto fuori in ambiente extra-cellulare (messo "a terra"), misura il potenziale transmembrana ( $V_m$ ), mentre il secondo è inserito internamente alla cellula per la conduzione di corrente; in questa configurazione, il generatore produce un potenziale, detto di comando o di "holding" ( $V_{\text{comando}}$ ) alla quale la membrana cellulare viene mantenuta. I due elettrodi convergono in un amplificatore, che prende in ingresso il potenziale di comando e quello registrato all'interno della cellula, e ne fa la differenza ( $V_{\text{comando}} - V_m$ ): se questa differenza è diversa da 0, ossia se il potenziale di membrana è diverso da quello di holding, un circuito di feedback provvede all'iniezione di corrente, di pari intensità ma di segno opposto a quella ionica, attraverso l'elettrodo interno alla membrana, in modo da portare a 0 la differenza di voltaggio. Il primo esempio di cellula analizzata con questa tecnica, fu l'assone di calamaro gigante, dato che inizialmente gli elettrodi erano costituiti da spire di filo conduttore arrocciate, rendendo perciò possibile l'utilizzo di questa tecnica solamente in cellule di grosso spessore, come appunto quelle di calamaro (che raggiungono anche qualche mm).



**Figura 1.3:** schema di esecuzione del voltage-clamp

## **2. CENNI DI MODELLISTICA DEL POTENZIALE D'AZIONE**

### **2.1 Modelli matematici del potenziale d'azione**

Nel corso del tempo è emersa una necessità sempre maggiore di tentare un approccio allo studio della fenomenologia del potenziale d'azione diverso da quello sperimentale.

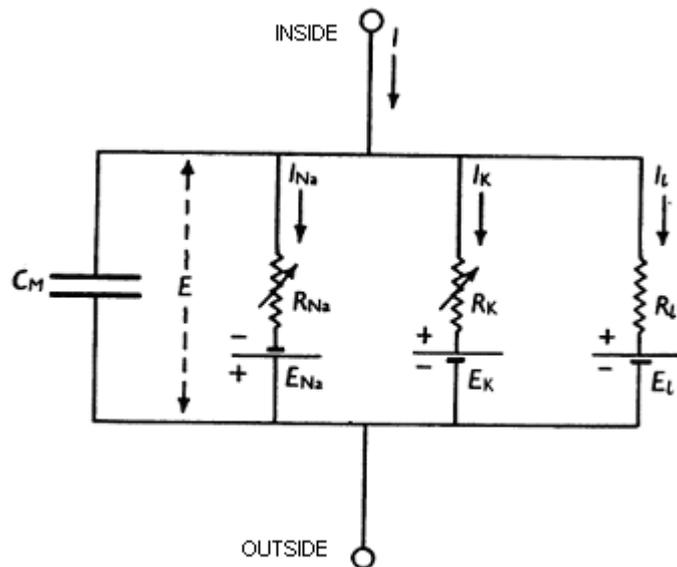
Una valutazione di questi processi, molto complessi e articolati, basata soltanto su osservazioni effettuate in laboratorio, si è rivelata ben presto insufficiente ai fini di una completa comprensione del processo. A tal proposito, l'analisi modellistica, basata su formulazioni matematiche di correnti, canali ionici, e dei diversi componenti subcellulari, costituisce uno strumento molto importante per colmare alcune lacune dell'analisi sperimentale; queste formulazioni sono state caratterizzate attraverso esperimenti diversi, volti ad isolare lo specifico compartimento o componente, ed integrati in modelli di cardiomiocita, nei quali questi sistemi interagiscono tra di loro per creare il potenziale d'azione.

Il principale vantaggio dell'analisi modellistica del potenziale d'azione, rispetto quella sperimentale, sta nel fatto di poter esaminare tutte le variabili di interesse, come le correnti, le concentrazioni ioniche o il potenziale di membrana, contemporaneamente col procedere dell'esperimento, e poterne osservare ogni aspetto; per ottenere una simile visione con un esperimento di laboratorio, occorrerebbe isolare il componente di interesse, attraverso una manipolazione che spesso richiede aggiunta di farmaci o soluzioni non fisiologiche.

Si può quindi affermare che l'utilizzo di modelli matematici permette di comprendere meccanismi alla base dei fenomeni osservati, altrimenti impossibile con la sola analisi sperimentale. Le formulazioni usate per i vari modelli, comunque, sono tutte dovute alle conoscenze di tipo sperimentale acquisite nel tempo, e quindi potrebbero essere spesso incomplete o sbagliate; molte di esse sono state ottenute utilizzando la tecnica del voltage-clamp.

I primi ad eseguire questo tipo di esperimenti, dando origine alla prima forma di modello del potenziale d'azione, furono Hodgkin e Huxley, i quali, nel 1952, pubblicarono una serie di articoli contenenti le misure delle correnti di membrana attraverso voltage-clamp, e un modello di potenziale d'azione dell'assone di un calamaro gigante (fig.[2.1]). I loro studi ipotizzavano che la permeabilità di

membrana fosse regolata dal passaggio di ioni, i quali erano controllati da entità distinte che ne regolavano il passaggio (gates): questi sistemi avevano delle particolari configurazioni che potevano permettere o meno il passaggio di ioni attraverso la membrana.



**Figura 2.1:** l'equivalente elettrico della membrana cellulare secondo Hodgkin e Huxley (1952)

Mettendo insieme queste osservazioni, Hodgkin e Huxley furono in grado di riprodurre e spiegare il potenziale d'azione attraverso l'interazione di queste correnti ioniche.

A partire da questo modello, seguirono i primi modelli di cellula cardiaca: il primo fu quello di Fitzhugh (1960) e Noble (1962), che utilizzarono una descrizione delle correnti di  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  simile a quella di Hodgkin e Huxley per spiegare il plateau del potenziale cardiaco. Un altro passo importante fu fatto nel 1985, quando vennero introdotti, nel modello di cellula di DiFrancesco - Noble, il compartimento relativo al reticolo sarcoplasmatico del  $\text{Ca}^{2+}$ , lo studio delle variazioni dinamiche delle concentrazioni di ioni intra ed extra cellulari, le pompe ioniche e gli scambiatori, rendendo possibile una descrizione dettagliata della cinetica delle correnti di membrana. Con una disponibilità sempre maggiore di dati sperimentali, si è giunti allo sviluppo di modelli di cardiociticità ventricolare, a partire da cellule isolate di porcellino d'India (Luo and Rudy, 1994; Noble *et al.* 1998), ratto (Pandit *et al.* 2001), cane (Winslow *et al.* 1999; Hund and Rudy 2004) e coniglio (Puglisi and Bers, 2001; Shannon *et al.* 2004).

In questi modelli più recenti, specie nel Luo and Rudy del 1994, e nel Hund and Rudy del 2004, compaiono le correnti di ripolarizzazione  $I_{to1}$  e  $I_{to2}$ , la corrente di sodio lenta, ed una dinamica del calcio aggiornata, dipendente dalla proteina kinasi CAMKII e della calmodulina, e la dipendenza dell'APD dal calcio stesso.

Infine si giunse al primo modello di cardiomiocita ventricolare umano, sviluppato da Priebe - Beuckelmann, nel 1998.

Col passare degli anni, la sempre maggiore disponibilità di dati sperimentali umani, ha permesso di migliorare notevolmente questi modelli, consentendo di introdurre formulazioni matematiche sempre più accurate, ed aumentando notevolmente il livello di dettaglio di questi modelli.

In particolare, in questo lavoro di questa tesi sono stati confrontati i tre modelli di potenziale d'azione ventricolare umano più recenti e completi: il Ten-Tusscher Panfilov (2006), il Grandi Pasqualini Bers (2010) e l'O'Hara-Rudy (2011), che verranno di seguito descritti in dettaglio.

## 2.2 Il modello Ten-Tusscher 2006 (TT06)

Successivamente allo sviluppo del modello TT04, Ten Tusscher e Panfilov hanno implementato, due anni dopo, una nuova versione del modello di cardiomiocita ventricolare umano, il TT06, con il proposito di una descrizione più accurata ed estensiva della dinamica del calcio; la novità principale sta infatti nell'introduzione di un compartimento relativo al subsarcolemma, detto subspace. In TT06 compare inoltre la corrente  $I_{rel}$ , dovuta al rilascio di  $Ca^{2+}$  indotto dal reticolo sarcoplasmatico, che è descritta attraverso un modello markoviano a quattro stati.

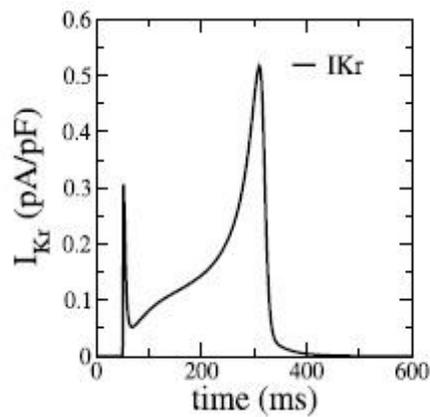
La  $I_{Kr}$  del TT06 (fig.[2.2]<sup>1</sup>) presenta una morfologia caratterizzata da un brevissimo picco iniziale, seguito da un secondo spike più ampio. Esiste anche una versione aggiornata del modello (Fink *et al.*<sup>2</sup>), nel quale compare una descrizione più accurata della  $I_{Kr}$ , basata su campioni di ventricoli umani sani: questa nuova versione utilizza una formulazione markoviana della  $I_{Kr}$ , il che rende il modello

---

<sup>1</sup> K. H. W. J. ten Tusscher, D. Noble, P. J. Noble, and A. V. Panfilov, "A model for human ventricular tissue" Department of Theoretical Biology, Utrecht University, 3584 CH Utrecht, The Netherlands; University Laboratory of Physiology, University of Oxford, Oxford OX1 3PT; Division of Mathematics, University of Dundee, Dundee DD1 4HN, United Kingdom

<sup>2</sup> Thomas O'Hara, László Virág, András Varró, Yoram Rudy, "Simulation of the Undiseased Human Cardiac Ventricular Action Potential: Model Formulation and Experimental Validation", Andrew D. McCulloch, University of California San Diego, United States of America, published on May 26, 2011

più macchinoso dal punto di vista delle prestazioni, ma in grado di fornire maggiori informazioni sulla velocità del potenziale d'azione.

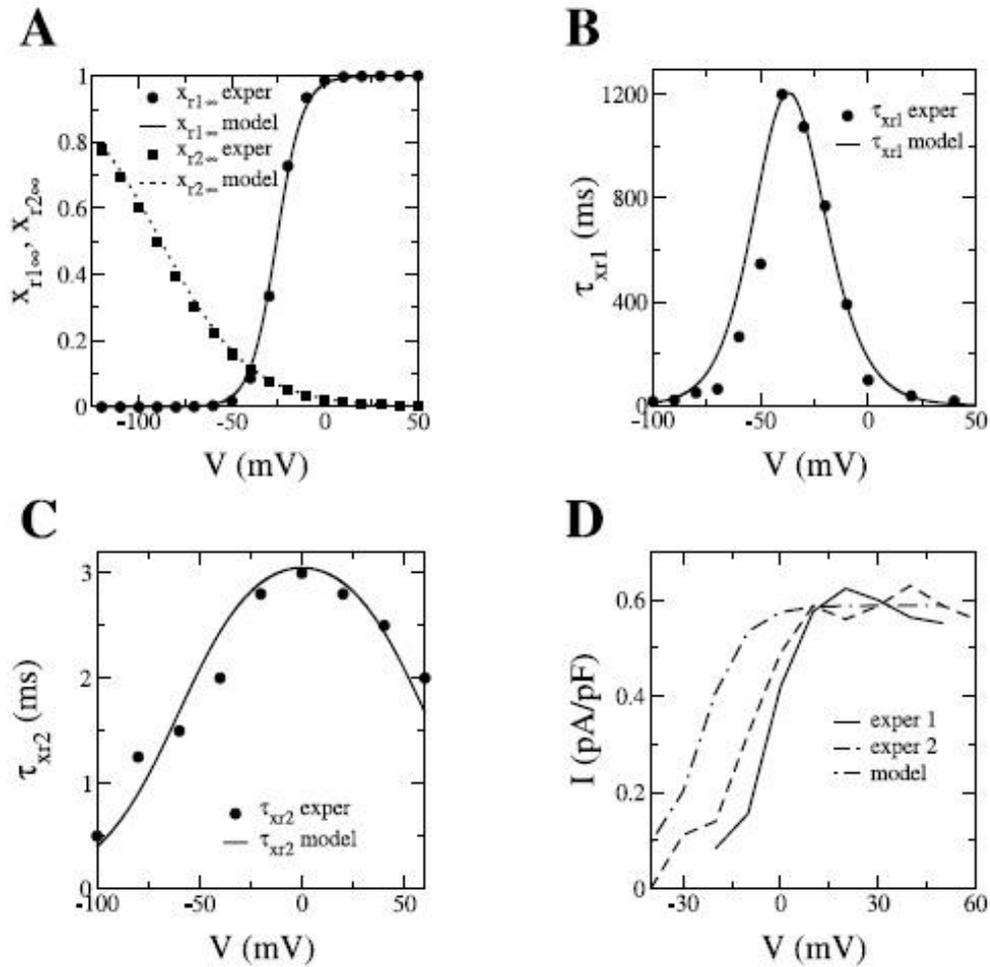


**Figura 2.2:** corrente  $I_{Kr}$  nel modello TT06

Per il modello TT06, in questa tesi, sono stati utilizzati i dati sperimentali utilizzati nella sua precedente versione, il TT04, in quanto Ten Tusscher *et al.* non hanno ricavato loro stessi, così come Grandi *et al.*, i dati sperimentali da confrontare con i propri risultati analitici. Per lo studio della  $I_{Kr}$ , il TT04 ha fatto riferimento, principalmente, a due studi sperimentali precedenti: quello di Zhou *et al.* (1998) per quanto riguarda attivazione in steady state, costante di tempo di attivazione, e curva I-V, e quello di Johnson *et al.* (1999) per le informazioni sulla disattivazione in steady state e costante di tempo di inattivazione (fig.[2.3]<sup>3</sup>)

---

<sup>3</sup> K. H. W. J. ten Tusscher, D. Noble, P. J. Noble, and A. V. Panfilov, "A model for human ventricular tissue" Department of Theoretical Biology, Utrecht University, 3584 CH Utrecht, The Netherlands; University Laboratory of Physiology, University of Oxford, Oxford OX1 3PT; Division of Mathematics, University of Dundee, Dundee DD1 4HN, United Kingdom



### 2.3 Il modello Grandi Pasqualini Bers 2010 (GPB)

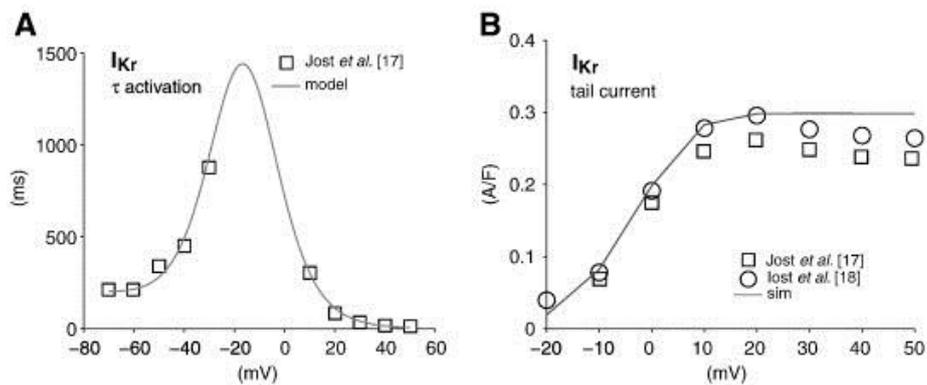
Il modello di GPB prevede una suddivisione in compartimenti che discende dal modello di cardiocita ventricolare di coniglio proposto da Shannon: questo prevede l'introduzione di due ambienti: uno prossimo alla membrana cellulare (il sarcolemma), ed uno vicino il reticolo sarcoplasmatico, detti rispettivamente junctional cleft e subsarcolemma (SL). Nel primo compartimento avviene il rilascio di  $Ca^{2+}$   $Ca^{2+}$ -indotto, il secondo, invece, è una regione posta al di sotto della rimanente porzione di membrana cellulare. Il reticolo sarcoplasmatico e il bulk

citosolico completano la struttura funzionale della cellula per un totale di 4 compartimenti.

Questo modello si prefigge 2 importanti obiettivi:

- Simulare i fenomeni di base dell'accoppiamento eccitazione-contrazione
- Utilizzare densità di correnti del potassio prossime a valori reali.

Il modello GB è costituito da 38 equazioni differenziali ordinarie che descrivono la velocità di cambiamento del potenziale di membrana ( $V_m$ ), delle variabili di gating che regolano la cinetica dei canali ionici, le concentrazioni degli ioni  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$  e la dinamica del calcio intracellulare. Di particolare interesse sono le correnti del potassio  $I_{Ks}$  (rettificante ad attivazione lenta),  $I_{Kr}$  (fig.[2.4]<sup>4</sup>) (rettificante ad attivazione rapida),  $I_{K1}$  (rettificante entrante) e  $I_{to}$  (transiente uscente).



**Figura 2.4:** curva di attivazione in steady state (A) e curva I-V (B) in Grandi Bers

Il modello è stato validato attraverso un'analisi condotta su dati inerenti la restituzione e l'adattamento dell'APD, l'aumento del picco di  $Ca^{2+}$  nel suo transiente dipendente dalla frequenza e la concentrazione del sodio intracellulare  $[Na^+]_i$ .

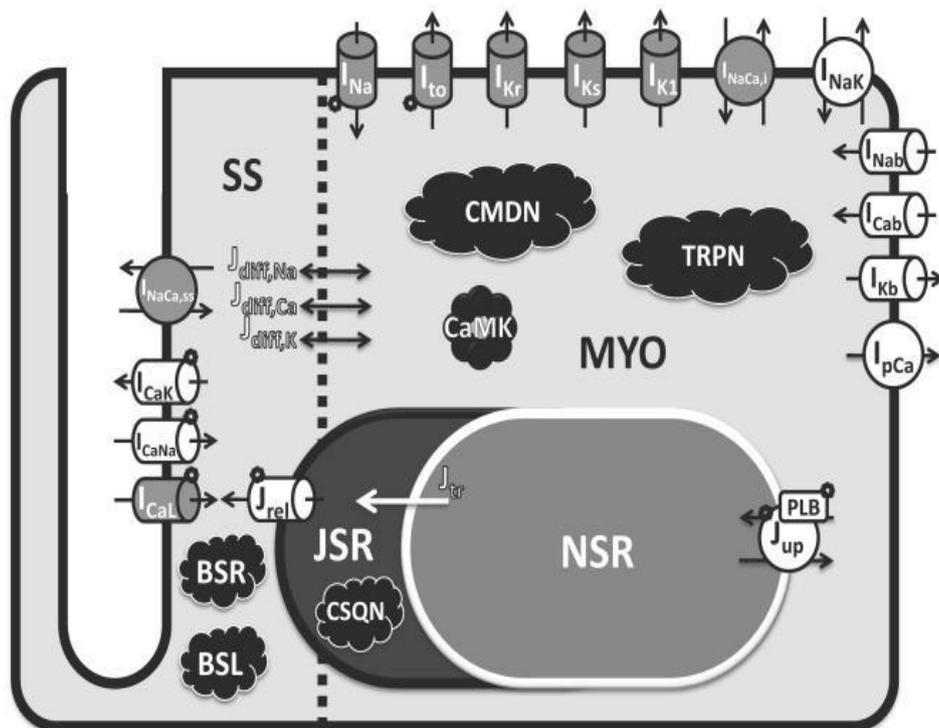
## 2.4 Il modello O'Hara Rudy (ORd) 2011

Il modello ORd è uno dei modelli di cardiomiocita ventricolare più recenti e completi ad oggi disponibili. Esso mira a rappresentare una grande varietà di comportamenti fisiologici: tra essi, i più importanti sono la dipendenza dell'APD

<sup>4</sup> Eleonora Grandi, Francesco S. Pasqualini, Donald M. Bers; "A novel computational model of the human ventricular action potential and Ca transient" Volume 48, Issue 1, January 2010, Pages 112–121.

dalla frequenza e gli effetti sulle correnti di calcio della proteina chinasi Calmodulina-Ca<sup>2+</sup> dipendente (CaMK) (fig.[2.5])<sup>5</sup>.

Uno dei principali punti di forza del modello consiste nella disponibilità di nuovi e numerosi dati sperimentali provenienti da cellule ventricolari umane sane. Per questo scopo sono stati utilizzati dati provenienti da 140 cuori sani, 78 dei quali da donatori maschi di mezza età. La corrente di calcio I<sub>CaL</sub>, le correnti del potassio e lo scambiatore di Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX) sono solo alcune tra le nuove misure appositamente raccolte per costruire questo modello.



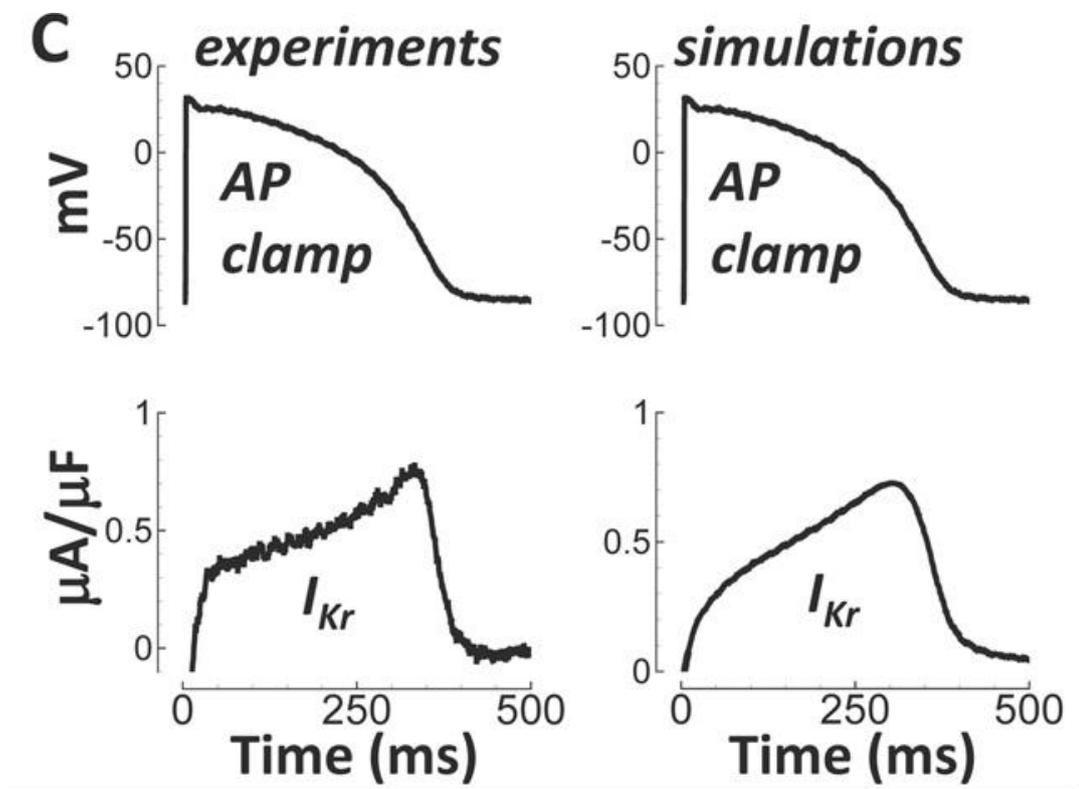
**Figura 2.4:** compartimenti cellulari nel modello O'Hara Rudy

Da un punto di vista modellistico, il modello di O'Hara Rudy è descritto attraverso 41 equazioni differenziali ordinarie (si possono ridurre a 31 se si omettono quelle relative alla proteina CaMK e i suoi effetti sulla cellula). Il modello risulta efficiente, oltre che per l'aspetto funzionale e di completezza, anche da un punto di vista delle prestazioni: esso infatti è stato concepito a partire dal paradigma di "purezza" di Hodgkin-Huxley, cioè senza introduzione di variabili di tipo

<sup>5</sup> Thomas O'Hara, László Virág, András Varró, Yoram Rudy, "Simulation of the Undiseased Human Cardiac Ventricular Action Potential: Model Formulation and Experimental Validation", Andrew D. McCulloch, University of California San Diego, United States of America, published on May 26, 2011

markoviano: questo aspetto rende il modello molto fluido durante le simulazioni, anche se il modello si presta comunque a possibili inserimenti esterni di questo tipo di variabili. All'interno del modello sono presenti tutte le correnti ioniche già presenti nei modelli più datati, con l'aggiunta di una corrente del sodio ad attivazione lenta ( $I_{NaL}$ ).

Per quanto riguarda la  $I_{Kr}$ , in ORd essa presenta la morfologia di fig.[2.3]; in questo modello, essa assume un ruolo particolare: infatti, si è visto come il potenziale d'azione, in seguito ad una stimolazione lenta ( $CL=4000$  ms), presenti EADs se la  $I_{Kr}$  viene bloccata (blocco dell'85%).

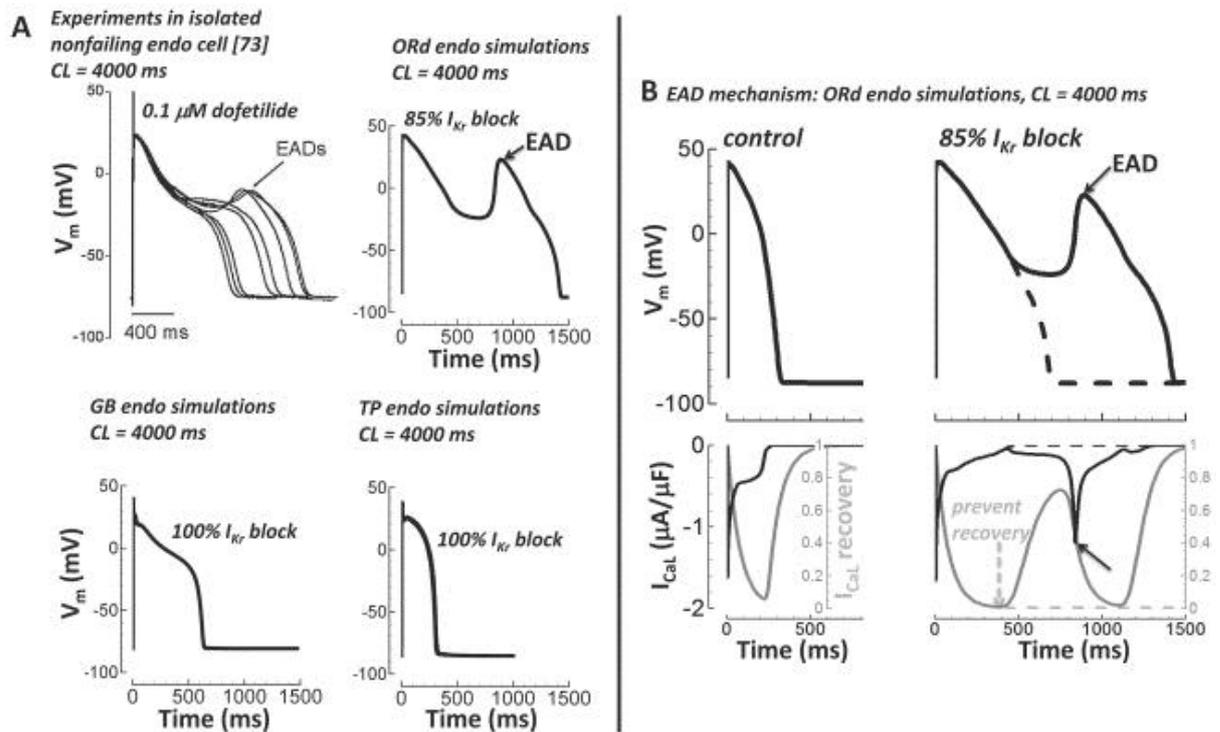


**Figura 2.3:** confronto tra modello ed esperimenti di potenziale d'azione (AP) e  $I_{kr}$

Questo effetto risulta dovuto alla riapertura dei canali del calcio che favoriscono la depolarizzazione anomala della membrana (corrente  $I_{CaL}$ ); inibendo questa corrente, si può prevenire la formazione di EADs (fig.[2.4])<sup>6</sup>. Un'altra

<sup>6</sup> Thomas O'Hara, László Virág, András Varró, Yoram Rudy, "Simulation of the Undiseased Human Cardiac Ventricular Action Potential: Model Formulation and Experimental Validation", Andrew D. McCulloch, University of California San Diego, United States of America, published on May 26, 2011

fondamentale caratteristica di  $I_{Kr}$  osservata attraverso ORd, è quella di causare un accorciamento del APD a bassi valori di stimolazione (CL o DI): l'effetto è dovuto al picco della corrente di potassio, il quale, essendo la deattivazione di  $I_{Kr}$  più lenta, risulta anticipato, favorendo la presenza immediata di  $I_{Kr}$  che causa la depolarizzazione.



**Figura 2.4:** insorgenza di APDs al blocco della  $I_{Kr}$  nei tre modelli; dipendenza degli EADs alla modifica della corrente  $I_{CaL}$

### 3. DATI SPERIMENTALI DELLA CORRENTE $I_{Kr}$

In questa sezione è presente una rassegna dei dati sperimentali analizzati per il successivo confronto con i risultati dei modelli di potenziale d'azione.

#### 3.1 Articolo 1: “O’Hara Rudy” 2011

## Simulation of the Undiseased Human Cardiac Ventricular Action Potential: Model Formulation and Experimental Validation

Thomas O’Hara<sup>1</sup>, László Virág<sup>2</sup>, András Varró<sup>2,3</sup>, Yoram Rudy<sup>1\*</sup>

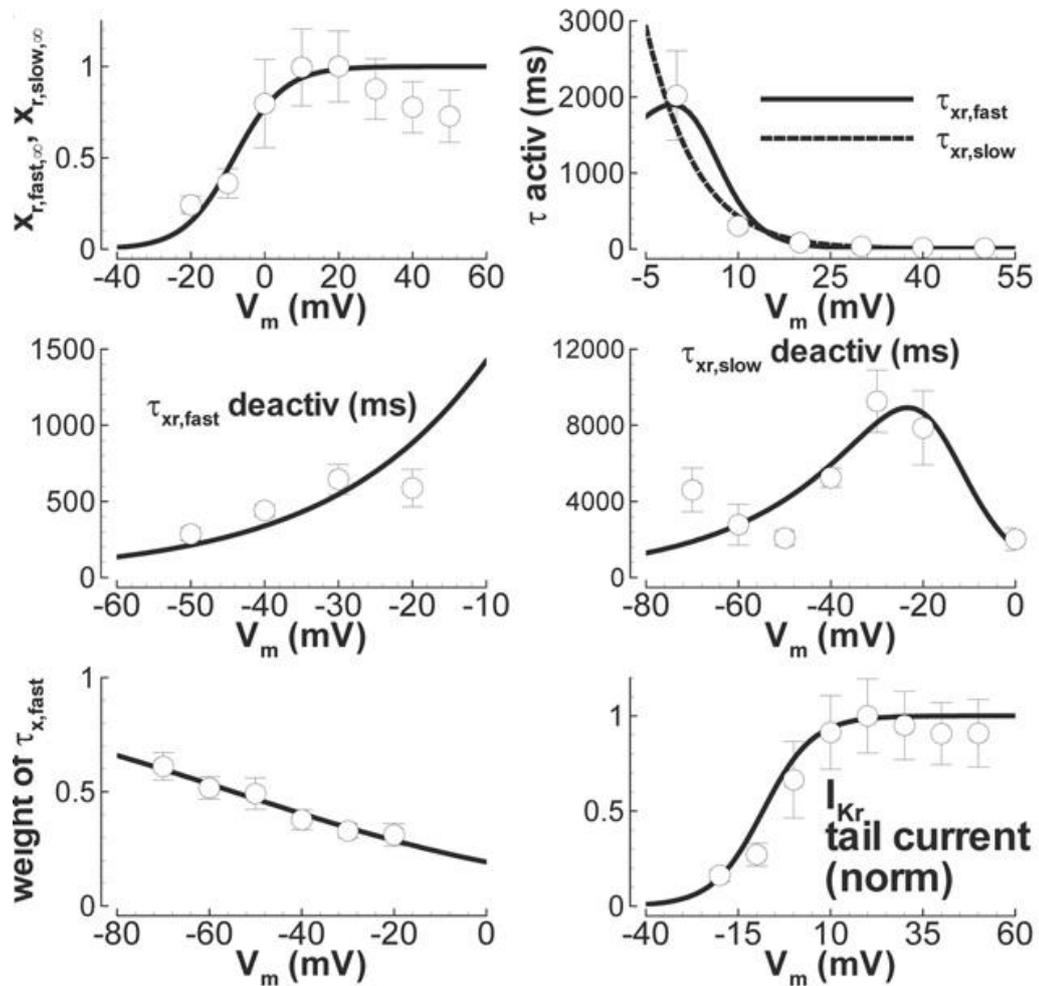
<sup>1</sup> Cardiac Bioelectricity and Arrhythmia Center, Department of Biomedical Engineering, Washington University in St. Louis, St. Louis, Missouri, United States of America, <sup>2</sup> Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Szeged, Szeged, Hungary, <sup>3</sup> Division of Cardiovascular Pharmacology, Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary

La grande affidabilità e completezza del modello ORd, infatti, dipendono dalle oculute esperienze di laboratorio effettuate; l’idea del gruppo era che per prevenire disfunzioni cardiache in un soggetto, andasse compresa a fondo la meccanica che c’era alla base della generazione dei potenziali d’azione: a questo scopo, la loro analisi sperimentale è partita da più di 100 campioni di cuori umani sani. I principali risultati ottenuti dalla loro analisi sono stati una miglior valutazione della dipendenza dalla velocità delle steady state, la restituzione del AP ventricolare, e misure migliori per le correnti di tipo L del  $Ca^{2+}$ , correnti di  $K^+$  e per lo scambiatore  $Na^+/Ca^{2+}$ .

Un gran quantità di dati sperimentali riguarda lo studio della  $I_{Kr}$ , corrente al centro di questo lavoro di tesi; per ottenere il modello di questa corrente, sono stati usati campioni di ventricolo umano sano, posti in una soluzione standard contenente 1  $\mu M$  E-4031, a 37°C, ed utilizzando la tecnica del voltage-clamp: in questo modo sono state ottenute misure sullo steady state e sulle costanti di tempo della corrente.

Come prima cosa, sono state valutate le costanti di tempo di attivazione e inattivazione (lente e rapide), con specifici protocolli di V-clamp. In particolare, l’attivazione è stata valutata partendo da un potenziale di resting di -40 mV e portando la cellula a diversi potenziali, e misurando l’attivazione corrispondente ad ogni voltaggio. Per l’inattivazione invece sono state considerate le correnti di coda,

cioè quelle misurate quando dai gradini di potenziale la cellula viene riportata al suo valore di riposo di -40 mV.

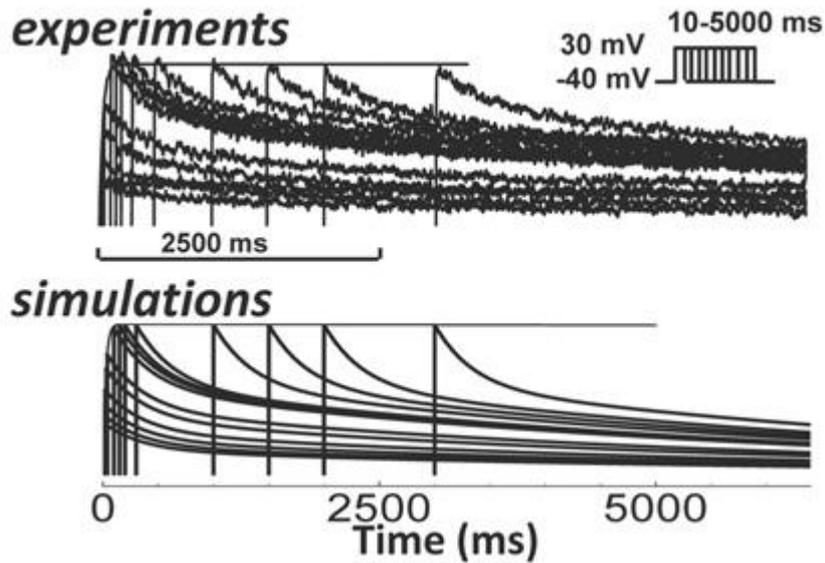


**Figura 3.1 (dal alto in basso, da sinistra a destra):** curva I-V in steady state, costanti rapida e lenta di attivazione, costante rapida di disattivazione, costante lenta di disattivazione, peso relativo della componente rapida di disattivazione, e curva I-V per le correnti di coda normalizzate

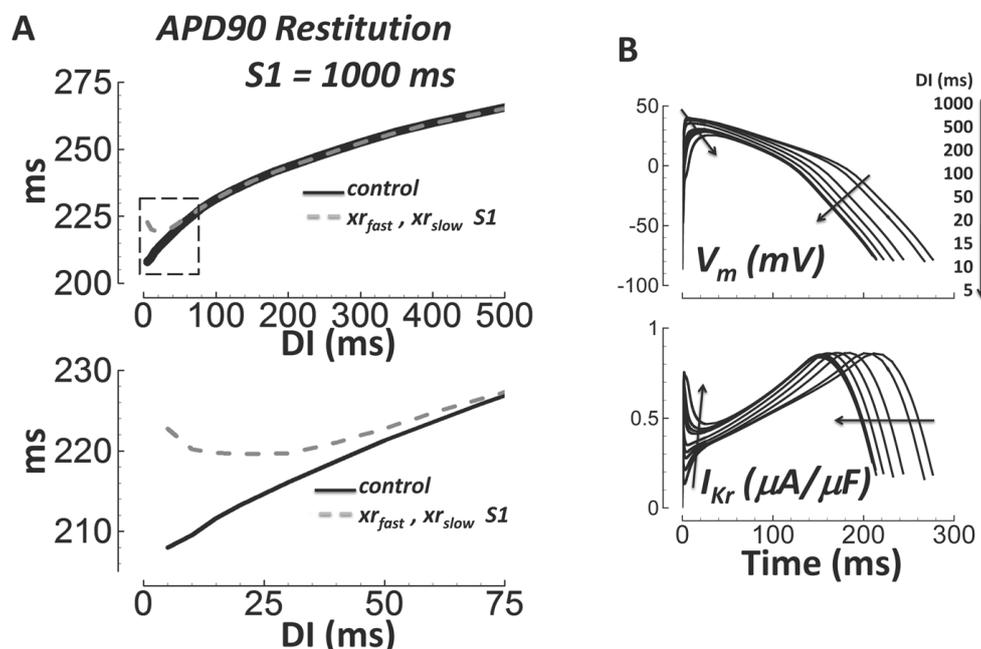
Informazioni sullo stato di equilibrio della corrente, invece, sono state ricavate a partire dalla curva I-V, dividendone i valori per la driving force, e assumendo di avere massima attivazione all'istante in cui si ha il picco della corrente di coda (fig.[3.1]<sup>7</sup>). Dal confronto tra i dati sperimentali e le simulazioni con il modello, sono state tratte alcune conclusioni già anticipate: la lenta disattivazione della  $I_{Kr}$  (fig. [3.2]<sup>8</sup>) favorisce l'accorciamento del APD durante lo steady state, per alti

<sup>7,12</sup> Thomas O'Hara, László Virág, András Varró, Yoram Rudy, "Simulation of the Undiseased Human Cardiac Ventricular Action Potential: Model Formulation and Experimental Validation", Andrew D. McCulloch, University of California San Diego, United States of America, published on May 26, 2011

valori di stimolazione e bassi intervalli diastolici; inoltre è stata valutata la conduttanza del gate ( $R_{Kr}$ ) utilizzando il v-clamp basato sul AP (fig.[2.4]). Di grande interesse anche il fatto che APD90 sia dipendente dalla  $I_{Kr}$  e da un suo eventuale blocco: la dipendenza dalla velocità, per piccoli intervalli diastolici, della  $I_{Kr}$ , influisce sulla restituzione del APD90 (fig. [3.3, 3.4, 3.5]<sup>9</sup>).



**Figura 3.2:** confronto tra andamenti di attivazione sperimentali e simulati



**Figura 3.3:** influenza sulla restituzione di APD90 della  $I_{Kr}$  al variare della durata degli intervalli diastolici

<sup>9</sup> Thomas O'Hara, László Virág, András Varró, Yoram Rudy, "Simulation of the Undiseased Human Cardiac Ventricular Action Potential: Model Formulation and Experimental Validation", Andrew D. McCulloch, University of California San Diego, United States of America, published on May 26, 2011

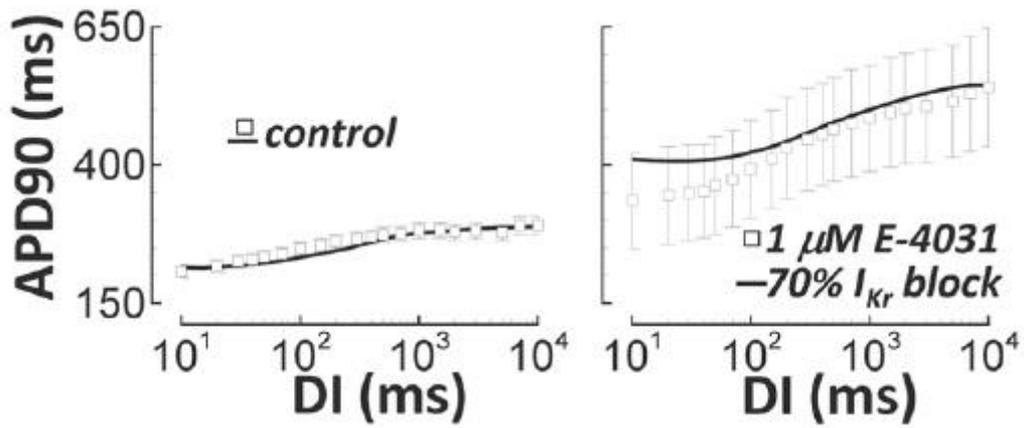


Figura 3.4: influenza sulla dipendenza dalla velocità di APD90 con blocco di I<sub>Kr</sub>

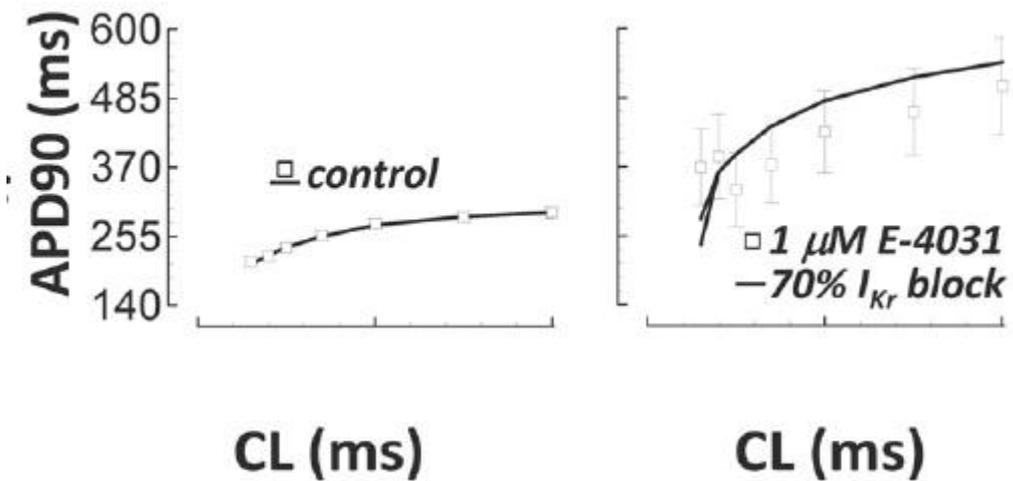


Figura 3.5: influenza sulla restituzione di APD90 con blocco di I<sub>Kr</sub>

### 3.2 Articolo 2: “Iost – Papp” 1998



#### Delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes

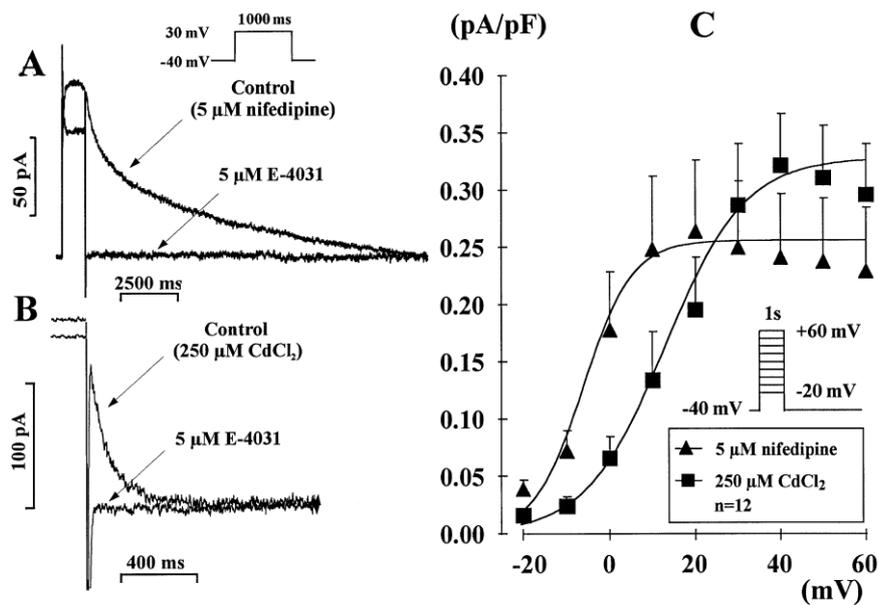
Norbert Iost<sup>a</sup>, László Virág<sup>a</sup>, Miklós Opincariu<sup>b</sup>, János Szécsi<sup>b</sup>, András Varró<sup>a</sup>, Julius Gy. Papp<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Pharmacology, Albert Szent-Györgyi Medical University, Szeged, Hungary

<sup>b</sup>Department of Cardiac Surgery, Albert Szent-Györgyi Medical University, Szeged, Hungary

Received 15 December 1997; accepted 5 June 1998

Questo studio contiene l'analisi sperimentale che è stata poi ripresa da Grandi et al. per la preparazione del modello Grandi Pasqualini Bers. Questo studio è basato su 28 campioni di miociti ventricolari provenienti da 13 cuori umani sani, in esperimenti condotti a 35°C: la corrente è stata studiata con esperimento di v-clamp simile a quello usato in ORd (-40 mV, depolarizzazione fino a 60 mV per 1000 ms, e ripolarizzazione a -40 mV). Data la presenza di altre correnti ioniche, la corrente di potassio è stata valutata dalle correnti di coda, definite come differenza tra il picco di corrente massimo, ed il valore assunto alla fine del test: aggiungendo 5 µM



**Figura 3.6:** effetto della E-4031 sulle correnti di coda in presenza di nifedipina (A) o CdCl<sub>2</sub> (B) e confronto delle curve I-V nelle due differenti soluzioni (C)

di E-4031 alla soluzione, si è osservato che, in presenza sia di nifedipina che di CdCl<sub>2</sub>, la corrente si annullava, indicando che essa costituiva la I<sub>Kr</sub> (fig.[3.6])<sup>10</sup>.

Un risultato molto interessante trovato in questo studio, è il fatto che la cinetica della I<sub>Kr</sub> dipenda fortemente dal Cd<sup>2+</sup>: nello specifico, essa rende la disattivazione della I<sub>Kr</sub> molto più rapida rispetto alla presenza di nifedipina, che al contrario accelera molto l'attivazione della corrente (Tabella 1)<sup>11</sup>

Parameters of kinetics	Nifedipine(5 μM)		CdCl <sub>2</sub> (250 μM)	
	τ <sub>1</sub> (ms)	τ <sub>2</sub> (ms)	τ <sub>1</sub> (ms)	τ <sub>2</sub> (ms)
Activation (at +30 mV, n=6)	31.0±7.4	–	657.1±109.1	–
Deactivation (at -40 mV, n=7-8)	599.9±53.9	6792.2±875.6	126.1±15.7	–

τ=time constant in ms.  
Values=mean±SEM.

**Tabella 1:** effetto sulle costanti di tempo della nifedipina e di CdCl<sub>2</sub>

La cinetica della I<sub>Kr</sub> trovata in questa analisi, ha permesso ai ricercatori di stabilire che questa corrente gioca un ruolo fondamentale nella ripolarizzazione dei miociti ventricolari, e che questa cinetica è molto influenzata da ioni divalenti, come il Cd<sup>2+</sup> o il Ba<sup>2+</sup>.

### 3.3 Articolo 3: “Zhou – January” 1998

230

Biophysical Journal Volume 74 January 1998 230–241

#### Properties of HERG Channels Stably Expressed in HEK 293 Cells Studied at Physiological Temperature

Zhengfeng Zhou, Qiuming Gong, Bin Ye, Zheng Fan, Jonathan C. Makielski, Gail A. Robertson, and Craig T. January

Departments of Medicine (Cardiology) and Physiology, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin 53792 USA

L'analisi condotta da Zhou *et al.* spiega la cinetica della proteina di membrane HERG (acronimo per “human ether-a go-go-related gene”), la quale risulta molto interessante in quanto, come emerge dall'analisi, le caratteristiche di attivazione ed inattivazione di questa proteina somigliano molto a quelle della I<sub>Kr</sub>.

<sup>10</sup> Norbert Iost, László Virág, Miklós Opincariu, János Szécsi, András Varró, Julius Gy. Papp; “*Delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes*”, 1998 Elsevier Science B.V.

<sup>11</sup> Norbert Iost, László Virág, Miklós Opincariu, János Szécsi, András Varró, Julius Gy. Papp; “*Delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes*”, 1998 Elsevier Science B.V.

L'analisi è stata condotta su cellule HEK 293, a temperature fisiologiche, ed in base ad essa, si è osservato come a circa 36°, questi canali presentino una corrente di coda sensibile alla E-4031 molto simile alla  $I_{Kr}$  per voltaggio e tempo dipendenza; confrontando con altri risultati ottenuti con cellule non umane, si è giunti alla conclusione che la corrente espressa dal canale HERG e la  $I_{Kr}$  abbiano stesse cinetiche di attivazione a temperature fisiologiche.

Per quanto riguarda invece la disattivazione e il recupero dalla inattivazione, i dati sono più incerti; utilizzando un singolo esponenziale per fittare la disattivazione, a -40 mV in cellule atriali umane si ottiene una costante di tempo pari a circa 234 ms (36°C, Wang *et al.*, 1994), risultato simile a quello dell'articolo, mentre utilizzando una tecnica di doppio fitting, si osserva che alcune cellule tumorali di ratto (Yang *et al.*, 1994) presentano una disattivazione più rapida di quanto osservato nel presente esperimento.

Per quanto concerne invece la sensibilità al bloccante della  $I_{Kr}$ , E-4031, Zhou *et al.* hanno osservato un risposta nelle cellule HEK 293 simile a quanto riscontrato in precedenza in alcune cellule di maialino d'India (Sanguinetti e Jurkiewicz, 1990), ma differente rispetto ai canali HERG espressi in alcuni sistemi ovociti, probabilmente a causa di una concentrazione differente di  $IC_{50}$ .

In sintesi, la corrente di HERG ha un profilo ed un ruolo che ricalcano molto bene quelli della  $I_{Kr}$ , in particolare per quanto riguarda la fase di attivazione, che inizia subito dopo la depolarizzazione massima del potenziale; l'unica differenza sta nella fase di disattivazione, che tende ad essere più lenta rispetto i normali canali del  $K^+$  a causa di una intensità maggiore della corrente di HERG ad elevati valori di depolarizzazione.

I dati sperimentali contenuti in questo studio sono stati ripresi da Ten Tusscher *et al.* nella preparazione dei modelli TT04 e TT06, in particolare le curve di steady state e la costante di tempo di attivazione della  $I_{Kr}$ .

### 3.4 Articolo 4: “Johnson – Bennet” 1999

Journal List > J Gen Physiol > v.113(4); Apr 1, 1999 > PMC2217168

**JGP**

THE ROCKEFELLER  
UNIVERSITY  
PRESS  
QUALITY AND INTEGRITY

This article at JGP.org | Editors | Contact | Instructions for Authors

J Gen Physiol. Apr 1, 1999; 113(4): 565–580.

PMCID: PMC2217168

#### Human *Ether-à-go-go*-related Gene $K^+$ Channel Gating Probed with Extracellular $Ca^{2+}$

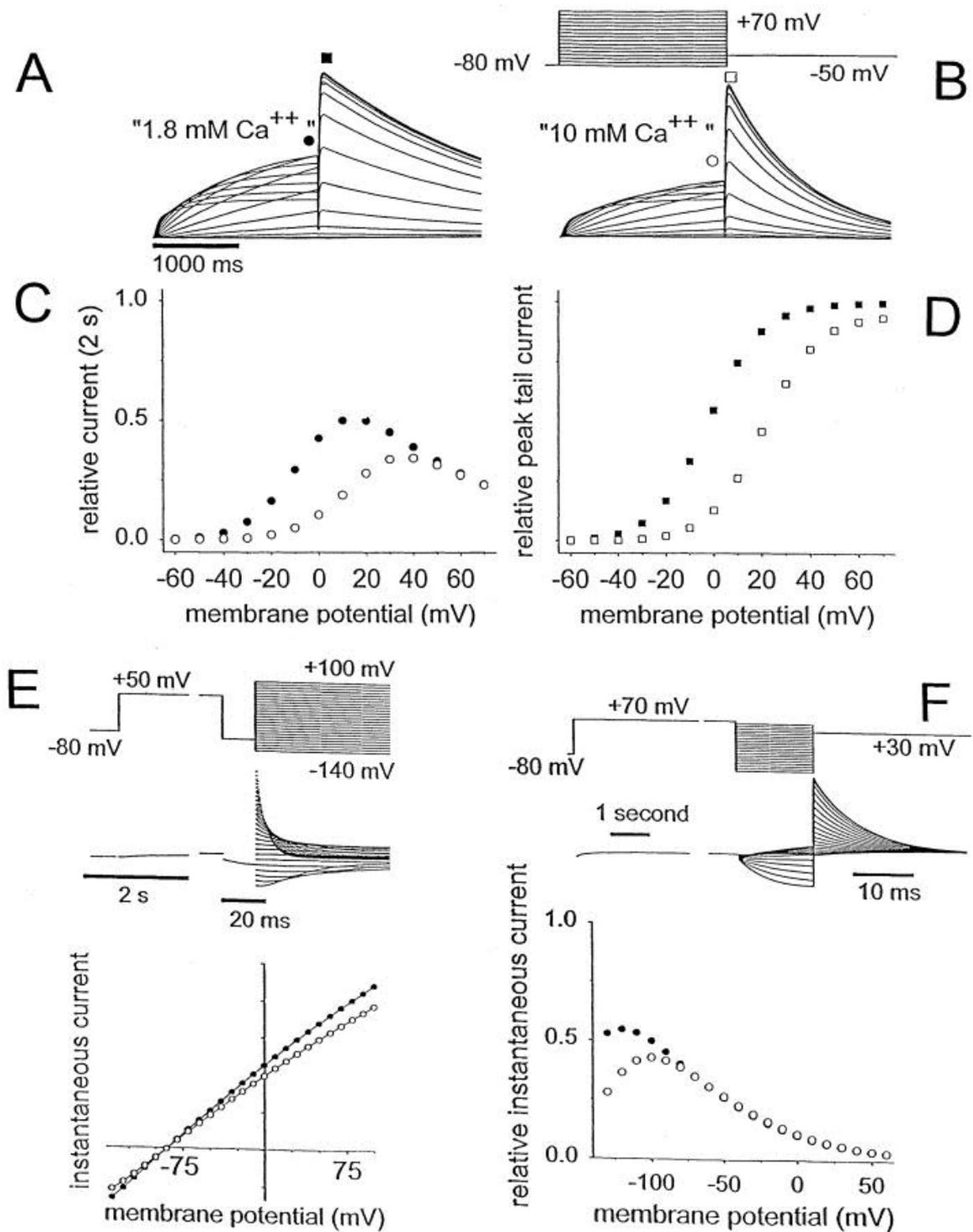
Evidence for Two Distinct Voltage Sensors

J.P. Johnson, Jr., Franklin M. Mullins, and Paul B. Bennett

Il risultato principale emerso da questo esperimento, è stato l'osservazione di una diminuzione della corrente di  $K^+$ , il rallentamento della cinetica di attivazione (causato dal aumento della dipendenza dal potenziale di  $22.3 \pm 2.5$  mV), ed un incremento, invece, della velocità di disattivazione, cambiando la concentrazione di  $Ca^{2+}$  extra cellulare, da 1.8 a 10 mM. L'effetto differente del  $Ca^{2+}$  indica due diversi tipi di sensore per i canali di attivazione e disattivazione.

Nelle cellule cardiache, i canali HERG controllano la corrente di potassio  $I_{Kr}$ , responsabile della ripolarizzazione del potenziale d'azione: questo tipo di canale ionico è caratterizzato da una attivazione voltaggio-dipendente più lenta della rispettiva inattivazione, ed è sensibile alle concentrazioni extra cellulari di  $Ca^{2+}$  e  $K^+$  (fig.[3.7]<sup>12</sup>) (nelle cellule di calamaro, la rimozione di questi ioni causa perdita di selettività dei gates di  $I_{Kr}$  (Sanguinetti and Jurkiewicz, 1990, 1992).

<sup>12</sup> J.P. Johnson Jr., Franklin M. Mullins, Paul B. Bennett; “Human *Ether-a-go-go*-related Gene  $K^+$  Channel Probed with Extracellular  $Ca^{2+}$ ” *J. Gen Physiol*, Apr 1 1999; 113(4): 565-580



**Figura 3.7:** cinetiche e voltaggio dipendenza delle correnti di K<sup>+</sup> all'interno del modello

### 3.5. Articolo 5: “Jost – Nattel” 2008

(*Circulation*. 2008;118:5\_342.)

© 2008 American Heart Association, Inc.

---

#### Cellular Electrophysiology/Electropharmacology

### Abstract 1520: Molecular Basis of Repolarization Reserve Differences between Dogs and Man

Norbert Jost<sup>1</sup>; Andras Varro<sup>2</sup>; Viktoria Szuts<sup>2</sup>; Peter P Kovacs<sup>3</sup>; Gyorgy Seprényi<sup>4</sup>; Péter Biliczki<sup>4</sup>; Csaba Lengyel<sup>4</sup>; Janos Prorok<sup>4</sup>; Miklos Bitay<sup>4</sup>; Balazs Ördög<sup>5</sup>; Janos Szabad<sup>6</sup>; Zoltan Varga-Orvos<sup>7</sup>; Laszlo Puskas<sup>7</sup>; Diego Cotella<sup>8</sup>; Julius G Papp<sup>9</sup>; Laszlo Virag<sup>9</sup>; Stanley Nattel<sup>10</sup>

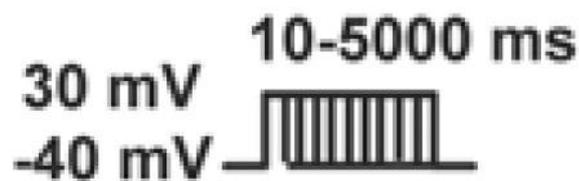
Lo studio presenta un confronto tra proprietà delle correnti di potassio di cellule canine con cellule umane. Durante questa comparazione, sono emerse densità di  $I_{Kr}$  simili nei due campioni ( $0.37 \pm 0.03$  pA/pF vs  $0.29 \pm 0.05$  pA/pF,  $P=ns$ , rispettivamente), mentre invece risulta diversa la risposta del APD nei due fenotipi in conseguenza ad un blocco della  $I_{Kr}$ : infatti si ha un prolungamento del APD del  $44 \pm 4$  % nell' uomo, mentre solo del  $16 \pm 2$  % nella cellula canina.

## 4. METODI

In questo capitolo vengono descritte le tecniche utilizzate per la simulazioni degli esperimenti di voltage-clamp e current-clamp, riportati nel capitolo precedente.

Lo strumento principale utilizzato per questo obiettivo è stato il software MATLAB (sviluppato dalla MatWorks inc.). Tutti i modelli matematici utilizzati sono disponibili come *function file*, ognuno costituito da un set di equazioni differenziali e numerosi parametri, tutti collegati ad una particolare dinamica cellulare.

I modelli vengono richiamati da appositi files *main* (“newMain” vedere APPENDICE), che risolvono tali equazioni differenziali attraverso il comando “ode” della “odesuite”, un solutore numerico. I modelli possono essere utilizzati in current-clamp, ovvero fornendo uno stimolo di corrente che dà origine al potenziale d’azione, oppure in voltage-clamp, ovvero fissando il potenziale di membrana ad un valore costante.

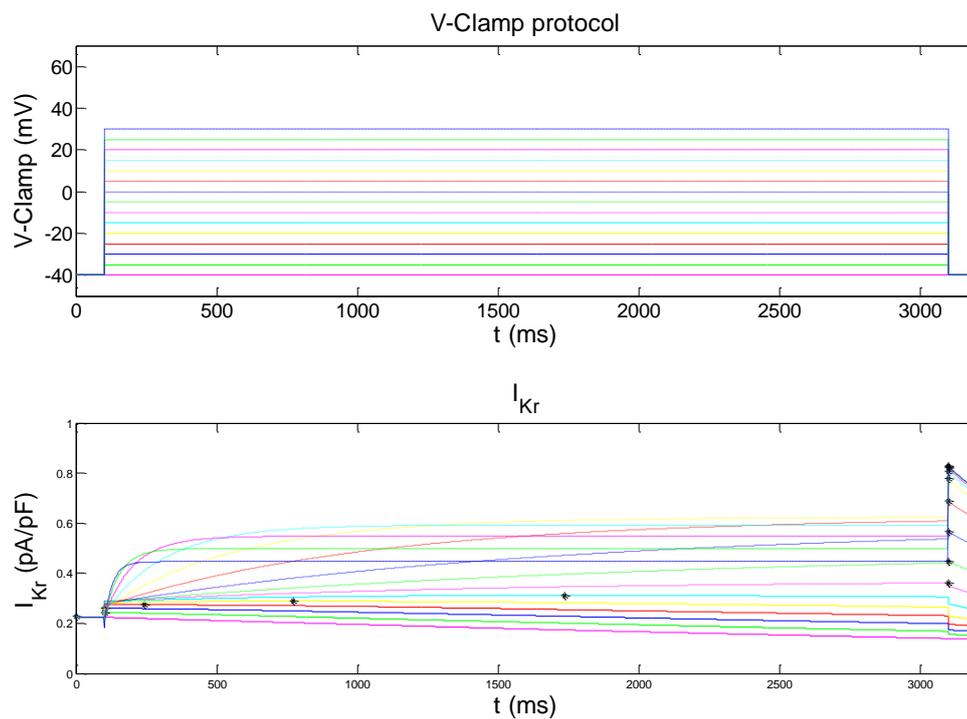


**Figura 4.1:** Esempio di protocollo di V-clamp protocollo per voltage-clamp (qui, quello utilizzato da O’Hara Rudy)

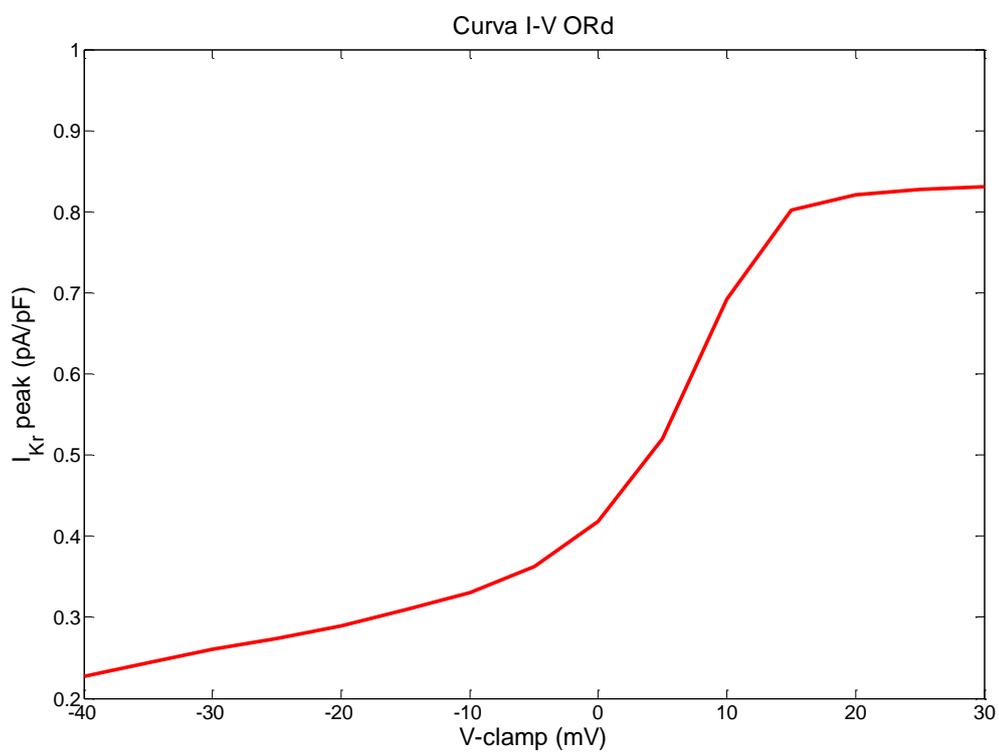
In particolare, per riprodurre gli esperimenti di voltage-clamp riportati nel Capitolo 3 è stato implementato un opportuno file Matlab (“ProtocolloIKr” vedere APPENDICE) che al termine del periodo di stimolazione si occupasse anche di calcolare la corrente  $I_{Kr}$  e la rispettiva curva di attivazione.

La curva I-V è molto importante per capire la come varia l’intensità della corrente ionica in funzione del potenziale di membrana a cui viene portata la cellula dopo un periodo di riposo, ad un potenziale molto negativo (-80 mV). Essa si calcola considerando il picco della corrente per ogni valore di potenziale considerato diviso per la corrispondente driving, ottenendo quindi la conduttanza della membrana. Tutti i valori vengono normalizzati rispetto al valore massimo. Quello che si ottiene

è quindi una sigmoide che va da 0 a 1, che rappresenta appunto la curva I-V (fig. [4.2, 4.3]).



**Figura 4.2:** simulazione del protocollo per voltage-clamp nel modello ORd



**Figura 4.3:** esempio di curva I-V ottenuta per il modello ORd

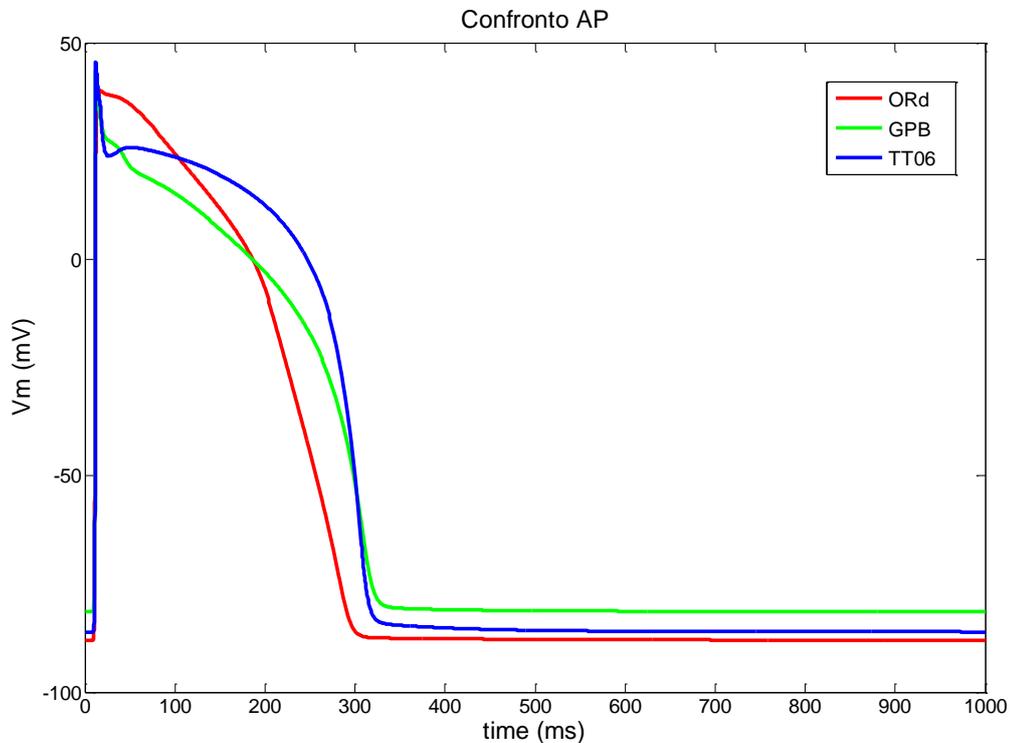
Dallo studio degli articoli scientifici riportati nel Capitolo 3, sono stati in particolare ricavati 3 diversi protocolli di voltage-clamp per il calcolo della curva I-V: tutti i protocolli sono simili tra loro, ma si differenziano leggermente nei i valori della tensione iniziale applicata, così come nei i tempi di mantenimento e nelle concentrazioni intra- ed extra-cellulari. (fig.[4.8]).

## 5. RISULTATI

In questo capitolo sono presentati i risultati di simulazione in ambiente MATLAB per i tre modelli di potenziale sopra elencati, con particolare riferimento alle caratteristiche della  $I_{Kr}$  in ciascuno di essi.

### 5.1 Confronto dei modelli

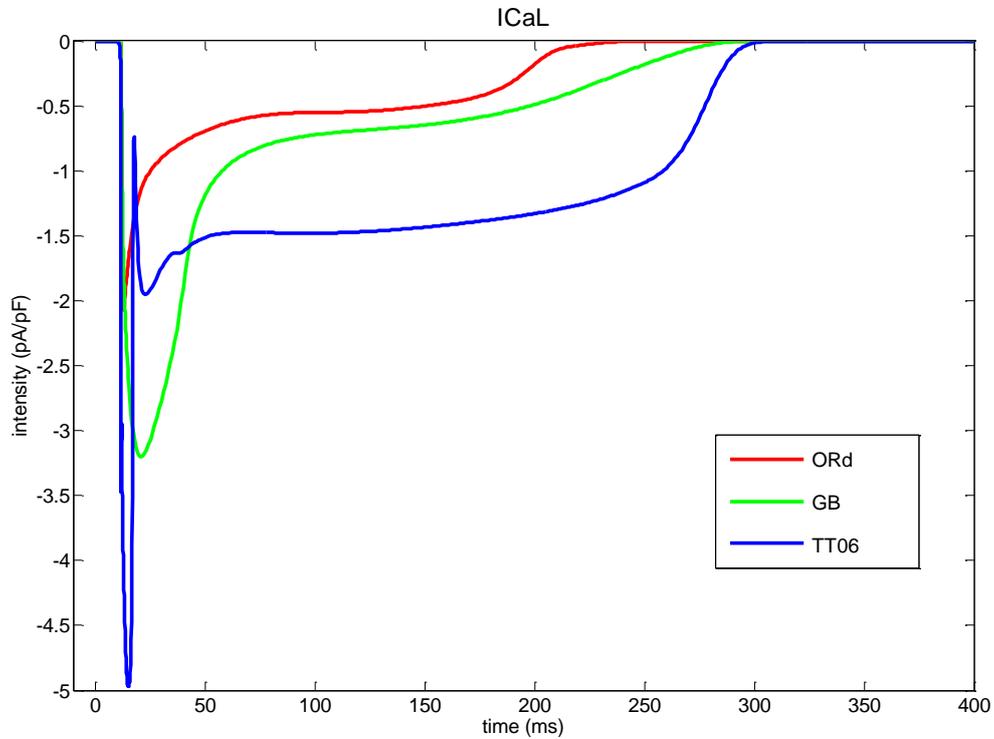
Come prima cosa sono state eseguite delle simulazioni in current clamp, per confrontare tra loro i modelli considerati: in particolare, sono stati confrontati i tre potenziali d'azione (fig.[5.1]), e le principali correnti ioniche (fig. [5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7 e 5.8]).



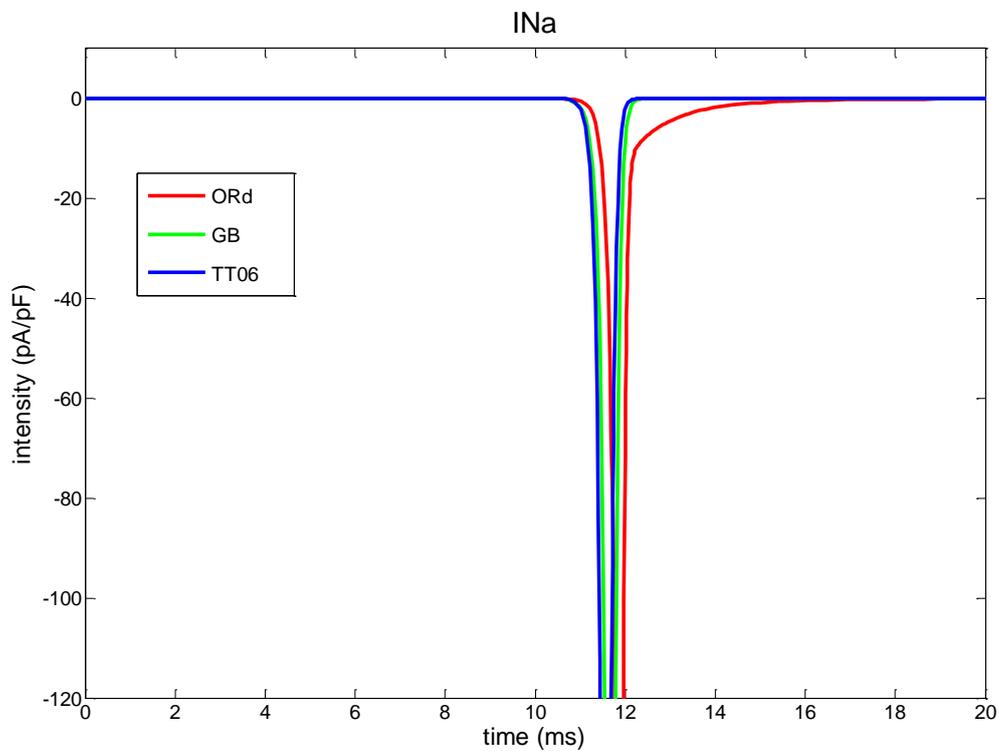
**Figura 5.1:** confronto dei potenziali d'azione dei tre modelli

Dal confronto dei potenziali emerge che quello del modello ORd presenta un plateau più breve degli altri due, ed anche una ripolarizzazione transiente (fase 2) molto meno accentuata; al contrario, invece, il potenziale di TT06 ha una componente di ripolarizzazione transiente molto più intensa, e questo si evince anche dall'andamento della  $I_{to}$  in TT06, ove si osserva un valore del picco molto

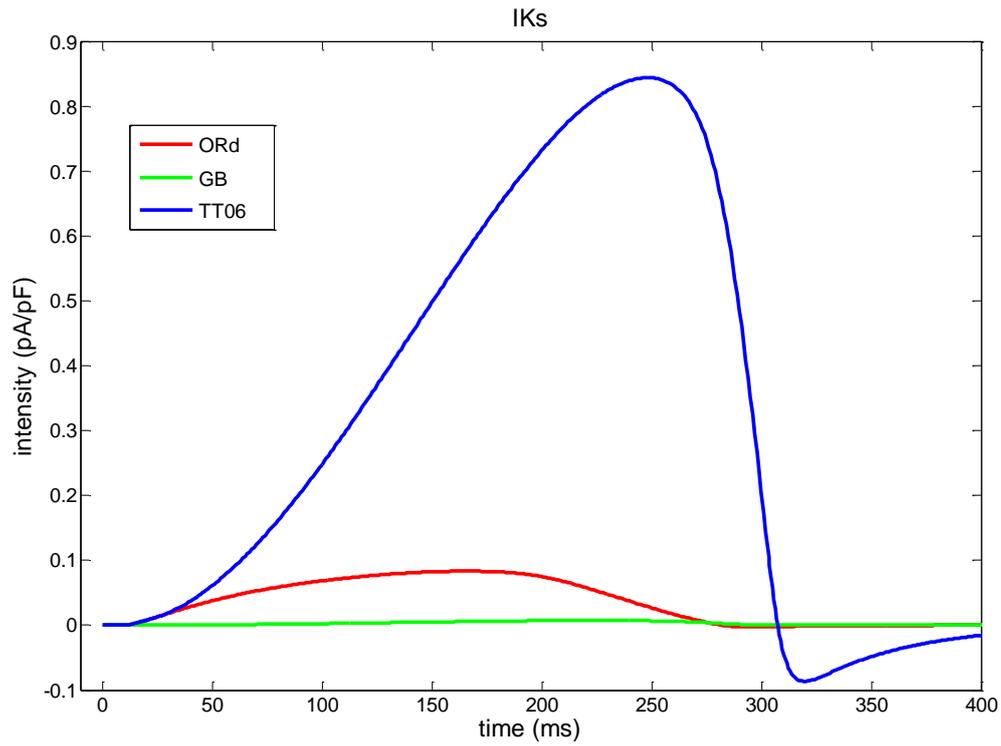
maggiore degli altri due. E' anche possibile osservare una fase di plateau più prolungata nel AP di TT06, dovuto agli alti valori della corrente di calcio  $I_{CaL}$  e delle correnti di potassio, le quali poi favoriscono una ripolarizzazione molto rapida a causa dei picchi molto accentuati che presentano ( $I_{Ks}$  e  $I_{Kr}$ ).



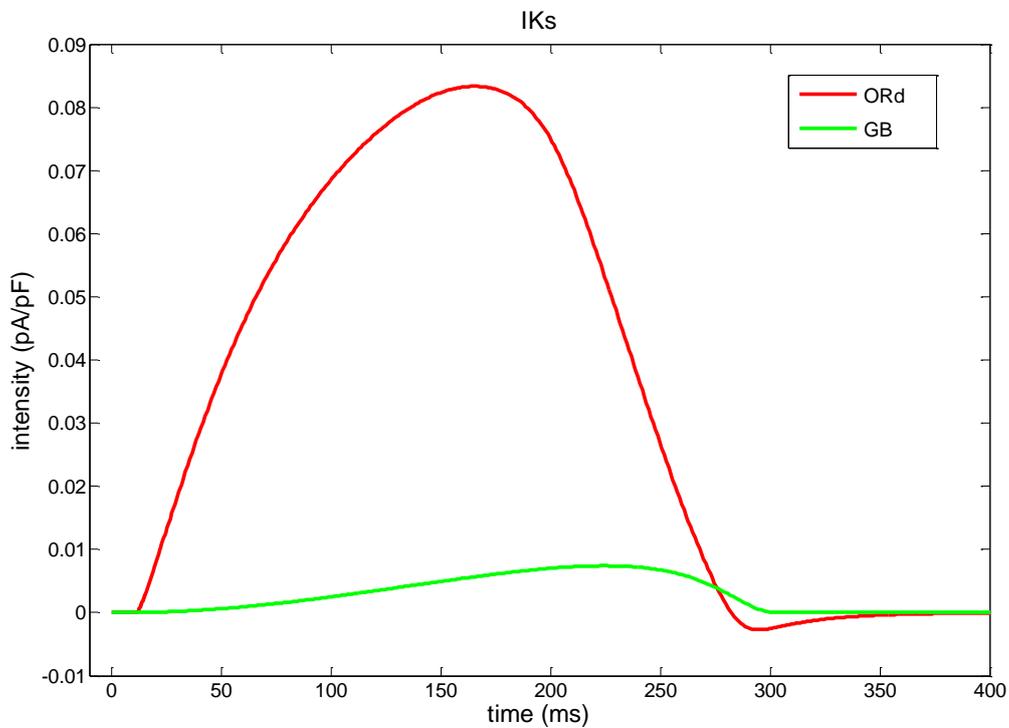
**Figura 5.2:** confronto della corrente di calcio  $I_{CaL}$



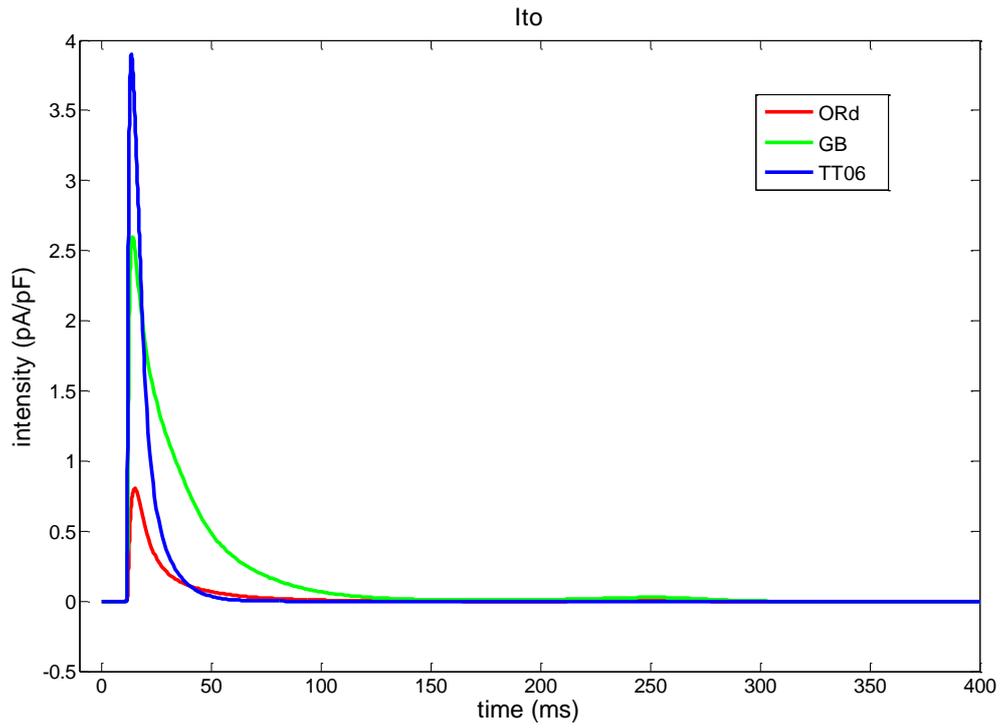
**Figura 5.3:** confronto della corrente di sodio  $I_{Na}$



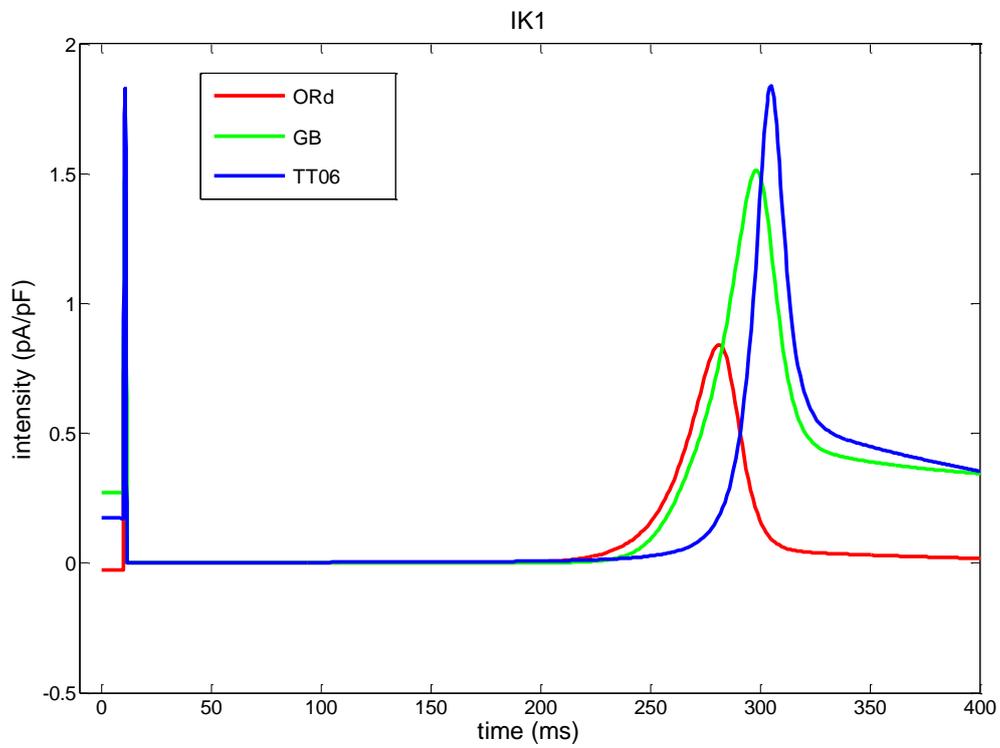
**Figura 5.4:** confronto della corrente di potassio  $I_{Ks}$



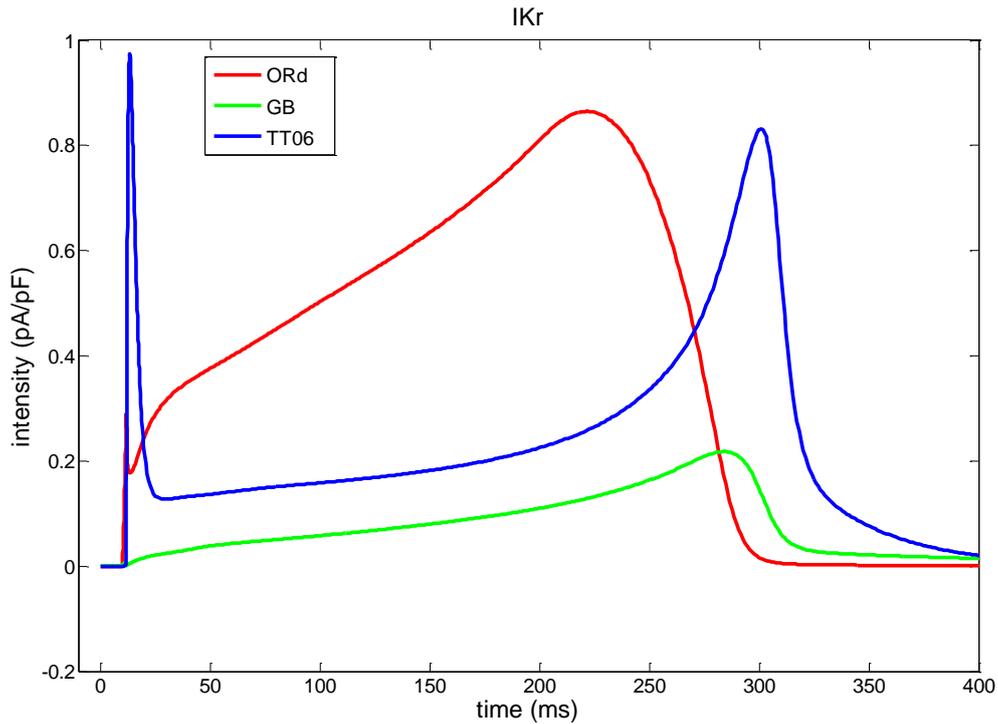
**Figura 5.5:** confronto della corrente di potassio  $I_{Ks}$  (solo modelli ORd e GB)



**Figura 5.6:** confronto della corrente di potassio  $I_{to}$



**Figura 5.7:** confronto della corrente di potassio  $I_{K1}$



**Figura 5.8:** confronto della corrente di potassio  $I_{Kr}$ .

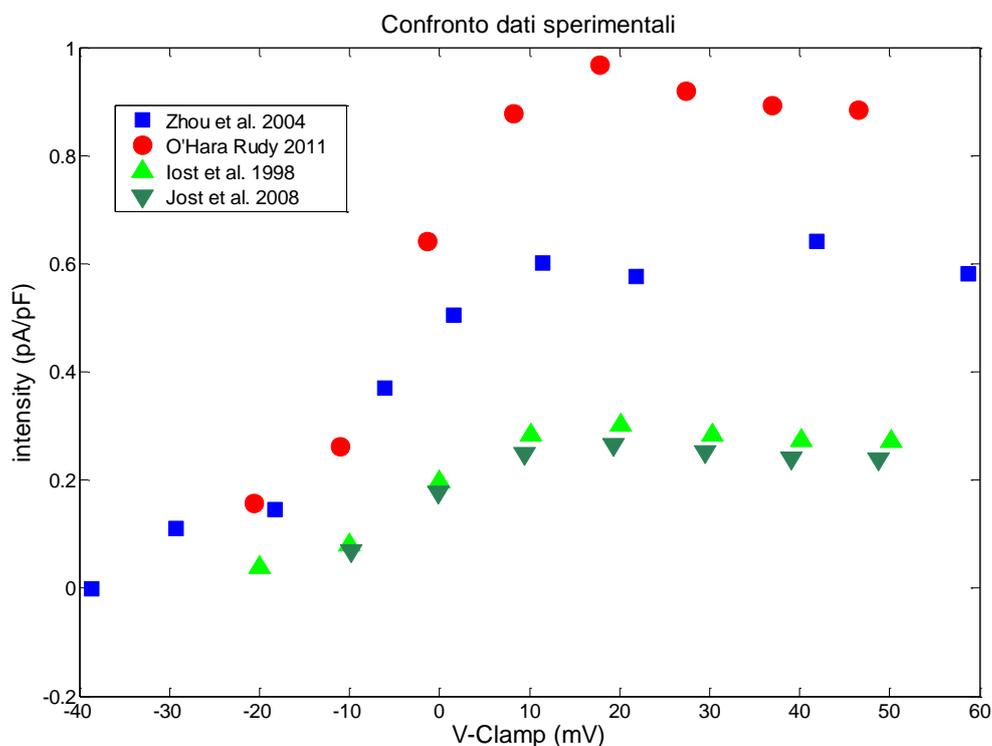
Per quanto riguarda il potenziale del modello GB invece, esso presenta una fase di ripolarizzazione meno ripida rispetto gli altri due potenziali: una caratteristica che si può dedurre valutando i grafici delle correnti di potassio di questo modello, che presentano dei valori più bassi rispetto quelli riportati per ORd e TT06; le correnti di calcio e sodio, comunque, sono più intense rispetto ORd, infatti la fase di plateau del Grandi Bers è più lunga e costante. Una nota anche sulla corrente  $I_{Ks}$ : essa presenta dei valori molto alti nel modello TT06 rispetto gli altri due; questo è un limite riconosciuto per tale modello, e per sottolineare questa discrepanza di valori sono riportate le figure della  $I_{Ks}$  in O’Hara Rudy e Grandi Bers da sole (fig.[4.5]), e anche in confronto a quella ottenuta per il modello di Ten Tusscher (fig.[4.4]).

#### 4.2 Implementazione protocollo per il voltage-clamp della $I_{kr}$

Dopo aver condotto le simulazioni in current-clamp, sono stati quindi riprodotti gli esperimenti di v-clamp per calcolare la curva di attivazione della corrente  $I_{Kr}$ .

In particolare, sono stati simulati per i tre modelli considerati tutti i protocolli sperimentali presenti in letteratura relativi alla curva di attivazione di tale corrente, che presenta una forma sigmoideale, compresa tra zero (corrente nulla) e 1 (corrente massima). I dati sperimentali degli articoli sono stati ottenuti con diverse condizioni sperimentali (ad esempio concentrazioni elettrolitiche) e quindi differiscono leggermente l'uno dall'altro. In simulazione sono stati riprodotti i protocolli con le relative condizioni sperimentali per i tre modelli considerati, confrontando sia le performance dei diversi modelli tra loro che con i risultati sperimentali.

Prima di iniziare con il confronto dei protocolli, abbiamo effettuato una comparazione dei dati sperimentali (fig. [5.9]).



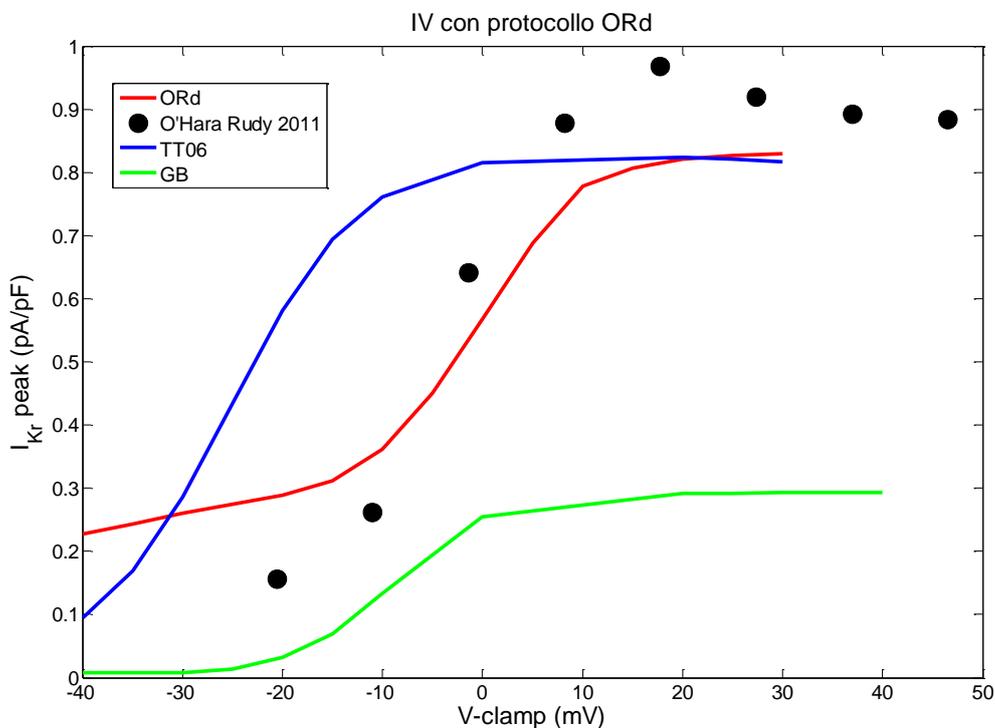
**Figura 5.9:** confronto dei dati sperimentali

Come evidenziato in figura, i dati sperimentali risultano differenti tra loro. In particolare, i valori ottenuti da O'Hara-Rudy sono quelli che più riproducono la forma attesa dell'attivazione, coprendo tutto il range di attivazione tra 0 e 1. I dati di Iost e Jost, invece, sono quelli che più si discostano dall'andamento atteso, e

infatti sembra che la corrente non arrivi mai ad un'attivazione completa, neanche per valori di potenziale molto positivi.

Verranno di seguito confrontati i risultati di simulazione ottenuti per i tre modelli considerati e i dati sperimentali presentati in Fig. 5.9.

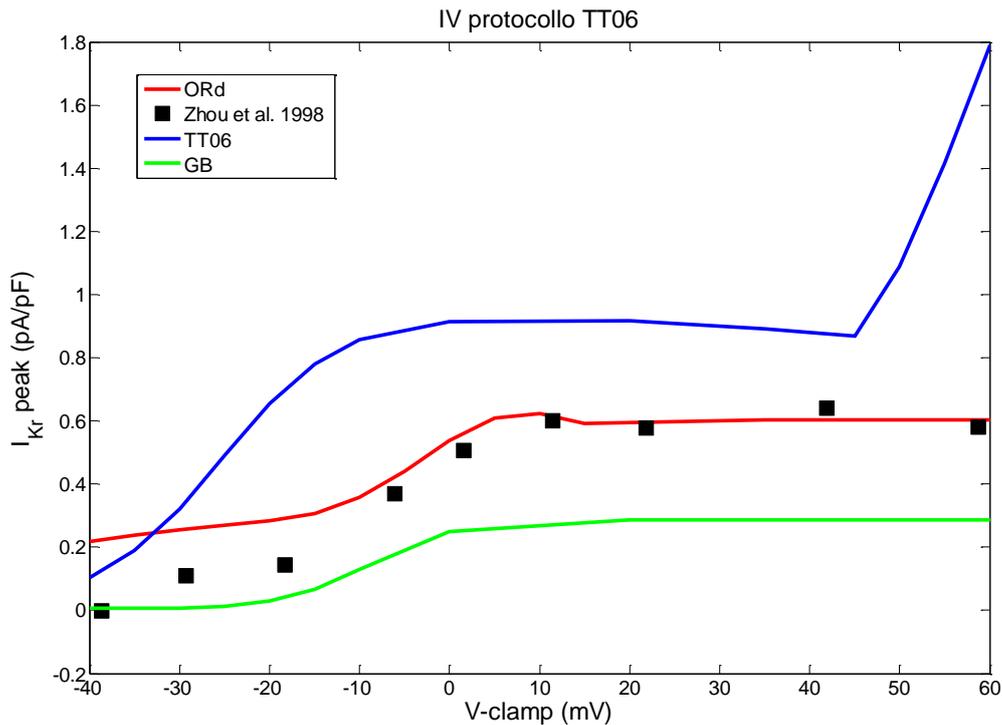
Il primo protocollo riprodotto è quello utilizzato da O'Hara Rudy, già riportato come esempio in fig. 4.2: a partire da un valore di riposo di  $-40$  mV, le cellule sono state portate di volta in volta a diversi gradini di tensione, con ampiezza crescente fino a  $+30$  mV, e mantenuti fino a raggiungere l'equilibrio (circa 3 s), per poi tornare nuovamente al valore di riposo di  $-40$  mV (fig. [5.10]).



**Figura 5.10:** confronto curve I-V con protocollo di voltage-clamp di O'Hara Rudy

In questa figura si può osservare come le curve ottenute dai modelli ORd e TT06 si avvicinino maggiormente al profilo dei dati sperimentali, mentre il modello GB se ne discosta notevolmente.

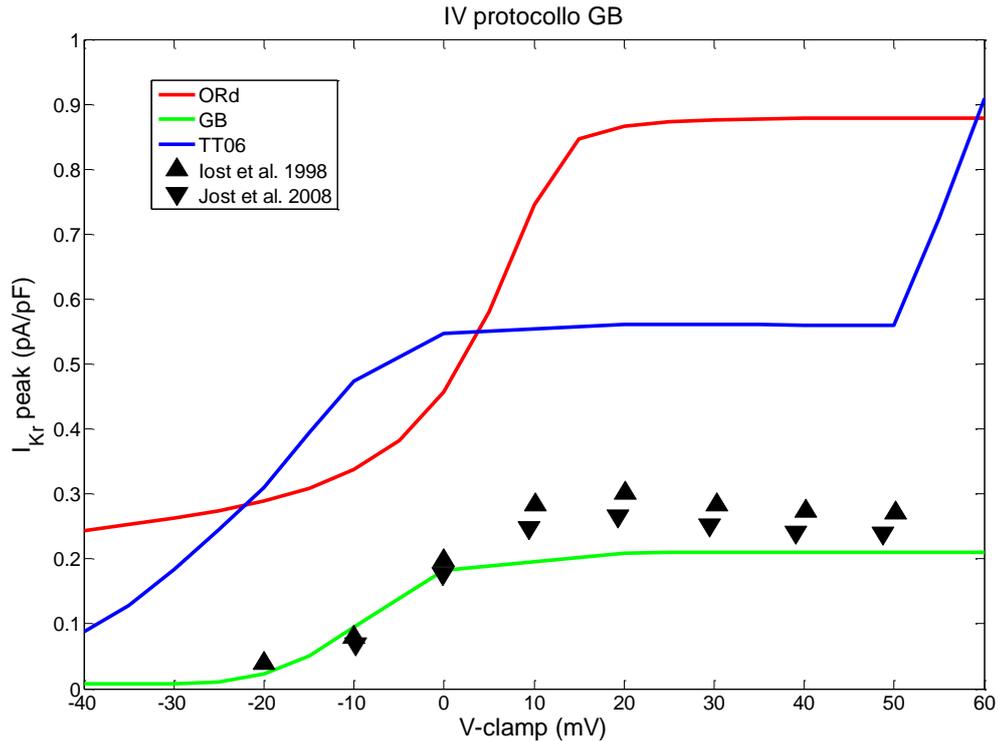
Il secondo protocollo riprodotto è stato quello utilizzato dai modelli TT04 e TT06: la forma è identica alla precedente, ma questa volta la tensione di riposo è pari a  $-60$  mV, e i gradini di potenziale arrivano fino a  $+60$  mV.



**Figura 5.11:** confronto curve I-V con protocollo di voltage-clamp di Zhou et al.

In questo caso, in realtà, è il modello ORd ad avvicinarsi maggiormente ai dati sperimentali. Il modello TT06 ne riproduce bene la forma, ma la curva appare leggermente shiftata verso potenziali più negativi. In generale comunque, l'andamento delle curve è molto simile a quello ottenuto per il protocollo precedente, indicando quindi che la situazione di partenza a -60 mV invece di -40 mV non modifica la dinamica della corrente  $I_{Kr}$  in nessuno dei 3 modelli.

Infine, è stato riprodotto il protocollo utilizzato da Iost *et al*, dove il potenziale di riposo è nuovamente impostato a -40 mV, ma i gradini di tensione (crescenti fino a +60 mV) vengono mantenuti per soli 1000 ms (fig. [5.12]).



**Figura 5.11:** confronto curve I-V con protocollo di voltage-clamp di Iost et al e Jost et al.

In questo caso, il modello che meglio riproduce i dati sperimentali è il modello Grandi, che infatti si basa proprio sugli articoli di Iost e Jost, che presentano una curva di attivazione che non raggiunge il valore massimo, ovvero 1.

Questi risultati di simulazione evidenziano quindi come diversi modelli con una struttura simile possano presentare differenze anche significative a livello delle singole correnti ioniche e delle dinamiche da esse controllate.

In realtà il vero problema non è tanto a livello dei modelli matematici, quanto dei dati sperimentali su cui tali modelli vengono costruiti e validati. Infatti, i dati sperimentali umani continuano a rimanere rari in letteratura, e spesso da laboratorio a laboratorio ci sono differenze notevoli, e non è facile capire quali siano i dati più o meno affidabili. Sicuramente questo problema potrà essere risolto soltanto con una migliore standardizzazione degli esperimenti, in termini di protocolli sperimentali e concentrazioni ioniche, e con esperimenti svolti su un maggior numero di cellule, e quindi più robusti.

## CONCLUSIONI

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di mettere a confronto i tre più recenti modelli matematici di potenziale d'azione ventricolare umano, in particolare per quanto riguarda le formulazioni della corrente  $I_{Kr}$ . Tale corrente è fondamentale per la fase di ripolarizzazione del potenziale cardiaco, e sue alterazioni possono allungare il potenziale d'azione e aumentare di conseguenza il rischio di aritmie, anche letali.

Le formulazioni della corrente  $I_{Kr}$  sono diverse da modello a modello, perché basate su dati sperimentali raccolti in esperimenti di voltage-clamp, che possono essere leggermente diversi da laboratorio a laboratorio.

Dopo aver fatto una ricerca in letteratura dei dati disponibili per cellule cardiache umane, sono stati quindi raccolti quelli relativi alla curva di attivazione della corrente  $I_{Kr}$ , che mostra la quantità di corrente disponibile per ogni valore di potenziale di membrana.

In seguito, sono stati riprodotti in simulazione i corrispondenti protocolli sperimentali per i tre modelli matematici considerati, confrontando tra loro i risultati ottenuti. Ogni modello, come atteso, ha riprodotto accuratamente i dati che sono stati utilizzati per la sua formulazione, discostandosi invece dagli altri dati disponibili, a volte anche molto diversi tra loro.

Da questo studio, quindi, possiamo concludere che la scarsità di dati sperimentali disponibili rimane ancora una delle più grosse limitazioni nella costruzione di modelli matematici di potenziale d'azione cardiaco, in particolare per cellule umane. I dati disponibili sono pochi e l'alta variabilità biologica rende difficile giudicarne l'affidabilità, in particolare quando si riscontrano differenze significative tra i diversi esperimenti.

La scelta dei dati da utilizzare per la costruzione di un modello è quindi importante, e può modificare la robustezza del modello stesso. Pertanto, è importante sempre cercare di fare una validazione del modello accurata, controllandone in particolare l'applicabilità in tutti i contesti in cui se ne prevede l'utilizzo.

## BIBLIOGRAFIA

- K. H. W. J. ten Tusscher, D. Noble, P. J. Noble, and A. V. Panfilov, “*A model for human ventricular tissue*” Department of Theoretical Biology, Utrecht University, 3584 CH Utrecht, The Netherlands; University Laboratory of Physiology, University of Oxford, Oxford OX1 3PT; Division of Mathematics, University of Dundee, Dundee DD1 4HN, United Kingdom
- Thomas O’Hara, László Virág, András Varró, Yoram Rudy, “*Simulation of the Undiseased Human Cardiac Ventricular Action Potential: Model Formulation and Experimental Validation*”, Andrew D. McCulloch, University of California San Diego, United States of America, published on May 26, 2011
- Eleonora Grandi, Francesco S. Pasqualini, Donald M. Bers; “*A novel computational model of the human ventricular action potential and Ca transient*” Volume 48, Issue 1, January 2010, Pages 112–121.
- Norbert Iost, László Virág, Miklós Opincariu, János Szécsi, András Varró, Julius Gy. Papp; “*Delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes*”, 1998 Elsevier Science B.V.
- J.P. Johnson Jr., Franklin M. Mullins, Paul B. Bennet; “*Human Ether-a-go-go-related Gene  $K^+$  Channel Probed with Extracellular  $Ca^{2+}$* ” *J. Gen Physiol*, Apr 1 1999; 113(4): 565-580
- Zhou Z, Gong Q, Ye B, Fan Z, Makielski JC, Robertson GA, et al. “*Properties of HERG channels stably expressed in HEK 293 cells studied at physiological temperature*”. *Biophys J* 1998; 74(1):230–41.
- Jost N, Varró A, Szüts V, Kovács PP, Seprényi G, Biliczki P, et al. “*Molecular basis of repolarization reserve differences between dogs and man*”. *Circulation* 2008;118 (8) Suppl-2, S342 (abstract)
- “*Capitolo 1: Fisiologia del potenziale d’azione*”, “*Capitolo 2: strumenti e metodi*” tesi di Giulia Callisesi;
- [www.wikipedia.it](http://www.wikipedia.it)

## APPENDICE

- **Protocollo per voltage-clamp della IKr**

```
clear all; close all; clc;
%% Magyar Protocol (A): IKr Steady State Activation and I-V curve
% V-Clamp protocol (2 steps simulations):
% 1) 100ms with V holding = -40mV
% 2) 1000ms with V clamp = vettore da definire, es. -35:5:30mV
% 3) 100ms with V holding = -40mV
% INPUTS:
% - modello: model m-file
% - nomefile_y0_SS: file da caricare con y0_SS (vanno bene 100b con
frequenza a 1Hz)
% - report 1 -> plot; report 3 -> detailed plot report;
%   -> consiglio: metti il report sempre a 3, così vedi anche le
correnti
% - file_s -> nome per il salvataggio es. 'ProvaICaL' (con le
virgolette)
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% Data Loading
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
nome_modello = 'TT06';
addpath('modelli');
report = 3;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% SALVATAGGIO
nsave = ['DataVClamp\' nome_modello];
if ~exist(nsave, 'dir')
    mkdir(nsave)
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% SCELTA MODELLO E CI: in base al modello (ORd, GB o TT06) viene
caricata la rispettiva matrice y0_SS
switch nome_modello
    case 'ORd'
        load 'y0_ORd500_SS.mat'
        modello=@ORd_ENDO;
        y0 = y0_SS;
        colore='red';
    case 'GB'
        load 'y0_GB500_SS.mat'
        modello=@GPB_ENDO;
        y0 = y0_SS;
        colore='green';
    case 'TT06'
        load 'y0_TT06500_SS.mat'
        modello=@TT06_ENDO;
        y0 = y0_SS;
        colore='blue';
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% Main Settings
```

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% V-clamp: valore iniziale di -40 mV per 100ms, poi gradino fino a
30 mV,
% e di nuovo giu a -40 mV
v_hold = -40; %mV
pclamp = [-40:5:-5,0.01 5:5:30]; %mV
v_hold2 = -40; %mV
PIKr = zeros(length(pclamp),1);
% interpulse intervals -> durata del primo e del secondo tratto di
V-Clamp
ts1 = 100; ts2 = 1000; ts3 = 100;
options=odeset('MaxStep',1);
colori = 'mgbryc'; linea = {'-',':','-.-','--'}; kl = 1; nplot =
1;
if report==3
    axis3 = [0 ts1+ts2+ts3 -1 1];      axis3V = [0 ts1+ts2+ts3 -50
70];
    hIKr=figure('Name','VClamp');
    subplot(2,1,1); hold on; box; axis(axis3V);
    xlabel('t (ms)'); ylabel('V-Clamp (mV)');
    title('V-Clamp protocol');
    subplot(2,1,2); hold on; box; axis(axis3);
    xlabel('t (ms)'); ylabel('I_{Kr} (pA/pF)');
    title('I_{Kr}');
    namehIKr = [nsave '_IKrplot'];
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% V-clamp cycle:
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
for iv=1:length(pclamp)
v_clamp = pclamp(iv);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% V-Clamp protocol -> Ely:
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
    % 1st step: V_hold held for t1
    x0 = y0;      x0(1)=v_hold;      t0=0;
    [t1,y1] = ode15s(modello,[t0 t0+ts1],x0,options,1,[3 -40]);
    % 2nd step: V_clamp held for t2
    x0 = y1(end,:); x0(1)=v_clamp;      t0=t1(end);
    [t2,y2] = ode15s(modello,[t0 t0+ts2],x0,options,1,[3 -40:5:-
5,0.01 5:5:30]);
    % 3rd step: V_hold2 held for t3
    x0 = y2(end,:); x0(1)=v_hold2;      t0=t2(end);
    [t3,y3] = ode15s(modello,[t0 t0+ts3],x0,options,1,[3 -40]);
    % Tempo e Y totali dei 3 step
    t_tot=[t1;t2;t3]; y_tot=[y1;y2;y3];
    %Calcolo correnti -> in questo caso è ICaL ma puoi cambiare
    IKr=zeros(size(t_tot));
    for j=1:length(t_tot)
        CVs=feval(modello,t_tot(j),y_tot(j,:),0,1);
        IKr(j)=CVs(5);
    end
    %Calcolo del picco
    [PIKr(iv),iP] = max(IKr);
    %IKr plot

```

```

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

```

- **Main per il calcolo del potenziale d'azione del modello**

```

clear all; close all; clc;
addpath('modelli');
% Numero di Battiti
nb = 10;
% Cycle Length
BCL = 1000;
odeSTEP = 1;
options=odeset('MaxStep',odeSTEP);
%% SELEZIONE MODELLO: scelte possibili ORd GB & TT06
nome_modello = 'ORd';
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% SALVATAGGIO
nsave = ['DataSim\' nome_modello '_' num2str(nb) 'b_CL'
num2str(BCL)];
if ~exist(nsave,'dir')
    mkdir(nsave)
end
cNai=zeros(length(nb),1);
cKi=zeros(length(nb),1);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% SCELTA MODELLO E CI
load('modCI');
switch nome_modello
    case 'ORd'
        modello=@ORd_ENDO;
        nV=1; % posizione in cui si trova V
        nNai=2; % posizione in cui si trova Nai

```

```

        nKi=4; % posizione in cui si trova Ki
        y0 = y0_ORD;
        colore='m';
    case 'GB'
        modello=@GPB_ENDO;
        nV=39;
        nNai=31;
        nKi=28;
        y0 = y0_GB;
        colore='g';
    case 'TT06'
        modello=@TT06_ENDO;
        nV=12;
        nNai=17;
        nKi=13;
        y0 = y0_TT06;
        colore='b';
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% SIMULAZIONE
a=tic;
%% ARGOMENTI DEL MODELLO (quelli dopo options)
% 1) flag_ode: 1 quando integro, 0 quando voglio recuperare le
correnti
% 2) 1: current clamp, [3 Vclamp] per il Vclamp
for n=1:nb
    [t,y] = ode15s(modello,[0 BCL],y0,options,1,1);
    y0 = y(end,:);
    cNai(n)=y(end,nNai);
    cKi(n)=y(end,nKi);
end
tsim=toc(a);
fprintf('Tempo di Simulazione: %5.2f secondi\n',tsim);
y0_SS = y0;
save([nsave '\y0_SS'], 'y0_SS');
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% FIGURE
h1=figure;
ylabel('V_m')
xlabel('time');
plot(t,y(:,nV),colore,'LineWidth',2);
saveas(h1,[nsave '\AP']);
Ctot=figure;
subplot(2,1,1);
ylabel('[Na]_i')
xlabel('beats');
plot(1:nb,cNai,colore,'LineWidth',2);
subplot(2,1,2);
ylabel('[K]_i')
xlabel('beats');
plot(1:nb,cKi,colore,'LineWidth',2);
saveas(Ctot,[nsave '\NaiKi']);

```

- **Main per il calcolo delle correnti**

```

clear all; close all; clc;
addpath('modelli');
% Numero di Battiti
nb = 10;
% Cycle Length
BCL = 1000;
odeSTEP = 1;
options=odeset('MaxStep',odeSTEP);
%% SELEZIONE MODELLO: scelte possibili ORd GB & TT06
nome_modello = 'GB';
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%
%% SALVATAGGIO
nsave = ['DataSim\' nome_modello '_' num2str(nb) 'b_CL'
num2str(BCL)];
if ~exist(nsave,'dir')
    mkdir(nsave)
end
cNai=zeros(length(nb),1);
cKi=zeros(length(nb),1);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%
%% SCELTA MODELLO E CI
load('modCI');
switch nome_modello
    case 'ORd'
        modello=@ORd_ENDO;
        nV=1; % posizione in cui si trova V
        nNai=2; % posizione in cui si trova Nai
        nKi=4; % posizione in cui si trova Ki
        y0 = y0_ORd;
        colore='red';
    case 'GB'
        modello=@GPB_ENDO;
        nV=39;
        nNai=31;
        nKi=28;
        y0 = y0_GB;
        colore='green';
    case 'TT06'
        modello=@TT06_ENDO;
        nV=12;
        nNai=17;
        nKi=13;
        y0 = y0_TT06;
        colore='blu';
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%
%% SIMULAZIONE
a=tic;
%% ARGOMENTI DEL MODELLO
% 1) flag_ode: 1 quando integro, 0 quando voglio recuperare le
correnti
% 2) 1: current clamp, [3 Vclamp] per il Vclamp
for n=1:nb

```

```

        [t,y] = ode15s(modello,[0 BCL],y0,options,1,1);
        y0 = y(end,:);
        cNai(n)=y(end,nNai);
        cKi(n)=y(end,nKi);
end
%Calcolo correnti
    IKr=zeros(size(t));
    IKs=zeros(size(t));
    Ito=zeros(size(t));
    INa=zeros(size(t));
    ICaL=zeros(size(t));
    IKl=zeros(size(t));
    for j=1:length(t)
        CVs=feval(modello,t(j),y(j,:),0,1);
        INa(j)=CVs(1);
        ICaL(j)=CVs(4);
        Ito(j)=CVs(3);
        IKs(j)=CVs(6);
        IKr(j)=CVs(5);
        IKl(j)=CVs(7);
    end

tsim=toc(a);
fprintf('Tempo di Simulazione: %5.2f secondi\n',tsim);
y0_SS = y0;
save([nsave '\y0_SS'],'y0_SS');
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% FIGURE
%Correnti
figure(1)
plot(t, INa, colore), title('INa'), xlim([0 20]), ylim([-120,10]),
xlabel('time (ms)'), ylabel('intensity (pA/pF)');
figure(2)
plot(t, ICaL, colore), title('ICaL'), xlim([-10 400]), xlabel('time
(ms)'), ylabel('intensity (pA/pF)');
figure(3)
plot(t, Ito, colore), title('Ito'), xlim([-10 400]), xlabel('time
(ms)'), ylabel('intensity (pA/pF)');
figure(4)
plot(t, IKs, colore), title('IKs'), xlim([-10 400]), xlabel('time
(ms)'), ylabel('intensity (pA/pF)');
figure(5)
plot(t, IKr, colore), title('IKr'), xlim([-10 400]), xlabel('time
(ms)'), ylabel('intensity (pA/pF)');
figure(6)
plot(t, IKl, colore), title('IKl'), xlim([-10 400]), xlabel('time
(ms)'), ylabel('intensity (pA/pF)');
saveas(figure(1),[nsave '\INa']);
saveas(figure(2),[nsave '\ICaL']);
saveas(figure(3),[nsave '\Ito']);
saveas(figure(4),[nsave '\IKs']);
saveas(figure(5),[nsave '\IKr']);
saveas(figure(6),[nsave '\IKl']);

h1=figure;
ylabel('V_m')

```

```
xlabel('time');
plot(t,y(:,nV),colore,'LineWidth',2);
saveas(h1,[nsave '\AP']);
Ctot=figure;
subplot(2,1,1);
ylabel('[Na]_i');
xlabel('beats');
plot(1:nb,cNai,colore,'LineWidth',2);
subplot(2,1,2);
ylabel('[K]_i');
xlabel('beats');
plot(1:nb,cKi,colore,'LineWidth',2);
saveas(Ctot,[nsave '\NaiKi']);
```

## **RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio il prof. Stefano Severi e la dott.ssa Elisa Passini per la supervisione e le competenze dimostrate durante questo lavoro, e per l'opportunità concessami di svolgere questo tipo di attività, che parte dal tirocinio svolto nell'anno accademico 2012/2013.

Desidero inoltre ringraziare mia madre, Roberta, e mio padre, Dino, per il sostegno morale ed economico, e per essere stati sempre presenti durante questi 3 anni; mia sorella Erica, per il grande affetto; mio cugino e coinquilino Michele, per la grande compagnia e collaborazione domestica, i miei amici, tutti, per aver allietato anche le giornate più difficili e per essere stati sempre un sicuro aiuto, e la mia ragazza, Laura, sempre al mio fianco in ogni situazione e senza la quale sarebbe stato tutto molto più difficile.